UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

LETÍCIA ANDERSON

Regulação epigenética da expressão gênica de *Schistosoma mansoni* induzida por inibidor de histona deacetilase

Versão corrigida da Tese defendida

São Paulo

01/04/2016

LETÍCIA ANDERSON

Regulação epigenética da expressão gênica de *Schistosoma mansoni* induzida por inibidor de histona deacetilase

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)

Orientador: Prof. Dr. Sergio Verjovski-Almeida

São Paulo

2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Anderson, Letícia
A547r Regulação epigenética da expressão gênica de *Schistosoma mansoni* induzida por inibidor de histona deacetilase / Letícia Anderson. -- São Paulo, 2016.
96p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica
Orientador: Verjovski-Almeida, Sergio

1. Expressão gênica I. T. II Verjovski-Almeida, Sergio, orientador.

574.88 CDD

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

“Regulação epigenética da expressão gênica de Schistosoma mansoni induzida por inibidor de histona deacetilase”

LETÍCIA ANDERSON

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutora em Ciências no Programa de Ciências Biológicas (Bioquímica) - Área de Concentração: Bioquímica.

Aprovado (a) por:

_____

Prof. Dr. Sergio Verjovski de Almeida
(Orientador e Presidente)

_____

Profa. Dra. Aline Maria da Silva
IQ - USP

_____

Prof. Dr. Ricardo José Giordano
IQ - USP

_____

Profa. Dra. Ana Lucia Tabet Oller do Nascimento
IB

_____

Prof. Dr. William de Castro Borges
UFOP

SÃO PAULO
01 de abril de 2016

DEDICATÓRIA

À minha amada mãe por me atribuir asas e ensinar a voar.

Ao amor da minha vida por sempre voar ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado a vida, iluminado meu caminho, guiado meus passos e estado ao meu lado em todos os momentos. Todas minhas conquistas devo à Ele.

Ao Prof. Dr. Sergio Verjovski-Almeida, por me conceder a grandiosa oportunidade de ser sua aluna, guiar meu aprendizado no universo da ciência, me ensinando a questionar, argumentar, ensinar, desenvolver e solucionar. Obrigada por toda confiança e aprendizado.

Aos amigos de laboratório: Prof. Eduardo Reis, Ana Ayupe, Adriana, Alexandre, Angela, Bruno, Carlos, David, Dinar, Diogo, Elton, Ester, Felipe, Gabriel, Giulliana, Julio, Kleber, Lauren, Murilo, Rodrigo, Santiago, Yuri. Obrigada por contribuírem com críticas, sugestões e ensinamentos no decorrer do doutorado e por partilharem momentos alegres.

Aos grandes e especiais amigos Ana Tahira, Bianca, Katia, Lucas, Mariana e Monete que o laboratório me presentou e levarei para toda a vida. Muito obrigada por me ensinarem sobre a ciência e sobre a vida!

Aos queridos amigos que a Bioquímica Avançada me presenteou Patrícia, Priscilla e Thiago.

À Ana Paula Linda, por gerenciar os projetos e por sempre me aconselhar nos momentos difíceis.

Aos colaboradores, Prof. Ricardo DeMarco, Profa. Eliana Nakano, Profa. Solange Serrano, Dra. Cybele Gargioni, Patrícia Miyasato e Eduardo Kitano por auxiliarem de diferentes formas ao longo deste trabalho.

Ao Raymond Pierce e todos do projeto SEtTReND (Schistosoma Epigenetics – Targets, Regulation, New Drugs).

À minha família: minha amada e guerreira mãe Sueli por me ensinar todos os valores da vida, me incentivar e permitir buscar meus sonhos; aos meus amados irmãos Regiane e Ernani que me passaram ensinamentos através do exemplo de perseverança, honestidade e fé; ao meu pai Edilberto (*in memoriam)* por ser uma estrela no céu guiando meu caminho; ao meu esposo Ênio por ser meu melhor amigo e me ensinar como viver o amor em todas as suas formas.

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP por conceder a bolsa de doutorado (Processo 2010/51067-0).

“Imagination is more important than knowledge.
For knowledge is limited to all we now know and understand, while imagination embraces the entire world, and all there ever will be to know and understand.”
Albert Einstein

RESUMO

Anderson, L. **Regulação epigenética da expressão gênica de *Schistosoma mansoni* induzida por inibidor de histona deacetilase.** 2016. 96p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A esquistossomose é um grave problema de saúde pública, com alta mortalidade e morbidade em países endêmicos, causada pelo verme trematódeo do gênero Schistosoma. O praziquantel é a única droga disponível para tratamento da doença, é usada em larga escala para tratamento de populações de áreas endêmicas, porém não previne a reinfecção e tem efeito somente em vermes adultos. Drogas estudadas em câncer como inibidores de histona deacetilases (iHDACs) modificam o padrão epigenético da célula desencadeando a morte celular, e em *Schistosoma mansoni* já foi mostrado que a inibição de HDACs além de aumentar a acetilação de histonas alterou o fenótipo de miracídios e provocou morte em esquistossômulos e vermes adultos. O presente estudo investigou o efeito do iHDAC Trichostatin A (TSA) na regulação da transcrição gênica em esquistossômulos, detectando por meio de ensaios de *microarray* centenas de genes diferencialmente expressos, relacionados a replicação de DNA, metabolismo e complexos modificadores de histonas. A inibição de HDAC em vermes adultos levou a um aumento da acetilação nas marcas de histonas H3K9ac, H3K14ac e H4K5ac relacionadas à indução de transcrição. Com imunoprecipitação de cromatina seguida de PCR (ChIP-qPCR) detectou-se o aumento de deposição de H3K9ac e H3K14ac na região promotora de genes com expressão aumentada ou diminuída, porém a marca de repressão H3K27me3 não sofreu alteração na região promotora de nenhum gene analisado. Análises adicionais indicaram um conjunto de genes diferencialmente expressos que codificam proteínas *histone readers*, que fazem parte de complexos modificadores de histonas, como EED capaz de identificar a marca de repressão H3K27me3 e regular a atividade de EZH2, apontando um novo alvo terapêutico. O efeito sinérgico entre iHDAC e um iEZH2 foi testado e detectou-se o aumento da mortalidade de esquistossômulos. A estrutura de SmEZH2 foi modelada por homologia e usada para análises computacionais que sugeriram uma alta afinidade de ligação de SmEZH2 com o iEZH2, abrindo uma perspectiva de desenvolvimento de novas drogas específicas para tratamento da esquistossomose.

Palavras-chaves: *Schistosoma mansoni*, HDAC, epigenética, histona, expressão gênica, EZH2

ABSTRACT

Anderson, L. **Epigenetic regulation of gene expression in *Schistosoma mansoni* induced by histone deacetilase inhibitor.** 2016. 96p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Schistosomiasis is a serious public health problem, with high mortality and morbidity in endemic countries, caused by trematode worms of the genus Schistosoma. Praziquantel is the only available drug for treatment of the disease; it is used extensively to treat populations in endemic areas, but does not prevent reinfection and is effective only in adult worms. Drugs studied in cancer as histone deacetylase inhibitors (iHDACs) modify the epigenetic status of the cell, triggering cell death, and it has been shown in *Schistosoma mansoni* that inhibition of HDACs increase histone acetylation, alter the phenotype of miracidia and cause death in schistosomules and adult worms. The present study investigated the effect of iHDAC Trichostatin A (TSA) on the regulation of gene transcription in schistosomules, detecting by means of microarray assays hundreds of differentially expressed genes related to DNA replication, metabolism and histone remodeling complexes. Inhibition of HDAC in adult worms led to an increase in histone acetylation marks H3K9ac, and H3K14ac H4K5ac related to transcriptional induction. With chromatin immunoprecipitation followed PCR (ChIP-qPCR) we detected an increased deposition of H3K9ac and H3K14ac at the promoter region of genes with increased or decreased expression, but the repressive mark H3K27me3 was not changed at all analyzed gene promoter regions. Additional analysis indicated a set of differentially expressed genes that encode histone reader proteins that are part of histone modifier complexes such as EED, which is able to identify the repression mark H3K27me3 and to regulate EZH2 activity, pointing to a new therapeutic target. The synergistic effect between iHDAC and one iEZH2 has been tested and found to cause an increase in schistosomules mortality. The SmEZH2 structure was modeled by homology and used for computational analyses, which suggested a high affinity binding of SmEZH2 with iEZH2, opening the opportunity for development of new specific drugs for treatment of schistosomiasis.

Keywords: *Schistosoma mansoni*, HDAC, epigenetics, histone, gene expression, EZH2

LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA:	DNA complementar
ChIP:	Imunoprecipitação de cromatina
ChIP-Seq:	Imunoprecipitação de cromatina e Sequenciamento do DNA
ChIP-qPCR:	Imunoprecipitação de cromatina seguida de PCR quantitativo
DNA:	*Deoxyribonucleic Acid*
EED:	*Embryonic Ectoderm Development*
EZH2:	*Histone-lysine N-methyltransferase* do complexo PRC2
HAT:	Histona Acetiltransferase
HDAC:	Histona Deacetilase
HDE:	*Histone downstream elemento*
HMT:	Histona Metiltransferase
H3K9ac:	Acetilação da lisina 9 da histona H3
H3K14ac:	Acetilação da lisina 14 da histona H3
H4K8ac:	Acetilação da lisina 8 da histona H4
H4K5ac:	Acetilação da lisina 5 da histona H4
H3K27me3:	Trimetilação da lisina 27 da histona H3
H3K56:	Lisina 56 da histona H3
H3K36:	Lisina 36 da histona H3
H4K20:	Lisina 20 da histona H4
H3K9me3:	Trimetilação da lisina 9 da histona H3
iHDAC:	Inibidor de HDAC
IPA:	*Ingenuity Pathway Analysis*
MCM:	Minichromosome Maintenance Complex
MPT:	Modificação pós-traducional de histona
mRNA:	RNA mensageiro
ORC:	Complexo de reconhecimento de origem
PCR:	Reação em Cadeia da Polimerase
PRC2:	*Polycomb Repressive Complex 2*
RNA:	*Ribonucleic acid*
RNA-Seq:	Sequenciamento em larga escala de RNA
RT-qPCR:	Transcrição reversa seguida de PCR quantitativa
SAM:	S-adenosilmetionina
SET:	*Su(var)3-9 Enhancer of zeste Trithorax domain*
SLBP:	*Stem-loop binding protein*
SUZ12:	*Suppressor of Zeste 12*
TSA:	Trichostatin A
TSS:	Sítio de início de transcrição
UTR:	Região não traduzida (*Untranslated region*) do RNA

Sumário

1. Introdução 11

1.1 O parasita *Schistosoma mansoni* 11

1.2 Epigenética em eucariotos 15

1.3 Regulação da cromatina em *S. mansoni* 21

1.4 Drogas com efeitos epigenéticos em *S. mansoni* 23

2. Objetivos 25

2.1 Objetivo geral 25

2.2 Objetivos específicos 25

3. Metodologia 26

3.1 Análise *in silico* de histonas de *S. mansoni* e proteínas com motivos leitores de histonas 26

3.2 Tratamento de esquistossômulos e vermes adultos em cultura com inibidor de HDAC 26

3.3 Padronização de extração de histonas acetiladas 28

3.4 *Western blotting* para detecção e quantificação de histonas com modificações pós-traducionais 29

3.6 Perfil de expressão gênica em *microarray* 4x180k 31

3.7 Validação de genes diferencialmente expressos 33

3.8 Imunoprecipitação de cromatina com anticorpos anti-histonas modificadas 35

3.9 Ensaio de efeito sinérgico entre inibidor de HDAC e inibidor de EZH2 36

3.10 Modelagem do domínio SET de EZH2 e acoplamento de GSK343 37

4. Resultados 39

4.1 Análise *in silico* de histonas de *S. mansoni* 39

4.2 Perfil de modificações pós-traducionais em histonas de *S. mansoni* tratado com TSA. 44

4.3 Perfil de expressão gênica em larga-escala de esquistossômulos sob efeito de inibidor de HDAC 48

4.4 PCR em Tempo Real (RT-qPCR) como validação para as análises de genes diferencialmente expressos nos quatro tempos de tratamento de esquistossômulos .. 58

4.5 Histonas modificadas em região promotora de genes diferencialmente expressos após tratamento de esquistossômulos com iHDAC 60

4.6 Efeito sinérgico de inibidor de HDAC (TSA) com inibidor de EZH2 (GSK343) 64

4.7 Modelagem de EZH2 de *S. mansoni* e *docking* com GSK343 67

5. Discussão 73

6. Conclusão 85

7. Referências 87

8. Lista de Anexos em CD-ROM 96

1. Introdução

1.1 O parasita *Schistosoma mansoni*

A esquistossomose é uma doença parasitária infecciosa que afeta mais de 230 milhões de pessoas no mundo, sendo considerado um problema de saúde pública com alta morbidade e mortalidade em países endêmicos (Gryseels 2012, Colley, Bustinduy et al. 2014). A doença é causada por tremátodas do gênero *Schistosoma*, e três espécies são as principais responsáveis por causar a doença em humanos: *S. mansoni, S. haematobium* e *S. japonicum*. Estas espécies se diferenciam por características fenotípicas nos vermes e ovos, órgão de alojamento dos vermes adultos o que influencia na patologia da doença, além serem prevalentes em regiões distintas no mundo (Colley, Bustinduy et al. 2014). A espécie *S. mansoni* é encontrada na África, Oriente Médio, Caribe, Brasil, Venezuela e Suriname (WHO 2015), e seu hospedeiro intermediário é o caramujo do gênero *Biomphalaria*. No Brasil o parasita é extensivamente transmitido, sendo encontrado em 19 estados com focos endêmicos, especialmente na região nordeste e sudeste (Martins-Melo, Pinheiro et al. 2014). A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera a esquistossomose como segunda doença tropical negligenciada com maior impacto socioeconômico, sendo associada à pobreza e ausência de saneamento básico (WHO 2015).

Em regiões endêmicas a forma prevalente da doença é a esquistossomose crônica, resultante da exposição constante à forma infectante do parasita, a cercária (Colley, Bustinduy et al. 2014). Nestas regiões de alta transmissão, aproximadamente 60-80 % das crianças em idade escolar e 20-40 % dos adultos são constantemente infectados, e levantamentos soro epidemiológicos mostraram que a maioria dos residentes já foi infectada em algum momento da vida (Colley, Bustinduy et al. 2014).

O esquistossoma é um parasita com características peculiares; vive anos no hospedeiro definitivo (homem) dentro da corrente sanguínea, adaptado às respostas do sistema imune. Os

vermes adultos macho e fêmea vivem acasalados dentro das veias do plexo mesentérico, e as fêmeas produzem centenas de ovos diariamente (Figura 1). Os ovos cruzam a parede dos vasos e do intestino, atingem a luz intestinal e são eliminados nas fezes, ou são carreados pela corrente sanguínea das veias do mesentério e ficam retidos nos tecidos do hospedeiro (intestino e fígado) induzindo inflamação. Os ovos que saem nas fezes entram em contado com água corrente e eclodem, liberando a larva ciliada miracídio, capaz de infectar caramujo do gênero *Biomphalaria.* Dentro do caramujo, o parasita inicia o ciclo de reprodução assexuada de esporocistos. Os esporocistos originam larvas com cauda bifurcada, cercárias capazes de nadar até encontrar o novo hospedeiro definitivo, penetrando através da pele e perdendo a cauda. Na pele, as larvas sofrem alterações morfológicas gerando os esquistossômulos, que após 5 a 7 semanas na circulação do hospedeiro chegam ao estágio adulto, gerando vermes machos e fêmeas que pareiam atingindo a maturação, e se instalam nas veias mesentéricas (Figura 1).

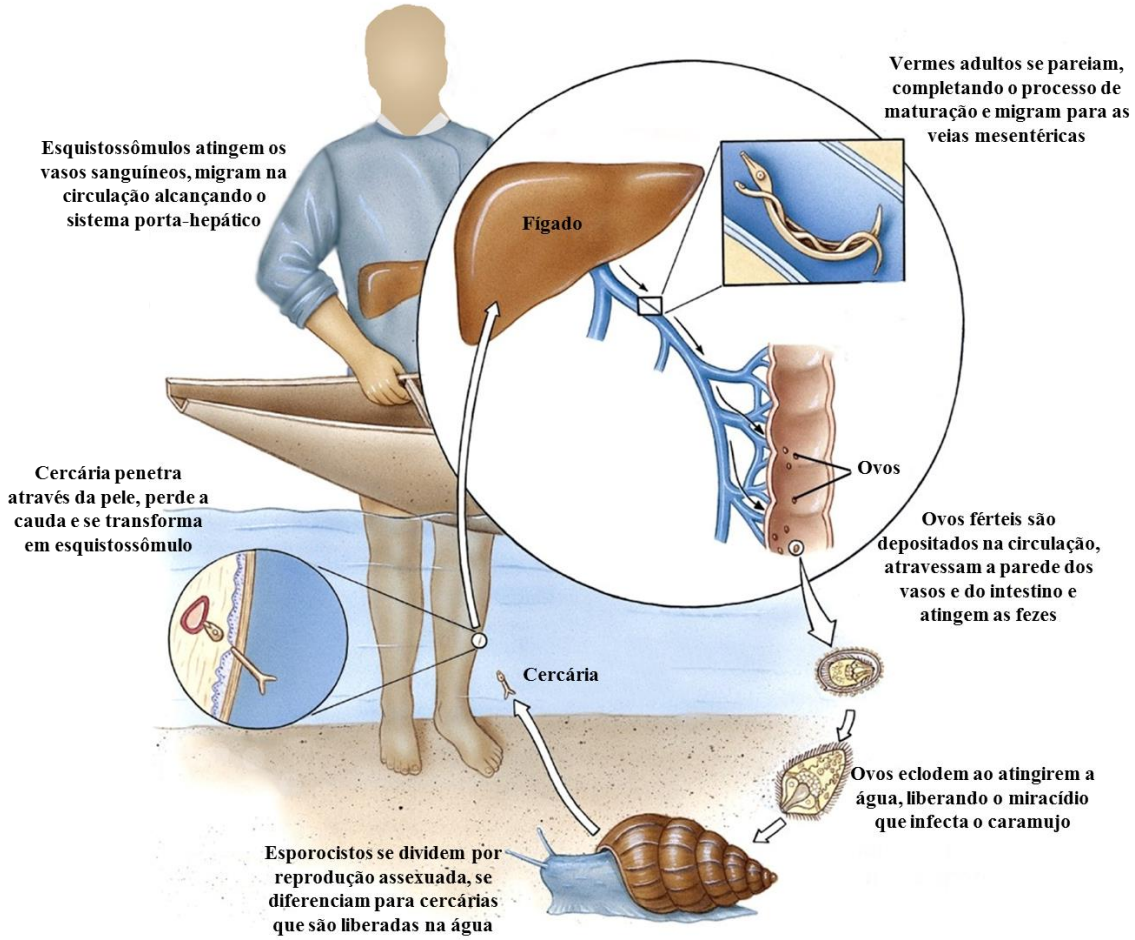

Figura 1: Ciclo de vida do parasita *Schistosoma mansoni.* Ovos (150 µm) de *S. mansoni* ao atingirem a água eclodem em miracídios (150 µm) (larva ciliada) com capacidade de nadar e penetrar no hospedeiro intermediário (caramujo). Dentro do caramujo, há reprodução assexuada de esporocistos e produção de cercárias (325 µm). As cercárias são liberadas na água, e penetram na pele do hospedeiro definitivo (homem). Ao atravessar a barreira da pele, perdem a cauda, se transformando em esquistossômulo (150 µm). Os esquistossômulos se desenvolvem migrando na circulação através de vários órgãos, até os vermes alcançarem o sistema porta-hepático aproximadamente 5 semanas após infecção. O pareamento do verme adulto (7 a 10 mm) macho e fêmea permite a completa maturação sexual, e o casal migra contra a circulação e se localiza nas veias mesentéricas, dando início à deposição de ovos na circulação. Ovos que atravessam a parede dos vasos e do intestino são eliminados nas fezes, podendo atingir a água e completar o ciclo. Parte dos ovos são levados pela corrente sanguínea ao sistema porta-hepático e ficam presos no fígado, formando granulomas ao redor (não mostrado na figura). Figura adaptada de (Pathogen-Profile-Dictionary 2015).

Como visto no ciclo do parasita, os estágios encontrados no hospedeiro definitivo (humano) são os esquistossômulos, os vermes adultos e os ovos, tendo grande importância no estudo do parasita. Os esquistossômulos estão em constante transformação desde o momento

em que a cercaria penetra na pele perdendo a cauda, e esta larva precisa atravessar a epiderme e derme usando as secreções de sua glândula acetabular (Fishelson, Amiri et al. 1992), até atravessar o epitélio endotelial e alcançar os pequenos vasos presentes na pele. Uma vez dentro do vaso, as secreções das glândulas cessam e as células se atrofiam em até 72 horas (Keene, Jeong et al. 1983, McKerrow, Keene et al. 1983). Com todas estas etapas de penetração, o esquistossômulo em desenvolvimento sofre significantes mudanças morfológicas e bioquímicas (Mountford and Harrop 1998), tais como mudança de metabolismo aeróbico para anaeróbico, perda do glicocálix e reconstrução do tegumento (Skelly and Shoemaker 2000).

Os esquistossômulos ao atingirem o sistema porta-hepático terminam o processo de desenvolvimento formando vermes adultos, que ao se parearem (macho alojando a fêmea no canal ginecofórico) terminam o processo de maturação. Esta característica de sexos separados nos vermes é única entre os trematodas o que requer um desenvolvimento específico para macho e fêmea. A fêmea requer constante pareamento com o macho para manter os órgãos sexuais (ovário e vitelário) em constante mitose, sendo um pré-requisito para a produção de ovos (Knobloch, Winnen et al. 2002, Beckmann, Quack et al. 2010). Ao contrário das fêmeas, os machos não apresentam alterações morfológicas quando estão despareados, mantendo os testículos diferenciados e produzindo esperma (Armstrong 1965). Todas estas transformações que os vermes sofrem são reflexos de mudança na transcrição gênica ao longo do ciclo de vida do parasita, como já demonstrado em alguns estudos (Verjovski-Almeida, DeMarco et al. 2003).

Todas as evidências na literatura apontam que os ovos de *Schistosoma* são os responsáveis pela morbidade da doença, e não os vermes adultos (Burke, Jones et al. 2009). Isso pelo fato de muitos ovos não serem excretados do hospedeiro, se alojando permanentemente no intestino e fígado. Estes ovos induzem a formação de granulomas ao seu redor, caracterizados por linfócitos, eosinófilos e macrófagos (Pearce and MacDonald 2002,

Fairfax, Nascimento et al. 2012). Os ovos por sua vez produzem enzimas proteolíticas prevenindo a necrose do tecido, porém induzem inflamação crônica levando às manifestações da esquistossomose (Peterson and Von Lichtenberg 1965). Entre as proteínas secretadas por ovos com função caracterizada, há proteínas que agem induzindo inflamação no tecido, como IPSE/alpha-1, venon allergen-like proteins 2, 3, 5 e 9 (Cass, Johnson et al. 2007), ou ainda proteínas como MEG-3 com função proteolítica que pode estar envolvida na degradação do tecido do hospedeiro, permitindo assim o ovo escapar do sistema imune (Mathieson and Wilson 2010).

Até o presente momento, praziquantel é a única droga disponível para o tratamento da doença, sendo efetiva contra todas as espécies em dose única. Apesar do uso intensivo em países endêmicos, não há evidências claras sobre desenvolvimento de resistência ao praziquantel em campo, embora esta resistência já tenha sido induzida em cepas de laboratório (King, Olbrych et al. 2011). O praziquantel só é efetivo contra o verme adulto (5 a 6 semanas após infecção) não sendo efetivo contra formas imaturas, sendo efetivo por permitir o influxo de cálcio no parasita e assim levar a paralisia e danos ao tegumento (Greenberg 2013). Mais ainda, em regiões endêmicas, o paciente recém-tratado pode voltar a se expor às cercárias da água contaminada, e se re-infectar. Além disso, para total eficiência do tratamento, é necessária efetiva resposta imune humoral do hospedeiro contra o parasita (Brindley and Sher 1987, Doenhoff, Cioli et al. 2008). Neste cenário, se faz necessário a pesquisa de novas drogas para tratamento da esquistossomose que atuem nos estágios de verme maturo e imaturo.

1.2 Epigenética em eucariotos

Mecanismos epigenéticos tem um papel central na programação da expressão gênica e incluem um grande número de modificações pós-traducionais (MPTs) de histonas, variantes de histonas, metilação de DNA e RNAs de interferência (Margueron and Reinberg 2010). Apesar de todos estes mecanismos de regulação epigenética, somente a metilação de DNA foi mostrada

como hereditária na divisão celular (Wigler, Levy et al. 1981). Apesar disso, algumas MPT de histonas podem contribuir para a transmissão de informação epigenética, outras diretamente no processo de transcrição, e ainda outras somente tem função estrutural na cromatina (Trojer and Reinberg 2006, Berger, Kouzarides et al. 2009).

Em eucariotos, o DNA genômico está empacotado por histonas organizadas em nucleossomos, formando um complexo macromolecular denominada cromatina. A unidade do nucleossomo é formada por duas cópias de cada uma de quatro histonas, H2A, H2B, H3 e H4, montadas na forma de octâmero com 146 pares de bases (bp) de DNA enovelados em duas voltas ao redor, sendo o complexo estabilizado por uma histona H1 (Khorasanizadeh 2004). O estado de remodelamento da cromatina varia entre “aberto” e “fechado”, sendo um guia para a regulação epigenética da expressão gênica. Esta variação de estados resulta de alterações na estrutura dos nucleossomos, que compreendem modificações na porção amino-terminal (cauda) das histonas, incluindo acetilação, metilação, fosforilação, poli-ADP ribosilação, ubiquitinação, sumoilação, citrulinação e glicosilação (Nightingale, O'Neill et al. 2006). Estas modificações atuam por dois mecanismos característicos: pela diminuição de contato do nucleossomo (entre histona-histona ou entre histona-DNA) alterando estrutura e estabilidade, ou pelo recrutamento de proteínas com atividade enzimática modificadora de cromatina (Kouzarides 2007).

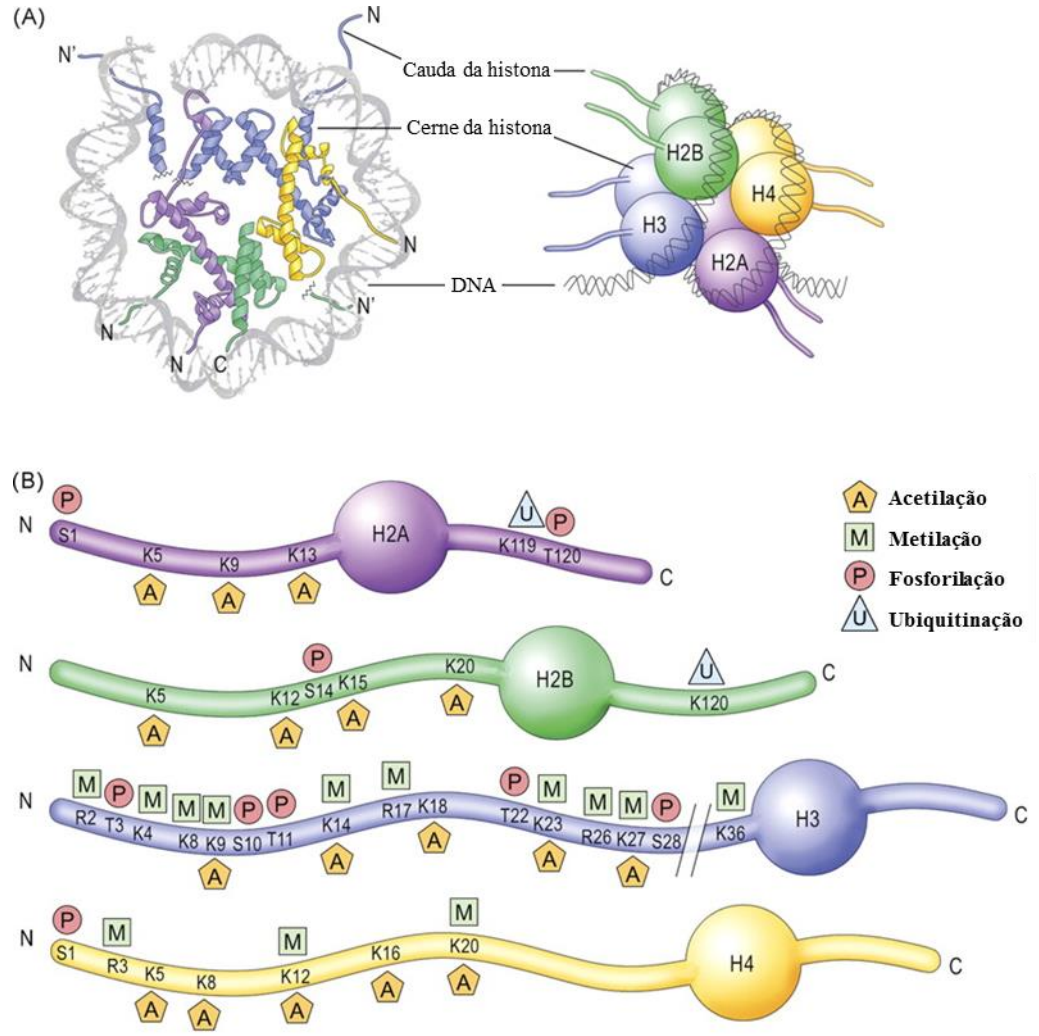

Figura 2: Modificações pós-traducionais mais frequentes em histonas. (A) Estrutura do nucleossomo contendo dímeros de cada histona H2A, H2B, H3 e H4, com DNA enovelado ao redor. Cada histona possui a cauda amino-terminal exposta para fora do centro do nucleossomo. (B) Cauda amino-terminal de cada histona com possíveis modificações pós-traducionais (MPTs) (acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação) em resíduos específicos de aminoácidos (lisina-K, arginina-R, serina-S e treonina-T). (Figura adaptada de (Alberini 2009))

As histonas são transcritas em eucariotos pela RNA Polimerase II principalmente durante na transição da fase G1 e S do ciclo celular. Quando a replicação de DNA é interrompida, rapidamente os níveis de RNA mensageiro (mRNA) de histona desaparecem do citoplasma, tendo uma meia-vida de 10 a 15 minutos (Osley 1991). Os genes de histona dependentes da replicação celular têm como característica a ausência de introns, assim o único processamento que o mRNA sofre é a clivagem na porção 3´UTR (*untranslated region)* entre

a estrutura secundária de um *hairpin* e o motivo na sequência chamado *histone downstream element (HDE)* (Dominski, Zheng et al. 1999, Battle and Doudna 2001). Estes dois elementos recrutam fatores necessários a esta clivagem no 3´UTR tal como a proteína SLBP (*Stem-loop binding protein*) que se associa fortemente ao *hairpin* estabilizando outras proteínas necessárias para a clivagem do HDE, e auxiliando no transporte do mRNA para o citoplasma (Wang, Whitfield et al. 1996).

As caudas dos nucleossomos se estendem para fora da superfície polimérica da cromatina abrangendo aproximadamente 30 % da massa individual de cada histona (Wolffe and Hayes 1999), sendo assim exposta a interações com diferentes proteínas. Individualmente, as modificações tais como a acetilação, que neutraliza a carga positiva na cauda, e a fosforilação, que adiciona uma carga negativa, podem levar a descondensação da cromatina. Assim, se houver múltiplas MPTs nas caudas das histonas, elas podem servir para amplificar o efeito causado, havendo evidencia de sinergismo entre estas marcas de histonas. Como exemplo de sinergismo, a acetilação e a fosforilação de histona induzem a transcrição de genes imediatamente após estímulo de mitose (Barratt, Hazzalin et al. 1994). Evidências como estas convergiram para o conceito da existência de um código das histonas, que propõe que modificações de um conjunto de resíduos específicos das diversas histonas, agindo sequencialmente ou em combinação, desencadeiam uma determinada função biológica (Jenuwein and Allis 2001, Kouzarides 2007).

Modificações das histonas tais como acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação foram associadas em geral à ativação da transcrição do gene do locus que está sendo modificado, porém a metilação de outros resíduos de histonas, assim como ubiquitinação, sumoilação, citrulinação e isomerização de prolina podem implicar na repressão da transcrição daquele gene. Observa-se que as modificações tem o potencial de ativar ou reprimir um certo gene em diferentes condições (Kouzarides 2007). Este fato pode ser explicado pela ligação, em

uma dada região promotora de um gene, de diferentes fatores de transcrição e enzimas modificadoras de histonas que tem a capacidade de "ler" de maneiras diversas estas marcas (Strahl and Allis 2000), ou seja, recrutando diferentes proteínas parceiras que resultam na ativação ou repressão da expressão.

A acetilação é a modificação que desencadeia o fenótipo menos variável, sendo associada com a ativação da transcrição gênica. Em geral as histonas acetiltransferases (HATs) modificam mais de uma lisina, predominando as modificações na cauda amino-terminal das histonas que são mais acessíveis aos fatores de transcrição (Kouzarides 2007) tais como acetilação da histona nos resíduos H3K9ac, H3K14ac, H4K8ac e H4K16ac (Strahl and Allis 2000); as histonas assim modificadas se localizam ao longo do locus do gene a ser transcrito. Outra característica associada à acetilação foi reportada em levedura, onde a acetilação na porção interna da histona H3 na lisina 56 (H3K56) foi encontrada em histona recém-sintetizada durante a fase S do ciclo celular e na presença de dano ao DNA (Celic, Masumoto et al. 2006, Maas, Miller et al. 2006).

A metilação de histonas pelas histona metiltransferase (HMT) resulta em uma maior diversidade de efeitos comparada com a acetilação. Assim, a metilação de H3K4, H3K36 e H3K79 está associada à ativação da transcrição. A H3K4me3 (tri-metilada) e a H3K36me3 têm grande importância na elongação transcricional, se localizando principalmente na porção 5´ de genes ativos e na porção 3´ de genes ativos respectivamente (Joshi and Struhl 2005, Consortium 2012). Já a tri-metilação de H3K9, H3K27 e H4K20 está associada a repressão da transcrição e silenciando da cromatina (Kouzarides 2007).

Além das histonas canônicas com suas MPTs, há variantes de histonas que diferem na sequência de poucos aminoácidos, ou na presença de grandes domínios adicionais na proteína. A substituição de histonas canônicas por variantes altera as propriedades bioquímicas do nucleossomo por afetar as MPTs, e afetar as interações entre as proteínas e a estrutura da

cromatina (Talbert and Henikoff 2010). A histona H3.3 difere da histona H3 em apenas 4 aminoácidos, e tem uma alta taxa de deposição em regiões promotoras e de enhancers sugerindo que H3.3 mantem estas regiões altamente expostas aos fatores de transcrição (Henikoff 2008), também se correlacionando com regiões de alta taxa de transcrição (Chow, Georgiou et al. 2005). Já a variante H3.3 é depositada predominantemente na forquilha de replicação do DNA (Henikoff 2008). A variante H2A.Z ao ser incorporada nos nucleossomos diminui sua estabilidade por alterar a interface com H2B, contribuindo para transcrição, reparo de DNA e segregação cromossômica (Meneghini, Wu et al. 2003). Outra variante com papel importante no reparo de DNA é a histona H2A.X, a qual é fosforilada em resposta à quebra de fita-dupla do DNA desencadeando parada do ciclo celular e recrutamento de proteínas de reparo (Scully and Xie 2013).

As atividades opostas de histonas acetiltransferases (HATs) e histonas deacetilases (HDACs) regulam a expressão gênica através da modificação do grau de acetilação das histonas (Roth, Denu et al. 2001, Thiagalingam, Cheng et al. 2003). As HATs transferem o grupo acetil para resíduos de lisina na porção amino-terminal de histonas, o que resulta em diminuição da afinidade ao DNA e expansão local da cromatina, permitindo acesso ao DNA de proteínas reguladoras (Roth, Denu et al. 2001). Por outro lado, as HDACs catalisam a remoção dos grupos acetil, levando a condensação da cromatina e repressão da transcrição (Roth, Denu et al. 2001, Thiagalingam, Cheng et al. 2003).

Em eucariotos, a acetilação de histonas neutraliza a carga positiva da lisina, diminuindo a afinidade entre DNA-histona, e assim permite o acesso a proteínas promovendo regulação positiva e negativa da transcrição (Zupkovitz, Tischler et al. 2006). A acetilação da cromatina regula, além da transcrição, o mecanismo de reparo, a replicação do DNA e sua condensação, e algumas marcas de histonas em resíduos específicos se caracterizam por ter uma função celular específica (Zupkovitz, Tischler et al. 2006).

1.3 Regulação da cromatina em *S. mansoni*

O complexo ciclo de vida do parasita *S. mansoni* e seus diversos fenótipos refletem seu grande genoma com 380 megabases e oito cromossomos (sete cromossomos autossômicos e um par ZW de cromossomos sexuais) (Berriman, Haas et al. 2009, Protasio, Tsai et al. 2012). A versão mais recente da sequência do genoma atualizou o número de genes codificadores de proteína para 10852 (Protasio, Tsai et al. 2012), com mudanças na arquitetura dos genes e retirada de predições gênicas sem evidencia de transcrição (Protasio, Tsai et al. 2012). A sequência genômica é obviamente idêntica em todos os estágios do ciclo de vida do parasita, e assim como em outros eucariotos complexos, os mecanismos de regulação epigenética são os responsáveis por controlar os perfis de transcrição gênica e definir estados específicos de cada estágio ao longo do ciclo de vida.

As HDACs em eucariotos são divididas em quatro classes, de acordo com sua homologia com HDACs de leveduras, localização celular e atividade enzimática (Thiagalingam, Cheng et al. 2003). A classe I de HDACs representa homólogos da proteína RPD3 de levedura, e geralmente pode ser encontrada no núcleo da célula. Já a classe II de HDACs tem homologia com a proteína Hda1 de levedura e pode estar presente no núcleo e no citoplasma. HDACs da classe III (Sirtuins) são homólogas de proteína Sir2 de levedura e requerem o fator NAD+ para regular a expressão gênica em resposta ao estado redox da célula. E finalmente a classe IV de HDACs tem similaridade de domínio catalítico com as enzimas da classe I e II, porém não possui identidade suficiente para ser classificada junto com este grupo de enzimas (Bolden, Peart et al. 2006). Em *S. mansoni*, três enzimas da classe I de HDACs (HDAC1, 3 e 8) foram encontradas expressas em todos os estágios de vida do parasita (Oger, Dubois et al. 2008); ao mesmo tempo o possível gene codificador da HDAC2 não foi encontrado no genoma (Brunmeir, Lagger et al. 2009), e ele também está ausente em outros invertebrados. Enzimas de classe II em *S. mansoni* foram identificadas por análise *in silico*

como possíveis ortólogos das HDACs 4, 5 e 6, e aparentemente as HDACs 7, 9 e 10 estão ausentes no parasita (Pierce, Dubois-Abdesselem et al. 2012). Já a classe III representada pelas Sirtuins, foram encontrados cinco membros, sendo estes Sirt 1, 2, 5, 6 e 7 (Pierce, Dubois-Abdesselem et al. 2012).

Em *S. mansoni,* a acetilação de histonas já foi caracterizada *in vitro* pela ação da enzima SmGCN5 (Smp_070190), capaz de adicionar acetilação nas histonas H3, H2A (de Moraes Maciel, de Silva Dutra et al. 2004) e H3 lisina 14 (H3K14ac), onde também se constatou sua localização celular principalmente em grânulos de intercromatina (de Moraes Maciel, da Costa et al. 2008). Além desta, a HAT SmCBP1 (ortólogo de CBP/p300) foi caracterizada como capaz de adicionar acetilação à histona H4 e interagir fisicamente com o receptor nuclear smFTZ-F1 potencializando a atividade transcricional (Bertin, Oger et al. 2006).

Além da caracterização da atividade de enzimas modificadoras de histonas em esquistossoma, foram identificadas por análise *in silico* 32 outras proteínas de *S. mansoni* com potencial para se ligar a histonas e modular sua função, tais como enzimas, fatores de transcrição e proteínas transportadoras relacionadas a diferentes processos celulares (Anderson, Pierce et al. 2012).

O perfil de distribuição de marcas de histonas na cromatina pode ser caracterizado com a técnica de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) combinado com sequenciamento do DNA (ChIP-Seq). Em *S. mansoni* foram realizados ChIP-Seq de marcas tais como H3K9ac (Cosseau, Azzi et al. 2009, Dubois, Caby et al. 2009) explorando a deposição em região promotora de certos genes de interesse, não expandindo a análise para todos os genes do parasita. O epigenoma do parasita foi explorado recentemente com ChIP-Seq das marcas de H3K4me3, H3K27e3, H3K9me3 e H3K9ac em esquistossômulos, cercárias e verme adultos, identificando mudanças no estado da cromatina nos diferentes estágios (Roquis, Lepesant et al. 2015). Além disso, esse trabalho apontou para a existência de regulação da região de início de transcrição

(TSS) dos genes em cercária semelhante ao encontrado em células tronco embrionárias de vertebrados, com acúmulo de marca de repressão H3K27me3 (Roquis, Lepesant et al. 2015).

1.4 Drogas com efeitos epigenéticos em *S. mansoni*

Até o presente momento não há uma vacina efetiva que previna a infecção por esquistossoma, apesar diversos grupos concentrarem esforços no seu desenvolvimento (Jiz, Wu et al. 2015, Santini-Oliveira, Coler et al. 2015). Assim a única estratégia para o combate a esta parasitose é o tratamento em massa de populações em áreas endêmicas com praziquantel, a única droga disponível e efetiva somente no verme adulto (presente no hospedeiro após aproximadamente 40 dias da infecção). Com isso, inúmeras drogas vem sendo testadas como alternativas ao uso do praziquantel, tais como mefloquina (Keiser, Chollet et al. 2009), trioxaquina (Boissier, Cosledan et al. 2009), oxadiazol (Sayed, Simeonov et al. 2008) ou ainda drogas que tenham efeito sinérgico juntamente com o praziquantel tal como o omeprazol (Almeida, Lage et al. 2015).

Outra estratégia, também envolvendo o reposicionamento de drogas, propõe o teste de drogas anti-câncer, como por exemplo o inibidor de quinase Imatinib, o qual se mostrou induzir mortalidade em vermes adultos de esquistossoma (Beckmann and Grevelding 2010). Esta estratégia se torna viável pois o parasita expressa proteínas com alta similaridade com ortólogos humanos que são os alvos destas drogas, sendo um ponto de partida para a busca por compostos análogos que sejam mais específicos para alvos do parasita.

A acetilação de histonas é um importante fator determinante da regulação da transcrição, e numerosos estudos mostraram a correlação de expressão aberrante de HDACs com desenvolvimento de câncer em humanos (West and Johnstone 2014), tendo sido demonstrada a perda global de acetilação em células cancerosas (Fraga, Ballestar et al. 2005). Assim, há mais de uma década as HDACs se tornaram promissores alvos terapêuticos para reverter o estado epigenético aberrante associado a células cancerosas (Pandolfi 2001, Baylin and Ohm 2006).

As HDACs em *S. mansoni* foram estudas no parasita usando-se inibidores (iHDAC) para caracterizar suas funções. O inibidor Trichostatin A (TSA) ao ser usado em miracídios *in vitro* causou um aumento da acetilação da histona H4, e como fenótipo observado, notou-se a parada da metamorfose de miracídio em esporocisto (Azzi, Cosseau et al. 2009). Além disso observou-se que ao retirar os miracídios da presença de TSA (até 4 horas de exposição), houve a retomada da metamorfose em esporocistos, indicando uma parada de desenvolvimento transiente e não um desencadeamento de vias de morte celular (Azzi, Cosseau et al. 2009). Em outro estudo, o TSA se mostrou capaz de inibir a atividade catalítica de HDACs e induzir mortalidade em esquistossômulos e vermes adultos, além de ser detectado aumento de apoptose em esquistossômulos por aumentar a atividade de caspases 3/7 (Dubois, Caby et al. 2009). Neste mesmo estudo foi reportado o aumento da acetilação total de histona H3 e H4 em esquistossômulos e vermes adultos tratados com TSA (Dubois, Caby et al. 2009).

Em um estudo recente sobre a caracterização da SmHDAC8, foi reportado que esta HDAC é a mais expressa dentre as enzimas da classe I, e com ensaio de *knock-down* em esquistossômulos não se observou alteração morfológica (Marek, Kannan et al. 2013). Porém ao se introduzir estes esquistossômulos em camundongos por via intravenosa, foi observada diminuição de vermes adultos recuperados após 35 dias de infecção e diminuição de ovos no fígado, indicando ser a presença de SmHDAC8 essencial para o estabelecimento da infecção (Marek, Kannan et al. 2013).

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Estudar mecanismos de regulação da transcrição compreendendo marcas de histonas global e em região promotora de genes com níveis de transcrição alterados em resposta a inibição de HDACs de *S. mansoni*. Com isso, investigar possíveis vias de indução de morte no parasita que estejam com os genes transcricionalmente ativos ou reprimidos por efeito de tratamento com iHDAC.

2.2 Objetivos específicos

- Catalogar os genes de histonas de *S. mansoni* com evidência de transcrição, e analisar suas características tais como conservação de domínio e presença de 3´*hairpin* na porção 3´UTR, identificadas por predição *in silico*.
- Padronizar a extração de histonas e caracterizar o perfil de modificações pós-traducionais (MPT) de histonas em *S. mansoni* sob efeito de inibidor de HDAC.
- Analisar o transcriptoma de esquistossômulos tratados com iHDAC em diferentes tempos por *microarray* e validar as análises por RT-qPCR
- Explorar genes com expressão afetada por tratamento com iHDAC relacionados com indução de morte do parasita.
- Verificar se genes diferencialmente expressos tem alteração no padrão de MPT de histonas na região promotora reguladora do gene.
- Pesquisar novo possível alvo epigenético sobre o qual uma droga possa agir sinergicamente com o iHDAC aumentando a mortalidade de parasitas.
- Validar o novo alvo com análise *in silico* de modelagem da enzima e docking da droga inibidora na enzima.

3. Metodologia

3.1 Análise *in silico* de histonas de *S. mansoni* e proteínas com motivos leitores de histonas

As predições gênicas de histonas foram obtidas do Schisto GeneDB website (http://www.genedb.org/genedb/smansoni) e usadas para análises de similaridade com proteínas humanas, para correção da predição em combinação com dados de transcritos (ESTs e RNA-seq) e para busca de estrutura secundária na porção 3' UTR (*Untranslated region*). Para o alinhamento múltiplo das sequências de cada classe de histona (H2A, H2B, H3 e H4) foi utilizado o algoritmo *ClustalW Multiple Alignment* no software *BioEdit*. Todas as sequências que sugeriam erro de predição, como por exemplo possuírem tamanho da cadeia de aminoácidos maior que o correspondente em outros organismos, foram alinhadas contra o banco de dados de ESTs disponíveis no GenBank e contra os *reads* de RNA-seq gerados em nosso laboratório (Almeida, Amaral et al. 2011), usando Blast*n*. Foi realizada busca de homólogos de histonas humanas para todas as histonas do parasita, para a anotação das variantes de famílias de histona H2A, H2B, H3 e H4.

A busca de motivos *stem-loop* na sequência *downstream* à região codificadora de genes de histonas foi baseada em um modelo Rfam (RNA Family database) aplicado no software *Infernal* (*Inference of RNA alignments*) (Griffiths-Jones, Bateman et al. 2003, Davila Lopez and Samuelsson 2008).

3.2 Tratamento de esquistossômulos e vermes adultos em cultura com inibidor de HDAC

Para os experimentos de *microarray*, o cultivo de esquistossômulos foi realizado no Centro de Pesquisas René Rachou em Belo Horizonte – MG. O cultivo de esquistossômulos (estágio após penetração na pele) é realizado a partir de cercárias mantidas em gelo por 30 minutos, centrifugadas a 1150 RPM por 2 minutos a 4 °C, para então serem ressuspendidas em

Meio M169 com antibióticos (Penicilina, Estreptomicina, Anfotericina B e Gentamicina) aquecido a 37 °C. Com o choque térmico e processo mecânico com vortex por 2 minutos as caudas são quebradas. A separação ocorre por lavagens com o meio de cultura, onde os esquistossômulos decantam no tubo falcon (6 minutos), e as caudas que estão no sobrenadante são retiradas, acrescentando novamente meio e repetindo este processo sucessivas vezes até que reste uma quantidade de caudas menor que 1 % (Basch 1981). Para simular a sinalização recebida na pele após a penetração cutânea, os esquistossômulos foram cultivados em meio enriquecido com hormônios (Hipoxantina, Hidroxicortisona, Serotonina, Triiodotironina) por 16 horas para completa transformação sob condições de 5 % de CO_2 e 37 °C, e após este período o meio de cultura foi renovado e adicionado Trichostatin A (TSA - *Cayman Chemical*) 1 µM. Foram testados quatro tempos de tratamento, e os parasitas foram coletados 12, 24, 48 e 72 horas após o tempo inicial de adição de TSA para cada uma das três réplicas biológicas; a cada 24 horas o meio de cultura foi trocado e a droga foi reposta, para os esquistossômulos mantidos até 48 e 72 horas. Os esquistossômulos coletados foram mantidos em *RNA later (Ambion)* para serem transportados até o Instituto de Química, onde foi realizada a extração de RNA.

Para os experimentos de ChIP-qPCR foram utilizados esquistossômulos obtidos de cercárias fornecidas pelo Laboratório de Malacologia do Instituto Butantan, cultivados sob as mesmas condições descritas anteriormente. Os parasitas foram tratados com TSA (*Cayman Chemical*) 1 µM ou etanol no controle por 12 horas (primeiro tempo analisado no *microarray).*

Para a obtenção de vermes adultos, hamsters da espécie *Mesocricetus auratus* foram infectados com cercárias por inoculação subcutânea e após 49 dias de infecção os animais eram submetidos à perfusão cardíaca. Os animais foram anestesiados com Xilazina 10 mg/kg e Quetamina 200 mg/kg via intraperitoneal e colocados em câmara de CO2 para anóxia, e o estado de anestesia foi verificado por perda de reflexos sensoriais. Foi feita imersão do animal em etanol 70 % e realizada abertura abdominal e torácica, permitindo visualização do plexo

mesentérico e coração (ainda apresentando batimentos cardíacos). Para a perfusão vascular completa do animal, era feita uma abertura na veia porta, e com um sistema de fluxo contínuo (bomba de perfusão Gilson) era bombeado meio RPMI com heparina a partir do ventrículo esquerdo. Os vermes adultos eram coletados e transferidos para placa com meio RPMI contendo penicilina, estreptomicina, anfotericina B, gentamicina e Soro Fetal Bovino 10 % e mantidos a 5 % de CO2 e 37 °C. Os vermes adultos pareados eram transferidos para uma nova placa de cultura, selecionando-se os mais completamente acasalados para que a resposta ao tratamento com TSA 1µM fosse independente do fator pareamento dos vermes.

3.3 Padronização de extração de histonas acetiladas

Para obter um extrato enriquecido em histonas, foi adaptado um protocolo de lise branda do verme adulto, seguido de enriquecimento de histonas com extração ácida. Para 50 casais de vermes adultos pareados foi adicionado 1 mL de tampão de lise (Tampão Salina-Fostato PBS, 0,5 % Triton X-100, 0,02 % NaN_3) (Dubois, Caby et al. 2009) com inibidores de protease (*Mini Protease Inhibitor Cocktail, Complete* – Roche) diluído a 1X, e homogeneizado gentilmente em Glass Potter para fazer separação núcleo/citoplasma, e centrifugado a 2000 RPM por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante era retirado, e o pellet contendo o material nuclear era lavado com o mesmo tampão de lise e novamente centrifugado. Para extrair histonas, o pellet foi ressuspendido em 400 µl de HCl 0,25 M e incubado no gelo *overnight* (Trelle, Salcedo-Amaya et al. 2009). A amostra foi centrifugada por 15 minutos a 16000 g a 4 °C e o sobrenadante enriquecido de histonas foi coletado em um novo tubo. Para concentrar a amostra, foi adicionado ácido tricloroacético 100 % w/v com concentração final de 33 %, incubando 30 minutos no gelo e centrifugando 15 minutos a 16000 g a 4 °C (Shechter, Dormann et al. 2007). O pellet obtido de proteínas concentradas foi lavado duas vezes com acetona gelada com centrifugações de 5 minutos entre as lavagens, para então secar à temperatura ambiente. O extrato enriquecido de histonas era eluído em água com inibidores de protease e armazenado a

-20 °C para posteriores análises. As amostras foram quantificadas com o kit *Protein Assay (Biorad)* baseado no método de Bradford. Para analisar a integridade das proteínas da amostra foi realizada a separação das proteínas em um gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15 %.

3.4 *Western blotting* para detecção e quantificação de histonas com modificações pós-traducionais

Para a identificação de acetilação e metilação em lisinas específicas foram utilizados os anticorpos primários anti-histonas de mamíferos: Anti-Histona H3 acetil K9 de coelho (*Cell Signaling*) (diluição 1:10000), Anti-Histona H3 acetil K14 de coelho (*Abcam*) (diluição 1:2000), Anti-Histona H4 acetil K5 de coelho (*Abcam*) (diluição 1:10.000) e Anti-Histona H3 tri-metil K27 de camundongo (*Abcam*) (diluição 1:1000) Como normalizador entre as amostras foi utilizado anticorpo Anti-Histona H3 não modificada de camundongo (*Abcam)* (diluição 1:1000). As amostras de extrato de histonas de vermes adultos (10 µg) foram submetidas a eletroforese em SDS-PAGE 15 % e transferidas para membrana de nitrocelulose em equipamento *Semi-dry Transfer* (*GE*) segundo recomendações do fabricante. As membranas foram bloqueadas com leite desnatado diluído em tampão TBS (Tween 20 0,05 %, NaCl 0,15 M e Tampão Fosfato 0,05 M) por 1 hora com agitação constante à temperatura ambiente. A membrana foi incubada *overnight* a 4°C com anticorpo primário anti-histona modificada e em seguida lavada com tampão TBS 4 vezes. O anticorpo secundário anti-coelho conjugado com o marcador fluorescente IRDye 800CW (*Licor*) ou anti-camundongo conjugado com o marcador fluorescente IRDye 700CW (*Licor)* foi incubado por 1 hora com tampão de bloqueio, evitando ligações inespecíficas, e novamente a membrana foi lavada por 4 vezes para então ser lida no *scanner* Odyssey® (*Licor*) em comprimento de onda correspondente à emissão do marcador fluorescente ligado ao anticorpo secundário utilizado, e a intensidade da luz emitida foi quantificada pelo próprio programa do equipamento.

3.5 Atualização da anotação dos genes da plataforma 4x180k

METODOLOGIA

A plataforma de *microarray* foi desenhada em nosso grupo para que fosse possível detectar todos os transcritos do parasita, cada um representado por uma sonda de oligonucletídeo de 60 bases, sendo todas as sondas depositadas em um *slide* que permite 180 mil sondas por *array*; os *slides* foram construídos sob encomenda pela *Agilent Technologies*. Após a publicação da primeira versão da sequência do genoma de *S. mansoni* em 2009 (Berriman, Haas et al. 2009) foram realizadas melhorias de predições gênicas, com a publicação da versão ASM23792v2 do genoma de *S. mansoni* (Protasio, Tsai et al. 2012), o que gerou a necessidade de atualização da anotação das sondas depositadas no *microarray*. A versão ASM23792v2 do genoma contendo a predição de sequência de 11790 genes foi obtida do Banco de Dados *Ensembl* (http://metazoa.ensembl.org/Schistosoma_mansoni/Info/Index) e foi utilizada a ferramenta local BlastN para a busca de sondas que correspondam aos transcritos dos genes, utilizando o critério de identidade de bases maior que 55 nucleotídeos para o total de 60 bases da sonda. Com isso foram anotadas 37501 sondas que detectam 8947 genes de *S. mansoni* (uma média de 4,2 sondas por gene). Além disso, há 22041 sondas que detectam possíveis transcritos antisenso de 8674 genes.

Outra anotação importante para o uso da plataforma em análises posteriores foi a busca de ortólogos dos genes de *S. mansoni* entre os genes humanos. Para isso, foi utilizada a sequência da proteína predita do parasita em busca com BlastP contra proteínas humanas, e com os critérios de cobertura mínima de 20 %, identidade mínima de 40 %, *e–value* $\leq 10^{-5}$ foi possível relacionar cada um de 5744 genes de *S. mansoni* com um putativo ortólogo RefSeq humano que serve de entrada no programa *Ingenuity Pathway Analysis*.

Para analisar proteínas de *S. mansoni* que possuem domínios de leitura das marcas de histonas (*histone readers*), utilizamos os dados de conservação de domínios disponíveis no *Conserved Domains Database (NCBI)* para a busca e anotação de domínios proteicos das *histone readers* que reconhecem marcas de histonas acetiladas e metiladas, por exemplo. Estes

domínios e seus motivos em várias espécies estão descritos em (Yun, Wu et al. 2011) e listados na tabela 1. Para esta busca utilizamos o algoritmo BlastP contra todos os genes de *S. mansoni* codificadores de proteínas (10772) presentes na versão ASM23792v2 do *Ensembl database*, e como critério para busca de domínio exigimos que o *e-value* fosse menor que 10^{-10}. O resultado da busca está mostrado na sessão Resultados, mais abaixo.

Tabela 1: Domínios das *histone readers* com as MPT de histonas reconhecidas

Domínios das *histone readers*	**Modificações Pós-Transcricionais de histonas reconhecidas pela *histone reader***
Ankyrin	H3K9me2, H3K9me1
Cromodomain	H3K9me3, H3K9me2, H3K27me3, H3K27me2
MBT	H3Kme1, H3Kme2, H4me1, H4Kme2
PHD	H3K4me3, H3K4me2, H3K9me3, H3un
PWWP	H3K36me3, H4K20me1, H4K20me3, H3K79me3
Tudor	H3K36me3, H3Rme2, H4Rme2
WD40	H3K9me2, H3K27me3, H3R2me2, H3un
zf-CW	H3K4me3
Bromodomain	H3Kac, H4Kac, H2AKac, H2BKac
14-3-3	H3S10ph, H3S28ph
BRCT	H2AXS139ph

3.6 Perfil de expressão gênica em *microarray* 4x180k

Para realizar o experimento de análise de expressão gênica foram utilizados esquistossômulos tratados com 1 µM de TSA ou com o veículo da droga (etanol) como controle. Após cada tempo de tratamento (12, 24, 48 e 72 horas) os esquistossômulos foram coletados e

armazenados em *RNA later* (*Ambion*). O RNA total foi extraído e tratado com DNAse I utilizando-se o *RNA easy mini Kit* (*Qiagen*) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram quantificadas no espectrofotômetro NanoDrop (*Thermo Scientific*) e a integridade das amostras de RNA foi avaliada utilizando eletroforese capilar em Bioanalyzer (*Agilent Technologies*). Para as reações de amplificação e marcação de RNA utilizamos o *Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent)* com 100 ng de RNA total para cada réplica (Tabela 2). Para cada réplica biológica (RB) produzimos duas réplicas técnicas com inversão dos fluoróforos Cy3 e Cy5. Para a hibridização, seguimos as recomendações do fabricante, e utilizamos a plataforma de oligoarray 4X180k desenhada por nosso grupo e produzida sob encomenda pela *Agilent Technologies.*

Tabela 2: Amostras hibridizadas no *microarray* de *S. mansoni* de 4x180k. Distribuição das amostras em experimento de três réplicas biológicas (RB) de esquistossômulos tratados com TSA ou Etanol, com RNA marcado com os fluoróforos Cy3 e Cy5, e hibridizado com método de duas cores para medida de expressão gênica.

	Array 1	**Array 2**	**Array 3**	**Array 4**
Lâmina 1	TSA 12h RB1 - Cy3	TSA 12h RB1 - Cy5	TSA 12h RB2 - Cy3	TSA 12h RB2 - Cy5
	Etanol 12h RB1 -Cy5	Etanol 12h RB1 -Cy3	Etanol 12h RB2 -Cy5	Etanol 12h RB2 -Cy3
Lâmina 2	TSA 24h RB1 - Cy3	TSA 24h RB1 - Cy5	TSA 24h RB2 - Cy3	TSA 24h RB2 - Cy5
	Etanol 24h RB1 -Cy5	Etanol 24h RB1 -Cy3	Etanol 24h RB2 -Cy5	Etanol 24h RB2 -Cy3
Lâmina 3	TSA 12h RB3 - Cy3	TSA 12h RB3 - Cy5	TSA 24h RB3 - Cy3	TSA 24h RB3 - Cy5
	Etanol 12h RB3 -Cy5	Etanol 12h RB3 -Cy3	Etanol 24h RB3 -Cy5	Etanol 24h RB3 -Cy3
Lâmina 4	TSA 48h RB1 - Cy3	TSA 48h RB1 - Cy5	TSA 48h RB2 - Cy3	TSA 48h RB2 - Cy5
	Etanol 48h RB1 -Cy5	Etanol 48h RB1 -Cy3	Etanol 48h RB2 -Cy5	Etanol 48h RB2 -Cy3
Lâmina 5	TSA 72h RB1 - Cy3	TSA 72h RB1 - Cy5	TSA 72h RB2 - Cy3	TSA 72h RB2 - Cy5
	Etanol 72h RB1 -Cy5	Etanol 72h RB1 -Cy3	Etanol 72h RB2 -Cy5	Etanol 72h RB2 -Cy3
Lâmina 6	TSA 48h RB3 - Cy3	TSA 48h RB3 - Cy5	TSA 72h RB3 - Cy3	TSA 72h RB3 - Cy5
	Etanol 48h RB3 -Cy5	Etanol 48h RB3 -Cy3	Etanol 72h RB3 -Cy5	Etanol 72h RB3 -Cy3

Para análise dos dados, foi realizada uma filtragem inicial das sondas com sinal de baixa intensidade, de acordo com os critérios do *software Feature Extraction* (*Agilent*) que avalia os *spots* que estão com intensidade acima do sinal de *background* do *array*. Após a exclusão dos controles positivos e negativos da lâmina (aproximadamente 35 mil sondas), os dados restantes foram normalizados com a média aparada de 40 % (20 % da porção superior e 20 % da porção inferior dos dados), e em seguida foi calculada a razão Log_2 entre as intensidades das amostras TSA/Etanol de cada gene em cada *array*. A partir destes dados foi possível usar o teste estatístico *Significance Analysis of Microarray (SAM)* (Tusher, Tibshirani et al. 2001) para identificar genes diferencialmente expressos com q-value $\leq 0{,}05$. Para os genes que estavam representados no *microarray* com múltiplas sondas ao longo do gene, foi usada a média de intensidade entre todas as sondas que correspondem ao transcrito (como indicado na tabela suplementar) para representar a intensidade da expressão do gene.

A análise de ontologia gênica (GO) foi realizada utilizando os termos associados aos genes presentes no banco de dados Biomart (Ensembl), com um total de 6165 genes. Para calcular o enriquecimento foi utilizado o programa Ontologizer (Bauer, Grossmann et al. 2008) aplicando o teste *Parent-Child* com correção para testes múltiplos pelo método de *Benjamini-Hochberg* (Oliveira, Carvalho et al. 2009). Com a ferramenta *Ingenuity Pathway Analysis (*IPA), e considerando 5744 genes de *S. mansoni* como possíveis homólogos dos correspondentes genes humanos, foram realizadas análises de interações entre moléculas; o IPA é um banco curado de dados da literatura sobre a função e a interação de genes nos modelos humano, de camundongo e de rato.

3.7 Validação de genes diferencialmente expressos

Com os dados de expressão diferencial de genes de esquistossômulos tratados com TSA por 12, 24, 48 e 72 horas, medidos nos *microarrays*, foram selecionados genes induzidos e reprimidos para validação por PCR em tempo real. Para isso foi realizada a reação de

transcrição reversa com 100 ng de RNA total e *primer* 6-mer randômico com o kit SuperScriptIII (*Invitrogen*) seguindo as recomendações do fabricante. Para a reação de PCR foi utilizado 0,625 µl da reação de transcrição reversa e o *Power SYBR Green Master Mix* (*Life Technologies*), com condições padrão. O programa *Primer3* foi utilizado para o desenho do par de *primers* da PCR, exigindo-se que cada um dos *primers* do par estivesse localizado no último e penúltimo éxons do gene em questão, ou ao menos em éxons diferentes (Tabela 3). Os dados foram analisados com o método comparativo por delta-Ct (*Cycle threshold*), e o teste-*t* foi utilizado para calcular a significância da mudança do nível de expressão de um gene entre a amostra com inibidor e o controle. O gene PSMD Smp_000740 (26s proteasome non-ATPase regulatory subunit 4) de *S. mansoni* foi utilizado como gene normalizador.

Tabela 3: Lista de *primers* utilizados na validação por RT-qPCR de genes diferencialmente expressos

Gene		Sequência de nucleotídeo
Smp_174840	CBX5_RT_F	CAGGCGTTTCCTTGATAAGC
	CBX5_RT_R	CAGGTGCTAGACCACGATCA
Smp_077180	Chk1_RT_F	AGGTCATTCGAGCTGTCGTT
	Chk1_RT_R	TCCTGGATGCTCTGGAGTTT
Smp_165220	EED_RT_F	TTAATTACCGCTCACGTTCG
	EED_RT_R	ACGGGCACAGTCCACATAAT
Smp_197050	TyrK_RT_F	TTCACGATTGATTGGGAACA
	TyrK_RT_R	TCACCTACCATCAGTGTATTTTCG
Smp_078900	EZH2_RT_F	CGAGATTTTGTTGTGGATGC
	EZH2_RT_R	CGATGATCACCATTCACCAT
Smp_130760	HistK_RT_F	TGCATTTTAGAATCTGCTGTCAA
	HistK_RT_R	AGAGATAGGCTTTCGCCAATA
Smp_160700	SET_RT_F	TCTGGTCGAGAGGAATTTGAA
	SET_RT_R	CATGATGCCAAGCTGATTGT
Smp_154950	SGPL_RT_F	TGTGCAGAACGATTTATTCAAGA
	SGPL_RT_R	CGATCCGGTATCATTTGAGAT
Smp_084140	Sirt2_RT_F	ATTTTGGTCGGGTAATGCTG
	Sirt2_RT_R	AGCGAGAGTCCGTTTCCTTT

Smp_049520	WD40_RT_F	CAGCATCCACTGATTGTTCTG
	WD40_RT_R	GGACTATAACGAGCGCACCA
Smp_194900	WD-repeat_RT_F	CCTTGAATTCTGGACCGATG
	WD-repeat_RT_R	TCATACATCGATTGCCCAAA
Smp_000740	PSMD_RT_F	GCATGCGTCAAGAACATGAG
	PSMD_RT_F	GCATGCGTCAAGAACATGAG

3.8 Imunoprecipitação de cromatina com anticorpos anti-histonas modificadas

Para buscar se os genes diferencialmente expressos identificados por *microarrays* são regulados por acetilação e metilação de histonas, foi realizado ChIP-qPCR analisando o enriquecimento de histonas acetiladas ligadas ao DNA da região promotora dos genes em questão, em esquistossômulos tratados com TSA 1µM por 12 horas. Foi utilizado o método de Caby e Pierce para o *cross-linking* de proteínas-DNA com formaldeído 1 % e lise de esquistossômulos (Caby and Pierce 2009). Para a quebra da cromatina em fragmentos de 100 – 1000 pares de bases foi aplicada ultrassonicação com o equipamento *EpiShear (Active Motif)* com amplitude de 20 % em 10 pulsos de 30 segundos e intervalos de 1 minuto. Após sonicar a amostra foi utilizado o protocolo de *Magna ChIP Chromatin Immunoprecipitation kit (Millipore)* com os seguintes anticorpos para a imunoprecipitação: Anti-Histone H3 (*Abcam*), Anti-Histone H3Lys9acetyl (*Abcam*), Anti-Histone H3Lys14acetyl (*Abcam*), Anti-Histone H3 (tri-methyl Lys4) (*Abcam*), Anti-Histone H3 (tri-methyl Lys27) (*Abcam*). Como controles negativos utilizamos IgG de camundongo e coelho não imunizados. Os *primers* foram desenhados tendo como alvo a região genômica próxima ao início da sequência codificadora do gene investigado (cerca de 400 bp acima do início da sequência codificadora), pois em *Schistosoma* a região promotora dos genes ainda não é bem caracterizada (Tabela 4). Como normalizador foi utilizado o gene Val19 Smp_123090 (não detectado como expresso nos *microarrays*). Esta abordagem foi baseada em artigo com ChIP-qPCR para promotor do gene mucina de *S. mansoni* (Perrin, Lepesant et al. 2013). Excepcionalmente para o gene CBX5

Smp_174840 foram desenhados *primers* no início da sequência codificadora, pois a região *upstream* é repetitiva e portanto não é possível amplificar com precisão esta sequência.

Tabela 4: Lista de *primers* utilizados para detecção de região promotora de genes diferencialmente expressos por ChIP-qPCR.

Gene		Sequência de nucleotídeo
Smp_174840	CBX5_ChIP_F	GGAAGTGATGCGATTGAACC
	CBX5_ChIP_R	CCTGGTGAATAACAACCAAAGTC
Smp_077180	Chk1_ChIP_F	AATGAAGCCCACTGAAGTTTG
	Chk1_ChIP_R	CCAGGGTAGTCTTAAAACTGTTCAA
Smp_165220	EED_ChIP_F	TTTGTTTATTGTCGAACCTTGG
	EED_ChIP_R	AGAATTGCTGGAATGCTACAAA
Smp_197050	TyrK_ChIP_F	TGCTGTTTAACTGACGTTGGA
	TyrK_ChIP_R	AAAGTGACCAAGCGAGAGGA
Smp_130760	HistK_ChIP_F	TCGAGACAAATTTGCTGACAAT
	HistK_ChIP_R	TGAAATTGACCATCCAGATCC
Smp_154950	SGPL_ChIP_F	CGCATGCATCTTTATCTCCA
	SGPL_ChIP_R	CCTCTGGACAAATCCATTGC
Smp_123090	Val19_ChIP_F	TCACAGAATGATTTCCTATGATTGA
	Val19_ChIP_R	AAGACGTAGTTCCCTAATACTTTACAA
Smp_049520	WD40_ChIP_F	TTCAGTCAACGAGCTTAGGTCA
	WD40_ChIP_R	CATTAGGCACGTAAGGAGTTGAG
Smp_194900	WD-repeat_ChIP_F	GGCAAACTCTCCATGCAAAT
	WD-repeat_ChIP_R	AAACTTGCGCGGTATCCAT

3.9 Ensaio de efeito sinérgico entre inibidor de HDAC e inibidor de EZH2

Para os ensaios *in vitro* de mortalidade de esquistossômulos foi realizado cultivo com a metodologia já descrita na seção 3.2. Esquistossômulos foram distribuídos em placa de cultura de 24 poços, cada poço contendo 1 mL de meio M169 e aproximadamente 200 a 300 parasitas por poço. Seis condições foram testadas: DMSO 1 % com Etanol 0,6 % (controle); TSA 1 µM; GSK343 20 µM; TSA 10 µM; TSA 1 µM + GSK343 20 µM; GSK343 50 µM, sendo que para

cada condição foram preparados quatro poços. Para quantificar o número de esquistossômulos mortos foi adicionado, somente nos poços a serem analisados, 1 µg/mL de Iodeto de Propídeo por poço no momento da observação da fluorescência. Com microscópio de fluorescência com filtro *rhodamine* (536 nm) os parasitas em vermelho são considerados mortos, e para contar todos os parasitas no poço foi utilizada microscopia de campo claro, assim estimando a porcentagem de mortalidade (Peak, Chalmers et al. 2010).

3.10 Modelagem do domínio SET de EZH2 e acoplamento de GSK343

A enzima EZH2 possui atividade catalítica de trimetilação de histona no seu domínio SET, o qual é alvo de drogas inibidoras. A sequência de EZH2 Smp_078900 de *S. mansoni* possui o total de 1026 aminoácidos, e a porção correspondente ao domínio SET foi utilizada para a modelagem de sua estrutura atômica por homologia. Para isso buscamos no banco de dados RCSB PDB (*Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank*) (Berman, Westbrook et al. 2000) as estruturas do domínio SET já existente, visto que a proteína inteira ainda não foi cristalizada. Foram encontradas duas estruturas modelo, 4MI0 e 4MI5, do domínio SET de EZH2 humana, com 70 % de identidade com a SmEZH2, alinhando do aminoácido 746 ao 978 da SmEZH2. Nota-se que o domínio SET (CDD:smart00317) consenso se localiza entre os aminoácidos 859 e 975 na SmEZH2, utilizando o alinhamento do *Conserved-Domain Database CDD* (Marchler-Bauer, Derbyshire et al. 2015). O alinhamento dos modelos com a SmEZH2 utilizando a ferramenta EMBOSS Needle (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/), mostrou uma identidade de 63,8 % e 64,9 % com cobertura de 90,9 % e 91,8 % para 4MI0 e 4MI5 respectivamente.

Foi realizada a sobreposição das estruturas entre os modelos selecionados 4MI0 e 4MI5 utilizando o programa UCSF Chimera (Pettersen, Goddard et al. 2004) com a ferramenta MatchMaker tool e aplicando o método Needleman-Wunsch. Usando este alinhamento dos 2

modelos como molde, a sequência do domínio SET de SmEZH2 foi alinhada com Clustal Omega no UCSF Chimera.

Para gerar o modelo virtual de SmEZH2 foi utilizado o *Modeller* 9v10 (Webb and Sali 2014) empregando-se o alinhamento múltiplo dos modelos com SmEZH2; e entre os vinte modelos gerados foi selecionado o com menor DOPE-score (zDOPE, *Z-score of Discrete Optimized Protein Energy*) normalizado. Este modelo foi analisado pelos programas *Molprobity* (Chen, Arendall et al. 2010), e *ERRAT* (Colovos and Yeates 1993). Para aperfeiçoar o modelo predito, foram realizadas correções de cadeia lateral de aminoácidos com o programa *SCWRL4*.0 (Krivov, Shapovalov et al. 2009), e refinamento de minimização de energia com *KobaMIN* (Rodrigues, Levitt et al. 2012). Este modelo final foi comparado com os dois modelos utilizados.

Para o acoplamento de GSK343 com SmEZH2, foram identificados quais resíduos do domínio SET da hEZH2 interagem com o cofator SAM. Assim, foram identificados os mesmos aminoácidos em SmEZH2, delimitando a região da proteína para as simulações de acoplamento com GSK343 e SAM, limitando uma caixa de 30x30x30 Å. As estruturas 3D dos ligantes GSK343 (CID: 71268957) e SAM cofactor (CID: 34756) foram obtidas do banco PubChem. Com o programa AutoDock Vina (Trott and Olson 2010) foram geradas 10 simulações (cada uma com 20 simulações de modos de acoplamento) para a máxima exaustão, com os três modelos acoplados a GSK343 e SAM. O menor valor de energia livre predita de cada uma das 10 simulações foi utilizado para calcular a média e desvio padrão das simulações de acoplamento.

4. Resultados

4.1 Análise *in silico* de histonas de *S. mansoni*

As histonas são as principais proteínas componentes da cromatina, sendo um dos eixos principais da regulação da transcrição. Realizamos a busca no genoma dos genes codificadores destas proteínas em *S. mansoni,* bem como fizemos a catalogação de quais genes pertencem a quais famílias de histonas. No genoma do parasita (Berriman, Haas et al. 2009) foram preditos 29 genes de histonas. Com o alinhamento destas predições contra o banco público de ESTs, foi possível detectar que 21 predições gênicas têm evidencia de transcrição, e que curiosamente dois genes com códigos distintos são posicionados no mesmo locus gênico, indicando erro na anotação de predições (Tabela 5) (Anderson, Pierce et al. 2012).

Predições gênicas sem evidência de transcrição foram investigadas individualmente, e três não apresentaram domínio completo de histona. O gene Sm_123850 apresentou similaridade com a histona humana H2A.J, porém com uma cobertura de 33 %. Já o gene Smp_130880 também apresentou similaridade com a histona H2A.J mas somente 25 % de sua sequência cobrindo 50 % da sequência humana. Outro gene sem evidência de transcrição foi a Smp_026880, cobrindo somente 34 % da histona H3.I humana. Estes baixos valores de cobertura não são esperados, pois as histonas são proteínas altamente conservadas entre as espécies, sendo portanto um indício de erro na predição gênica.

Tabela 5: Genes de histonas em *S. mansoni* com seus respectivos ortólogos.
Os genes indicados com ([1]) são Smps preditas que se sobrepõem na mesma coordenada genômica; genes indicados com (*) não possuem evidencia de transcrição no banco de ESTs; genes indicados com (**) foram corrigidos em relação à predição e representados na Figura 3.

Histona H1							
Histona de *S. mansoni*	**Histona ortóloga humana**	**Código da histona humana**	**Cobertura (%)**	**E-value**	**Identidade (%)**	**Sm aa**	**Sm massa molecular**
Smp_162370	H1.0	NP_005309.1	42	1.00E-11	45	169	18025
Histona H2A							

Histona de *S. mansoni*	Histona ortóloga humana	Código da histona humana	Cobertura (%)	E-value	Identidade (%)	Sm aa	Sm massa molecular
Smp_060760	H2A.2-B	NP_778235.1	97	2.00E-72	85	125	13441
Smp_082750	H2A.J	NP_808760.1	64	6.00E-46	83	97	10878
Smp_086860	H2A.X	NP_002096	85	4.00E-67	81	134	14576
Smp_089870	H2A.J	NP_808760.1	98	1.00E-80	92	125	13441
Smp_089840	H2A.2-B	NP_778235.1	97	2.00E-81	92	125	13441
Smp_031720	H2A.2-C	NP_003508.1	93	5.00E-42	55	156	16512
Smp_176670**	H2A.J	NP_066544.1	68	2.00E-43	79	87	9366
Smp_035980**	H2A.Z	NP_002097.1	95	9.00E-83	96	131	13863
Smp_123850*	H2A.J	NP_808760.1	33	4.00E-18	79	87	9895
Smp_130880*	H2A.J	NP_066544.1	50	1.00E-31	83	232	25623
Smp_056420*	H2A.J	NP_808760.1	66	2.00E-38	74	77	8443

Histona H2B

Histona de *S. mansoni*	Histona ortóloga humana	Código da histona humana	Cobertura (%)	E-value	Identidade (%)	Sm aa	Sm massa molecular
Smp_036220	H2B.1-O	NP_003518.2	100	2.00E-66	78	122	13574
Smp_121380[1]	H2B.2-F	NP_001019770.1	100	3.00E-65	75	122	13574
Smp_108390[1]	H2B.2-F	NP_001019770.1	100	3.00E-65	75	122	13574

Histona H3

Histona de *S. mansoni*	Histona ortóloga humana	Código da histona humana	Cobertura (%)	E-value	Identidade (%)	Sm aa	Sm massa molecular
Smp_082240	H3.3A	NP_002098.1	100	1.00E-98	99	136	15343
Smp_089860	H3C	NP_066403.2	100	3.00E-98	99	136	15343
Smp_074610	H3C	NP_066403.2	100	3.00E-98	99	136	15343
Smp_177140	H3I	AAH66884.1	60	3.00E-49	93	93	10350
Smp_026880*	H3I	AAH66884.1	34	2.00E-24	89	87	9572

Histona H4

Histona de *S. mansoni*	Histona ortóloga humana	Código da histona humana	Cobertura (%)	E-value	Identidade (%)	Sm aa	Sm massa molecular
Smp_053300	H4.A	NP_003529.1	100	9.00E-71	100	103	11367
Smp_053290	H4.A	NP_003529.1	100	9.00E-71	100	103	11367
Smp_194870	H4.A	NP_003529.1	100	9.00E-71	100	103	11367
Smp_053390	H4.A	NP_003529.1	100	9.00E-71	100	103	11367
Smp_149600**	H4.A	NP_003529.1	83	5.00E-50	90	103	11322

Outra característica encontrada nas predições gênicas foi a alta massa molecular resultante da tradução da predição gênica de certas histonas de *S. mansoni*, um valor muito divergente da massa de histonas de eucariotos. Três genes apresentaram esta divergência não esperada, e por codificarem proteínas com uma quantidade de aminoácidos muito acima do esperado, estas proteínas gerariam uma estrutura não estável no interior dos nucleossomos. Com isso, utilizamos ESTs e a sequência genômica para averiguar a predição gênica e realizar curagem manual. A primeira predição gênica que corrigimos foi a da Smp_149600, codificadora da histona H4, que na anotação do genoma possui três éxons e codifica uma proteína com massa molecular predita de 23,64 kDa, sendo que o esperado para esta histona é 11 kDa. Observamos que os 94 aminoácidos codificados no terceiro éxon possuem alta similaridade com outras espécies, havendo a falta de 8 aminoácidos iniciais na porção amino-terminal, que não estavam presentes no primeiro e segundo éxons. A sequência do genoma aponta para estes aminoácidos faltantes (27 pares de bases) codificados imediatamente *upstream* ao terceiro éxon, com a identificação do códon inicial ATG, formando um gene monoexônico, assim como em outras espécies. Esta curagem manual da histona H4 resultou em uma nova sequência do gene que agora se traduz em uma proteína com 11,06 kDa (Figura 3A). Esta análise foi realizada com a versão do genoma anterior à publicação da versão de Protasio e colaboradores (Protasio, Tsai et al. 2012), na qual o locus genômico da Smp_149600 estava no *Scaffold* 130. Com a atualização do genoma, houve a reorganização e montagem de *scaffolds* maiores, e com isso este *scaffold* foi renumerado para *Scaffold* 49.

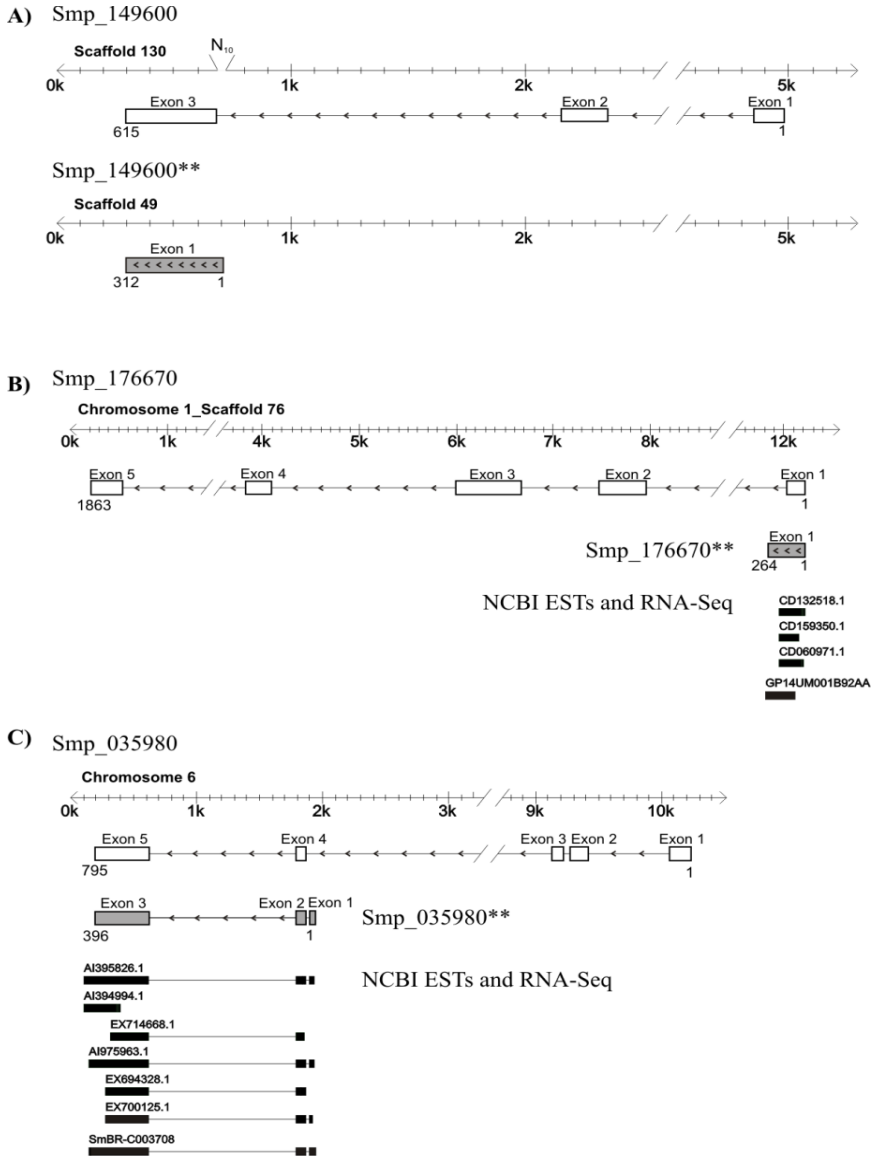

Figura 3: Predições gênicas de genes de histonas de *S. mansoni* corrigidas com análise *in silico*. Predições gênicas de A) Histona H4 Smp_149600, B) Histona H2A Smp_176670 e C) Histona H2A.Z Smp_035980 corrigidas por curagem manual, utilizando sequência genômica, ESTs do NCBI e dados de RNA-Seq. A figura mostra a localização genômica do gene (caixas brancas) e a arquitetura da predição gênica corrigida (caixas cinzas). Os transcritos usados nos alinhamentos estão representados em preto. Os números abaixo dos genes (primeiro e último éxon) representam o primeiro e último nucleotídeo da sequência.

A segunda predição gênica corrigida manualmente foi a histona H2A Smp_176670, que apresentava 5 éxons com massa molecular predita de 69,9 kDa, sabendo-se que esta família de histona apresenta massa de aproximadamente 13 kDa (Figura 3B). O alinhamento com ESTs apontou para a transcrição somente do primeiro éxon, com isso foi possível usar o programa de montagem CAP3 e refazer o início do gene, alongando o primeiro éxon que possuía o domínio

de histona, formando um gene monoexônico, codificador de 87 aminoácidos. Porém esta proteína predita de 9,4 kDa ainda possui uma massa divergente do esperado para outras histonas H2A, indicando que esta correção pode não ser a mais adequada.

Também foi corrigida outra sequência, a da histona H2A Smp_035980, que inicialmente apresentava cinco éxons com massa molecular predita de 29,16 kDa (Figura 3C). Utilizando o alinhamento com ESTs, foi possível detectar que a transcrição se inicia no terceiro intron com a inclusão de um novo éxon inicial, pois não há evidencia de transcrição para os três primeiros éxons da predição. Assim o gene Smp_035980 corrigido possui três éxons (incluindo o novo primeiro éxon), codificando 131 aminoácidos com massa predita de 13,9 kDa. Esta presença de intron não é comum entre genes codificadores de histonas em eucariotos (Yun and Nishida 2011), estando presente somente em algumas variantes, como é o caso desta histona que tem motivo conservado de H2A.Z.

Os RNA mensageiros (mRNAs) de histonas canônicas não possuem cauda poli-A na porção 3´, porém possuem uma estrutura *stem-loop* seguida de sequência enriquecida em purina, conhecida como 3´-*hairpin*, importante no processo de tradução. Utilizamos o programa de predição *Infernal* para realizar buscas nas sequências dos genes de histonas, empregando como motivo da busca o modelo de *stem-loop* de histonas depositado do banco de dados Rfam. Desta forma foi possível obter a predição desta estrutura secundária para o RNA de 10 genes de histonas, e gerar um modelo de motivo conservado de sequência para o *S. mansoni*. Além disso, a proteína SLBP (Stem-loop binding protein) Smp_137390 foi identificada no parasita, com os aminoácidos conservados responsáveis por reconhecer o 3´-*hairpin* no mRNA de histona (*RNA Binding Domain* – RBD) (Battle and Doudna 2001) (Figura 4).

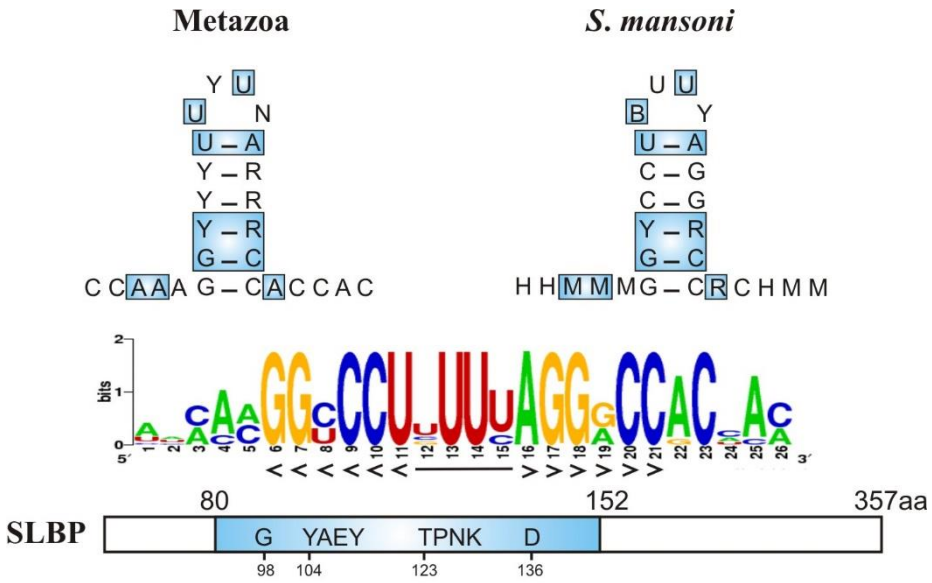

Figura 4: 3´-*hairpin* de mRNA de histona em *S. mansoni*. Representação esquemática da sequência consenso do 3´-*hairpin* em metazoários e em *S. mansoni* encontrada em 10 genes de histona. A SLBP possui o motivo RBD conservado no parasita, com os aminoácidos que fazem interação com o *stem-loop* indicados na figura. As regiões de interação entre o RNA e a SLBP estão indicadas nas caixas azuis, e as bases conservadas e os aminoácidos conservados estão indicados com abreviação de uma letra. A sequência "logo" mostra a conservação entre os *hairpins* preditos nas sequências dos mRNAs de histonas de *S. mansoni*. Nas sequências dos mRNAs dos esquemas as letras correspondem à: R = A ou G (purina); Y = C ou U (pirimidina); M = A ou C; H = A, C ou U; B = C, G ou T

4.2 Perfil de modificações pós-traducionais em histonas de *S. mansoni* tratado com TSA.

Com o intuito de caracterizar a regulação da cromatina por hiperacetilação das histonas em parasitas tratados com iHDAC, foi padronizada a extração ácida de histonas de vermes adultos, utilizando-se protocolo adaptado (Trelle, Salcedo-Amaya et al. 2009). Esta extração de histonas é necessária para aumentar a eficiência de detecção por anticorpos e permitir uma melhor separação de histonas no gel. O extrato enriquecido de histonas de vermes adultos foi submetido à separação em gel SDS-PAGE 15 %, onde é possível detectar a presença de proteínas entre 10 kDa e 20 kDa (faixa de massa molecular das histonas) (Figura 5), porém ainda permanecem muitas outras proteínas básicas de maior massa neste extrato. Este fato se deve à grande dificuldade de ruptura do verme adulto e separação dos núcleos das células. O

primeiro passo da extração consiste na quebra do tegumento com lise branda e tampão para isolamento de núcleo, porém os vermes adultos de *S. mansoni* possuem tegumento espesso com sincício contendo massa nuclear sem separação por membrana plasmática. Portanto romper o tegumento e retirar somente os núcleos para o passo seguinte de extração ácida não é um estágio com alta eficiência, carreando outras proteínas que foram co-precipitadas com as histonas.

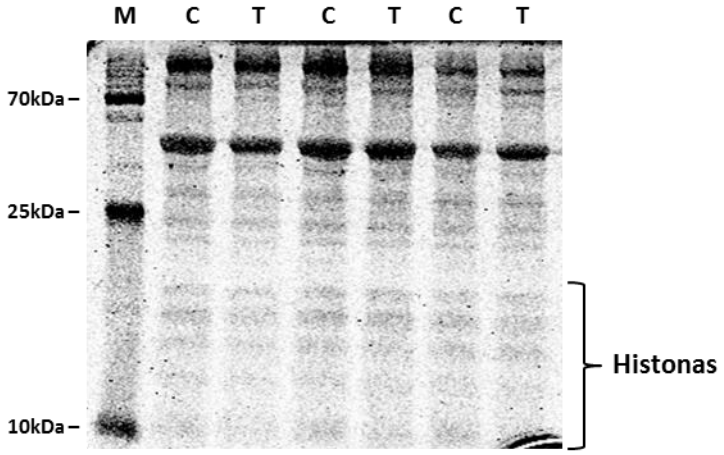

Figura 5: Perfil proteico na padronização de extração de histonas de vermes adultos tratados com iHDAC. Extrato enriquecido de histonas obtido de três réplicas biológicas de vermes adultos tratados (T) com iHDAC ou etanol(C), analisado em SDS-PAGE 15 % corado com coomassie blue. Ao lado do gel está indicada a região em que se encontram as histonas, que possuem massa molecular entre 10 a 20 kDa.

Com as amostras de vermes adultos tradados com iHDAC, foi realizado o experimento de *western blotting* com anticorpos monoclonais específicos para cada modificação pós-traducional (MPT) de histona, para detectar e gerar o perfil de modificações desencadeadas pela droga em *S. mansoni*. Assim, a acetilação foi quantificada em extrato de histonas de vermes adultos tratados por 24 horas com TSA ou veículo da droga (etanol), medindo-se na histona H3 a acetilação em dois aminoácidos distintos K9 e K14, e na histona H4 a acetilação na K5 (Figura 6). Para normalizar as variações inerentes ao experimento, foi utilizado anticorpo que reconhece histona H3 modificada ou não modificada (Figura 6).

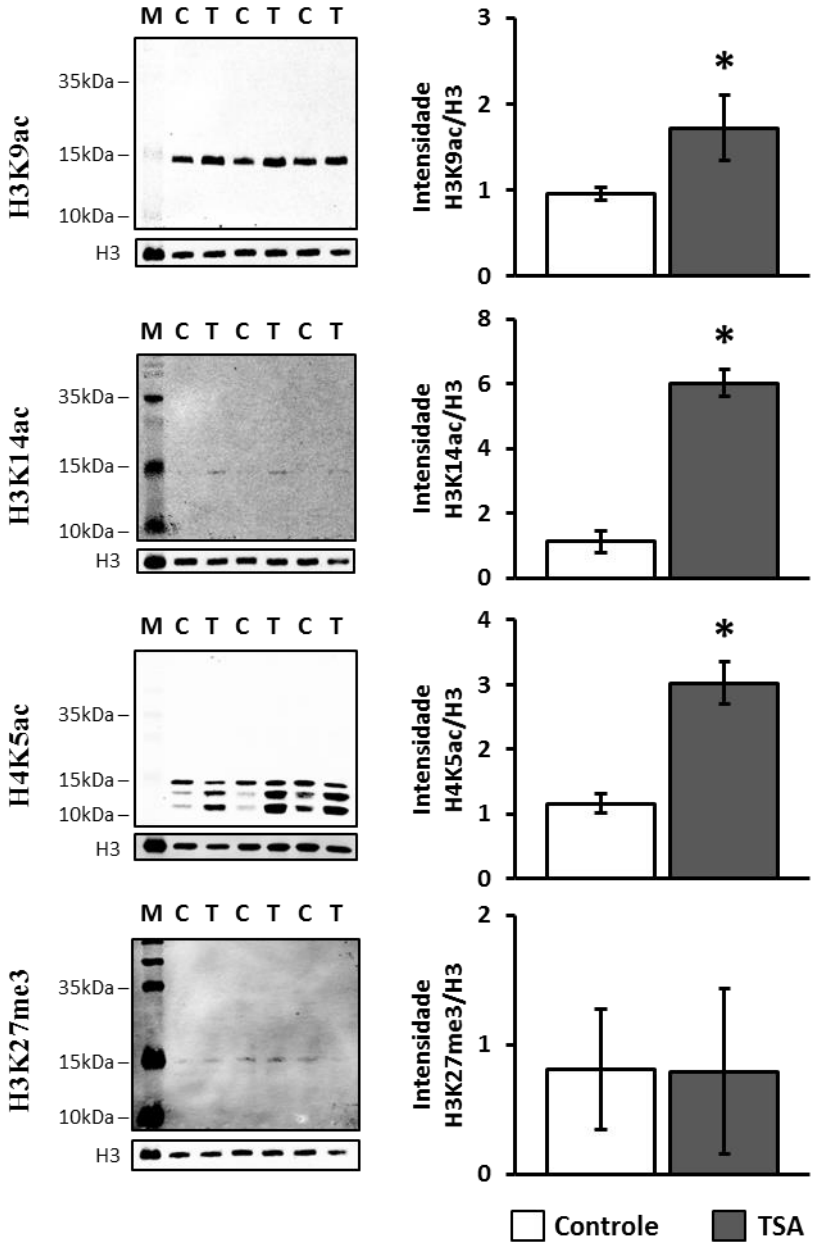

Figura 6: Perfil de modificações pós-traducionais de histonas em vermes adultos tratados com iHDAC. *Western blotting* para H3K9ac, H3K14ac, H3K27me3, H4K5ac e H3 total como normalizador. Extrato de histonas de vermes adultos tratados por 24 horas com 1 µM de TSA (T) ou controle (C), em três réplicas biológicas independentes. Cada modificação de histona analisada foi quantificada com o programa do scanner de membrana *Odyssey*, e normalizado pela quantidade de histona H3 total após reincubação da mesma membrana com o anticorpo Anti-H3. Os gráficos representam as quantificações com a média e desvio padrão entre três replicas biológicas e o teste-t de Student foi aplicado para a análise estatística de significância. Aumento significativo da marca de histona (*p-value* $\leq$ 0,05) está representado com *. O marcador de massa molecular (M) está com as bandas de 10, 15 e 35 kDa indicadas à esquerda.

RESULTADOS

A acetilação de histona H3K9ac apresentou um aumento significativo de 1,7 vezes em relação à amostra controle em três réplicas biológicas. Já a acetilação de H3K14ac, apesar de não apresentar um sinal tão intenso quanto a H3K9ac, apresentou um aumento significativo de 6 vezes em relação ao controle. Apesar de aumentada 6 vezes pelo tratamento com TSA, a marca de H3K14ac apresentou um sinal muito menos intenso do que o de histona H3 total, indicando que uma fração pequena das histonas sofre esta modificação pós-traducional. Pode-se concluir neste experimento que o tratamento de parasitas com iHDAC aumenta a acetilação de ambos resíduos de histonas H3K9ac e H3K14ac.

A análise de acetilação da histona H4K5ac revelou a presença desta MPT em vermes adultos controle, e após o tratamento com o iHDAC houve um aumento de acetilação de 2,5 vezes, sendo a variação estatisticamente significativa. A histona H4 possui massa molecular de aproximadamente 11 kDa, porém é possível observar duas bandas com massas aproximadas de 13 kDa e 15 kDa. A histona H4 também possui sítios de modificação para a ubiquitinação, possivelmente explicando estas bandas com massas maiores que o esperado.

Além de analisar marcas de acetilação em histonas, que desencadeiam o relaxamento da cromatina, foi quantificada a marca de histona H3K27me3 relacionada a condensação da cromatina e repressão da transcrição. Em vermes adultos tratados com iHDAC por 24 horas, foi possível quantificar a mesma quantidade desta marca de repressão em histonas de parasitas sob efeito de TSA ou controle. Assim, com este painel de MPT de histonas, é possível concluir que apesar do aumento da acetilação em histonas, o que afetará a arquitetura da cromatina, não há desencadeamento de um efeito compensatório como aumento de marca de repressão de transcrição.

4.3 Perfil de expressão gênica em larga-escala de esquistossômulos sob efeito de inibidor de HDAC

O remodelamento da cromatina levando a estados de abertura e fechamento é o eixo central epigenético para a regulação da expressão gênica, e as modificações pós-traducionais na cauda N-terminal das histonas estão envolvidas neste processo. A fim de avaliar como o iHDAC altera a transcrição em *S. mansoni*, esquistossômulos foram tratados com 1 µM de TSA por 12 h, 24 h, 48 h e 72 h, e em paralelo os respectivos controles com etanol. Este experimento foi planejado a partir de dados de viabilidade do esquistossômulos, que demostram que 1 µM de TSA desencadeia morte por apoptose em esquistossômulos à partir de 3 dias de tratamento (Dubois, Caby et al. 2009). Assim, estamos medindo a transcrição de parasitas ainda viáveis, antes da morte. O RNA total das amostras foi extraído, purificado, amplificado e marcado com fluoróforos Cy3 e Cy5 de forma que cada réplica biológica (três réplicas) tivesse réplica técnica com inversão dos fluoróforos (*dye-swap)*. As amostras marcadas foram hibridizadas na plataforma de oligoarray 4x180k, e os dados de intensidade das sondas foram extraídos com o programa *Feature Extraction*.

Para a análise, foi realizada a normalização dos dados utilizando média aparada simétrica a 20 %, e consideramos sondas que estivessem expressas em ao menos duas das três réplicas biológicas. O teste estatístico *SAM (Significance Analysis of Microarray)* permitiu encontrar genes diferencialmente expressos com q-value ≤ 0.05 tanto com expressão induzida ou inibida. Com isto foram identificados conjuntos de genes diferencialmente expressos nos diferentes tempos de tratamento, representados na figura 7 e tabela 6. A análise completa dos genes diferencialmente expressos está na tabela suplementar CD em anexo.

Tabela 6: Sumário da análise do transcriptoma em *S. mansoni* tratado com iHDAC em diferentes tempos. Para cada tempo de tratamento foram analisadas três réplicas biológicas (com 2 réplicas técnicas) utilizando a plataforma de *microarray* com sondas para detectar transcritos específicos do parasita.

	12 h	**24 h**	**48 h**	**72 h**
Genes expressos	8198	7916	8090	8204
Genes diferencialmente expressos	3495	3848	4354	142
Genes com expressão induzida	1695	2719	1108	105
Genes com expressão inibida	1800	1129	3246	37
Transcritos antisenso diferencialmente expressos	1506	1376	1559	101
Transcritos antisenso com expressão induzida	1137	1193	963	95
Transcritos antisenso com expressão inibida	369	183	596	6
Porcentagem de genes afetados por TSA	37,76	41,58	47,04	1,53
Genes com domínio leitor de histona com expressão induzida	36	77	20	1
Genes com domínio leitor de histona com expressão inibida	36	11	64	0
Transcrito senso e antisenso expresso	4149	3032	3243	3098
Transcrito senso e antisenso diferencialmente expresso	922	870	862	8
Transcrito senso e antisenso com expressão induzida	635	718	262	4
Transcrito senso e antisenso com expressão inibida	255	104	462	4
Transcrito senso e antisenso com expressão oposta	32	48	138	0

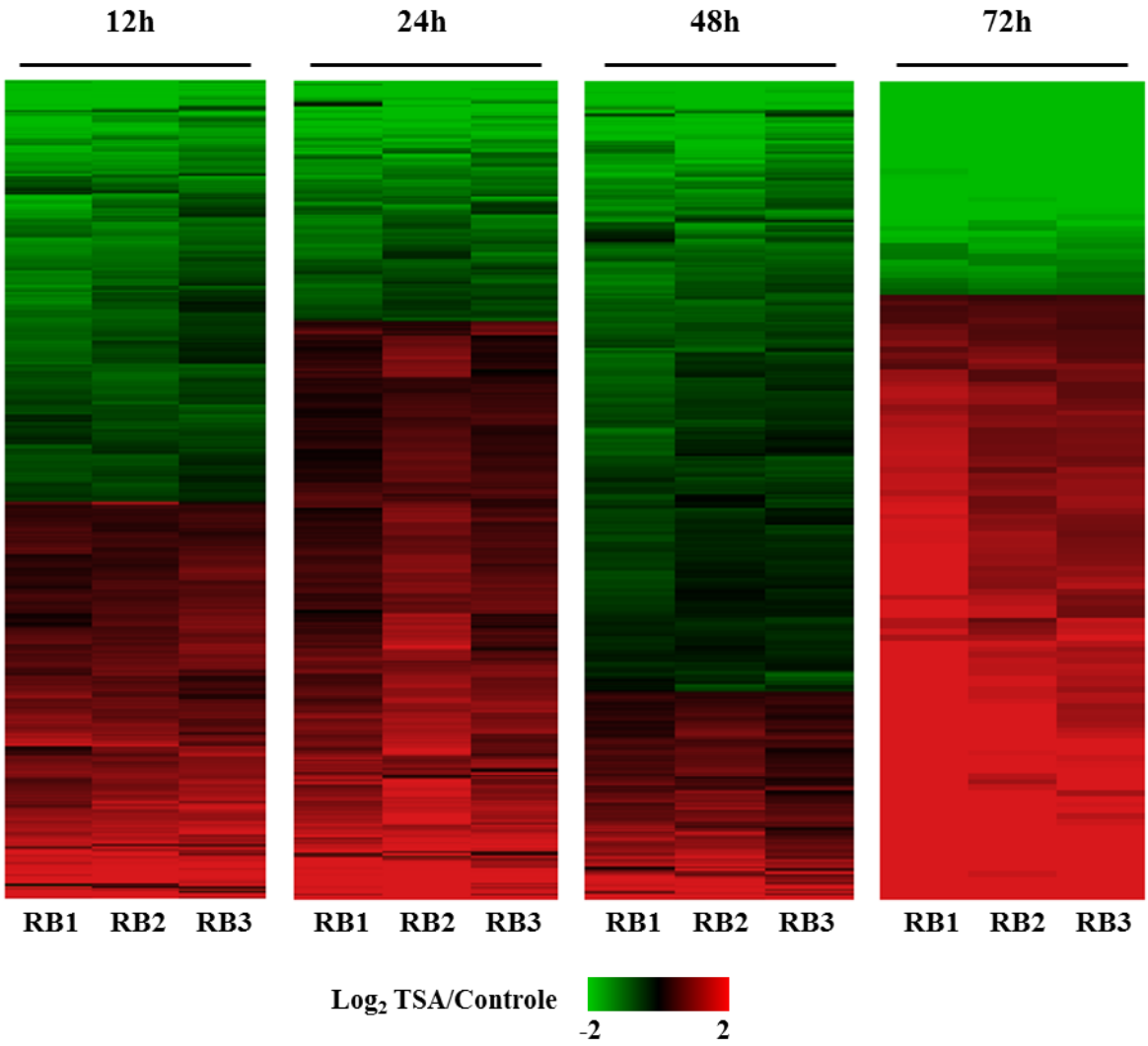

Figura 7: Efeito do inibidor de HDAC Tricostatina A (TSA) no perfil de expressão gênica de esquistossômulos após 12 h, 24 h, 48 h e 72 h de tratamento. Esquistossômulos foram tratados com 1 µM de TSA ou com etanol (controle). Para a medida em larga escala da expressão gênica foi utilizada a técnica de *microarray* em plataforma 4x180K. O gráfico *heat-map* mostra o agrupamento hierárquico de genes com mudança significativa nos níveis de expressão em relação ao controle (*q-value* $\leq$ 0,05) para cada tempo independentemente. Em cada painel independente, cada linha horizontal representa um gene e a coluna representa uma réplica biológica (com a média das duas réplicas técnicas). A intensidade da cor é proporcional ao nível de expressão de cada gene, representado como o Log_2 da razão Tratado TSA/Controle, na faixa de valores indicada na escala na parte inferior da figura; verde indica gene com expressão inibida no tratado e vermelho com expressão induzida no tratado, em relação ao controle. O número de genes diferencialmente expressos representados em cada um destes *heat-maps* está indicado na tabela 6.

A atualização dos dados de anotação do *microarray* permitiu identificar sondas capazes de medir especificamente 9255 transcritos de genes de *S. mansoni*. Não há a representação de

todos os transcritos do parasita por motivos relacionados aos critérios de desenho de sonda feitos pela *Agilent Technologies*. Detectamos também que existem sondas que poderiam medir transcritos de mais de um gene distinto, devido à similaridade de sequência entre estes. Nestes casos estas sondas foram excluídas das análises, aceitando-se somente sondas que medem especificamente o transcrito de um único gene, tornando a análise mais precisa. Com estes mesmos critérios, sondas que medem o transcrito antisenso do gene também foram catalogadas e utilizadas nas análises.

As análises com *microarray* apontaram para um alto número de genes em esquistossômulos que tiveram sua expressão alterada com iHDAC, atingindo 47 % do total de genes medidos. A comparação dos perfis de 12 e 24 horas indica que houve um aumento no número de genes com indução de expressão. Assim, 42 % dos genes expressos em 24 horas sofreram mudança de expressão pelo efeito do TSA, comparado com o controle, sendo que 70 % destes genes alterados tiveram sua expressão aumentada com TSA. Após este tempo de tratamento, o número total de genes alterados aumentou (3848 genes em 24 h e 4354 genes em 48 h), porém somente um quarto destes genes tem expressão induzida, sendo que a maioria dos genes afetados está inibida em 48 h. Deve-se notar que o meio de cultivo foi renovado a cada 24 horas havendo reposição de TSA, ou seja, ao longo de todo o tratamento a droga está presente exercendo efeito no parasita, porém o perfil de expressão gênica em 48 h se mostrou o inverso, comparado aos tempos anteriores de tratamento. O efeito do TSA sobre a mudança no nível de expressão dos genes continuou se alterando, e em 72 horas foram detectados apenas 1,5 % dos genes com expressão modificada pelo iHDAC, sendo que destes, 137 são os mesmos afetados em 48 horas, portanto um efeito mantido ao longo do tempo.

Apesar de haver um alto número de genes diferencialmente expressos nos três primeiros tempos de tratamento, há uma grande quantidade que não está em comum, como é possível observar pelo diagrama de Venn nos tempos 24 h e 48 h (Figura 8). Este dado aponta para uma

regulação singular para cada tempo de tratamento com o iHDAC, mostrando uma regulação independente para parasitas no início do tratamento ainda vivos comparado a parasitas nos tempos tardios onde há início de morte.

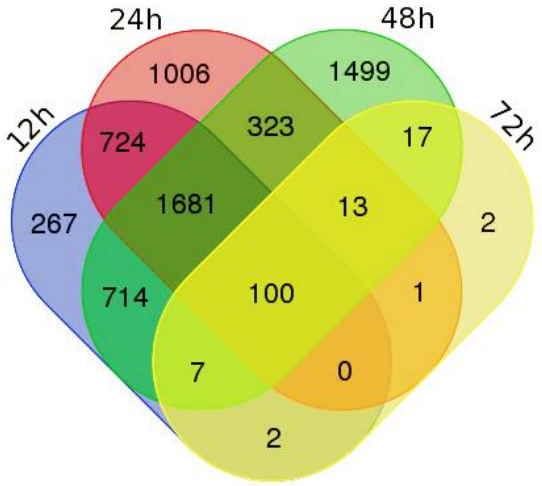

Figura 8: Diagrama de Venn com o total de genes diferencialmente expressos para cada tempo de tratamamento de esquistossômulos sob efeito de iHDAC. Número de genes diferencialmente expressos que se apresentam em comum entre os quatro tempos analisados. Somente 100 genes diferencialmente expressos estão presentes em comum nos quatro tempos de tratamento, e 1681 estão presentes em comum nos três primeiros tempos de tratamento.

Outra característica interessante obtida a partir dos dados de *microarray* foi que houve uma grande detecção de transcritos na fita antisenso a genes preditos (Tabela 6). O método de *microarray* permite a detecção de expressão de RNA fita-específica, e as sondas foram anotadas de acordo com a alta similaridade com a sequência reverso-complementar, da fita oposta ao gene predito. Aproximadamente um quarto dos genes codificadores de proteínas da fita senso, diferencialmente expressos nos três primeiros tempos de tratamento com o iHDAC, apresentaram também o transcrito antisenso diferencialmente expresso com o mesmo padrão temporal.

Os genes codificadores de proteínas diferencialmente expressos com expressão induzida (representados como *UP*) ou inibida (representados como *DOWN*) foram categorizados utilizando ontologias gênicas para cada tempo de tratamento analisado (Tabela 7). Entre as

categorias em comum em diferentes tempos, nota-se a categoria de via de sinalização de receptor de superfície celular (GO:0007166) que está enriquecida nos genes com expressão diminuída após tratamento com iHDAC em 12, 24 e 48 horas. Entre os genes com expressão aumentada, as categorias de catabolismo de ATP (GO:0006200) em 12 horas e ligação à ATP (GO:0005524) em 24 horas aparecem enriquecidas, ambas relacionadas à regulação do nível deste nucleotídeo nas células. Algumas categorias apontam para uma possível regulação da cromatina com genes aumentados relacionados a replicação de DNA (GO:0006260) em 24 e 48 horas, e na categoria do complexo de manutenção de mini-cromossomos (MCM) (GO:0042555) em 48 horas. Em contrapartida, a categoria de genes que formam o nucleossomo (GO:0000786) está enriquecida entre os genes com expressão diminuída em 48 horas. Já em 72 horas, apesar dos poucos genes detectados como diferencialmente expressos, entre os genes com expressão inibida houve enriquecimento da categoria de proteólise (GO:0006508) e atividade de peptidase (GO:0008233).

Tabela 7: Categorias de Ontologia Gênica (GO) enriquecidas entre os genes diferencialmente expressos em esquistossômulos tratados com iHDAC. A subontologia (NSP) à qual cada categoria pertence está representada por C - Componente celular, B - Processo biológico ou M - Função molecular. O *p-value* foi ajustado pelo método Benjamini-Hochberg. A população (Pop.) indica o número total de genes com anotação GO pertencente à categoria, e o DE representa o número de genes diferencialmente expressos encontrados na categoria.

GOs dos genes diferencialmente expressos após 12 horas de tratamento com TSA						
	GO ID	Categoria	NSP	*P-value*	Pop.	DE
Genes UP	GO:0044441	Ciliary part	C	0,0348	6	5
	GO:0006793	Phosphorus metabolic process	B	0,0003	622	164
	GO:0009987	Cellular process	B	0,0004	2161	464
	GO:0006464	Cellular protein modification process	B	0,0042	408	98
	GO:0007165	Signal transduction	B	0,0076	358	89
	GO:0006200	ATP catabolic process	B	0,0127	32	14
	GO:0005524	ATP binding	M	0,0067	581	160
	GO:0072509	Divalent inorganic cation transmembrane transporter activity	M	0,0228	18	10

	GO:0016740	Transferase activity	M	0,0228	779	201
Genes DOWN	GO:0005886	Plasma membrane	C	0,0026	67	32
	GO:0007166	Cell surface receptor signaling pathway	B	0,0105	122	46
	GO:0004872	Receptor activity	M	0,0028	103	43
	GO:0043169	Cation binding	M	0,0128	849	217

GOs dos genes diferencialmente expressos após 24 horas de tratamento com TSA

	GO ID	Categoria	NSP	*P-value*	Pop.	DE
Genes UP	GO:0016772	Transferase activity, transferring phosphorus-containing groups	M	0,0152	454	220
	GO:0005524	ATP binding	M	0,0435	572	267
	GO:0009987	Cellular process	B	0,0024	2116	785
	GO:0006260	DNA replication	B	0,0154	51	33
	GO:0006793	Phosphorus metabolic process	B	0,0187	610	266
Genes DOWN	GO:0007166	Cell surface receptor signaling pathway	B	0,0000	116	45
	GO:0060089	Molecular transducer activity	M	0,0000	114	38
	GO:0016020	Integral component of membrane	C	0,0002	537	134
	GO:0006508	Proteolysis	B	0,0003	192	42
	GO:0005509	Calcium ion binding	M	0,0014	177	47
	GO:0044699	Single-organism process	B	0,0061	1198	216
	GO:0005200	Structural constituent of cytoskeleton	M	0,0067	12	6
	GO:0038023	Signaling receptor activity	M	0,0088	84	38
	GO:0005215	Transporter activity	M	0,0232	266	56
	GO:0005886	Plasma membrane	C	0,0324	59	18
	GO:0005506	Iron ion binding	M	0,0378	22	9
	GO:0008374	O-acyltransferase activity	M	0,0378	11	5
	GO:0005875	Microtubule associated complex	C	0,0389	56	15

GOs dos genes diferencialmente expressos após 48 horas de tratamento com TSA

	GO ID	Categoria	NSP	*P-value*	Pop.	DE
Genes UP	GO:0006260	DNA replication	B	0,0001	52	24
	GO:0042555	MCM complex	C	0,0109	5	5
	GO:0017076	Purine nucleotide binding	M	0,0198	715	103
	GO:0003824	Catalytic activity	M	0,0371	1993	273
	GO:0044463	Cell projection part	C	0,0468	5	4

Genes DOWN	GO:0005886	Plasma membrane	C	0,0000	63	49
	GO:0004872	Receptor activity	M	0,0012	106	66
	GO:0005509	Calcium ion binding	M	0,0065	180	101
	GO:0005201	Extracellular matrix structural constituent	M	0,0134	8	8
	GO:0016491	Oxidoreductase activity	M	0,0209	205	103
	GO:0007166	Cell surface receptor signaling pathway	B	0,0233	126	75
	GO:0005525	GTP binding	M	0,0272	135	63
	GO:0015672	Monovalent inorganic cation transport	B	0,0274	75	46
	GO:0051188	Cofactor biosynthetic process	B	0,0274	34	19
	GO:0098609	Cell-cell adhesion	B	0,0302	44	34
	GO:0000786	Nucleosome	C	0,0427	23	15

GOs dos genes diferencialmente expressos após 72 horas de tratamento com TSA

	GO ID	Categoria	NSP	*P-value*	Pop.	DE
Genes DOWN	GO:0006508	Proteolysis	B	0,0194	197	6
	GO:0008233	Peptidase activity	M	0,0300	184	6

Em seguida procuramos identificar se entre os genes diferencialmente expressos com o tratamento de iHDAC havia genes codificadores de proteínas *histone readers*. Usando análise *in silico* foi possível encontrar 199 genes expressos de *S. mansoni* que codificam motivos conservados de leitores de MPT de histonas. Entre estes genes, 88 apresentaram a expressão alterada por TSA, sendo que a maioria possui um domínio leitor de lisina metilada, tais como Ankyrin, WD40 e PHD. Estes genes possuem importante função na regulação da cromatina, pois são responsáveis por recrutar outras proteínas de complexos remodeladores com a capacidade de adicionar ou retirar modificações das histonas.

Entre os genes diferencialmente expressos com motivo leitor de histona, está EED (Smp_165220) que codifica uma proteína que possui o multi-domínio WD40 responsável pela ligação a histona H3K27me3. Esta proteína faz parte do polycomb repressor complex 2 (PRC2), que compreende 4 proteínas principais: EZH2, SUZ12, EED e RbAp48, sendo que a enzima

EZH2 possui atividade de metiltransferase adicionando di- ou tri-metilação na lisina 27 da histona H3, responsável por inibição da transcrição (Margueron and Reinberg 2011).

Sabe-se que em humanos a ligação de EED à H3K27me3 estimula a atividade catalítica de EZH2 gerando um *feedback* positivo e aumentando a compactação da cromatina (Margueron, Justin et al. 2009), sendo PRC2 um dos principais complexos responsáveis por manter a repressão gênica. Utilizando a ferramenta *Ingenuity Pathway Analysis*, que contém um banco de dados de mamíferos, principalmente humanos, com evidências da literatura de regulação de expressão gênica ou interação proteína-proteína, foi possível analisar quais genes homólogos em *S. mansoni* tem a expressão regulada por EZH2, e foi possível predizer a alteração da atividade de EZH2 na presença de TSA, utilizando-se a expressão observada dos genes regulados que estão *downstream* do gene de interesse. Assim, foi possível predizer que EZH2 está com a atividade reprimida nos tempos de 12, 24 e 48 horas de tratamento com TSA, e para representar esta análise foi selecionado o primeiro tempo de tratamento (Figura 9). Esta análise mostrou que 67 % dos genes com expressão sabidamente regulada por EZH2 (16 de 24 genes) apresentaram expressão consistente com a diminuição da atividade catalítica de EZH2 na presença de TSA, enquanto apenas 8 genes (33 % de 24 genes, marcados com linhas amarelas) se apresentaram de maneira inconsistente com esta possível inibição. Esta análise aponta para um possível novo alvo de drogas, pois EZH2 parece estar regulando diretamente uma vasta quantidade de genes e sua inibição com uma outra droga poderia ter efeito sinérgico, e induzir a morte de esquistossômulos, como já visto em células de mamífero (Verma, Tian et al. 2012, Tsang-Pai and Pei-Ming 2015).

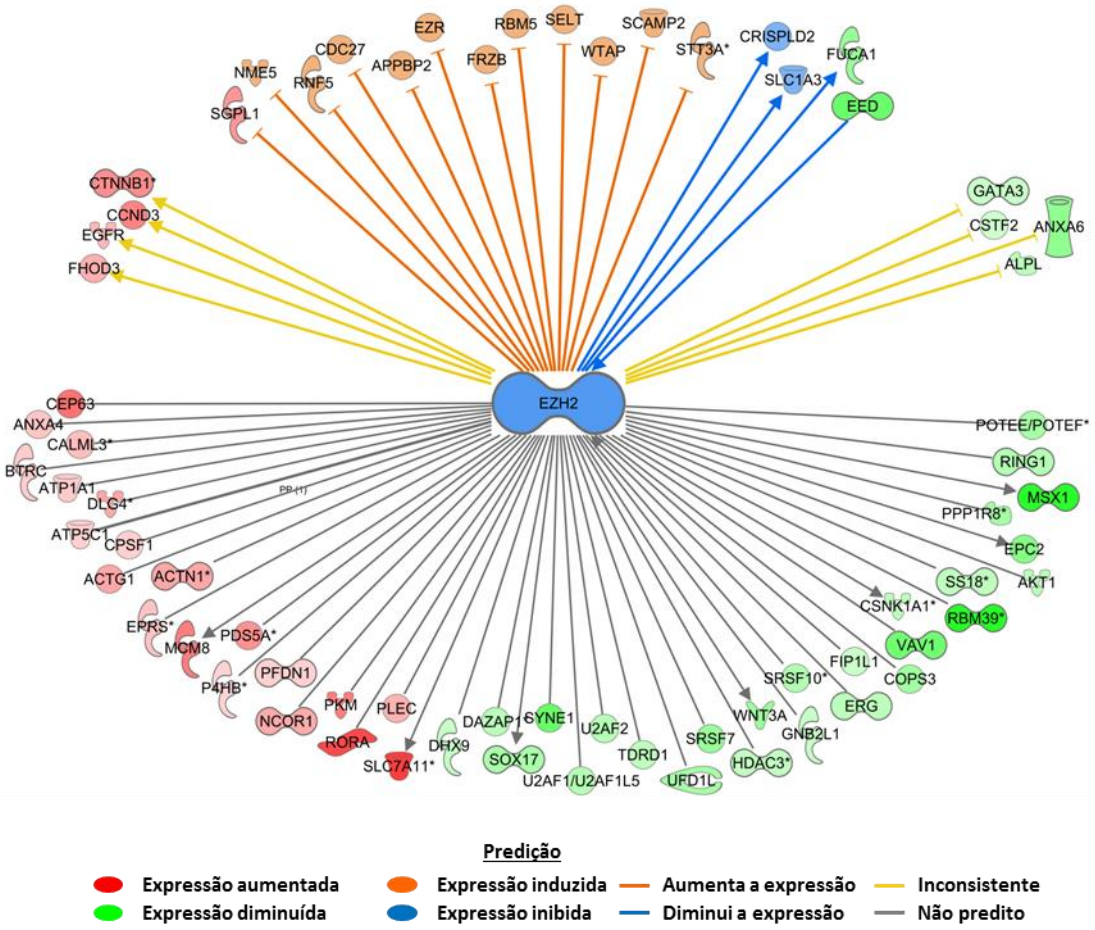

Figura 9: Predição de atividade de EZH2 a partir de valores de expressão dos genes alvo *downstream* que se mostraram diferencialmente expressos após 12 horas de tratamento com iHDAC. Análise de predição de atividade de EZH2 com a ferramenta *Ingenuity*, utilizando os genes que possuem relação direta com EZH2, e mostrando genes com expressão aumentada (vermelho) ou inibida (verde). Genes alvos cuja expressão é inibida por EZH2 quando este gene está ativo, e que se encontram não diferencialmente expressos (laranja) no experimento ou com expressão aumentada (vermelho), sugerindo portanto que EZH2 está com atividade inibida na presença de iHDAC, estão indicados com linhas laranja; genes alvos cuja expressão é induzida por EZH2 quando este gene está ativo, e que se encontram com a expressão diminuída (verde) ou não diferencialmente expresso (azul) no experimento, portanto novamente sugerindo que EZH2 está com atividade inibida na presença de iHDAC, estão indicados com linhas azuis; genes alvos regulados por EZH2 e que estão com expressão inconsistente com o esperado para uma condição em que EZH2 esteja com atividade inibida, estão indicados com linhas amarelas. Os genes mostrados na parte inferior, com setas na cor cinza, estão descritos na literatura como relacionados com EZH2, porém o tipo de relação descrita não permite prever o estado de atividade de EZH2.

4.4 PCR em Tempo Real (RT-qPCR) como validação para as análises de genes diferencialmente expressos nos quatro tempos de tratamento de esquistossômulos

Os dados de expressão gênica apontaram para genes relacionados com diferentes funções celulares como replicação de DNA e regulação da expressão gênica. A partir das análises, foram selecionados 11 genes com funções celular distintas (6 com expressão aumentada, 4 com expressão inibida e 1 não diferencialmente expresso) para a validação por RT-qPCR nos quatro tempos de tratamento de esquistossômulos com iHDAC. EZH2 apesar de não ser diferencialmente expresso no *microarray*, foi selecionado para ser validado por fazer parte de uma importante rede de interação gênica onde se mostrou com sua atividade catalítica possivelmente inibida (Figura 10). A correlação de *Spearman* entre os valores de RT-qPCR e *microarray* foi calculada obtendo-se correlações acima de 90 % com *p-value* $\leq$ 0,05. O RT-qPCR por ser uma técnica mais sensível conseguiu detectar nove genes diferencialmente expressos nas três réplicas biológicas em 72 h, ao contrário do *microarray* que só detectou o gene HistK com expressão induzida apesar da correlação de *Spearman* entre os dados ser de 0,92. Este fato se deve a alta variabilidade entre réplicas biológicas encontrada no experimento de *microarray*, o que influenciou o teste estatístico SAM.

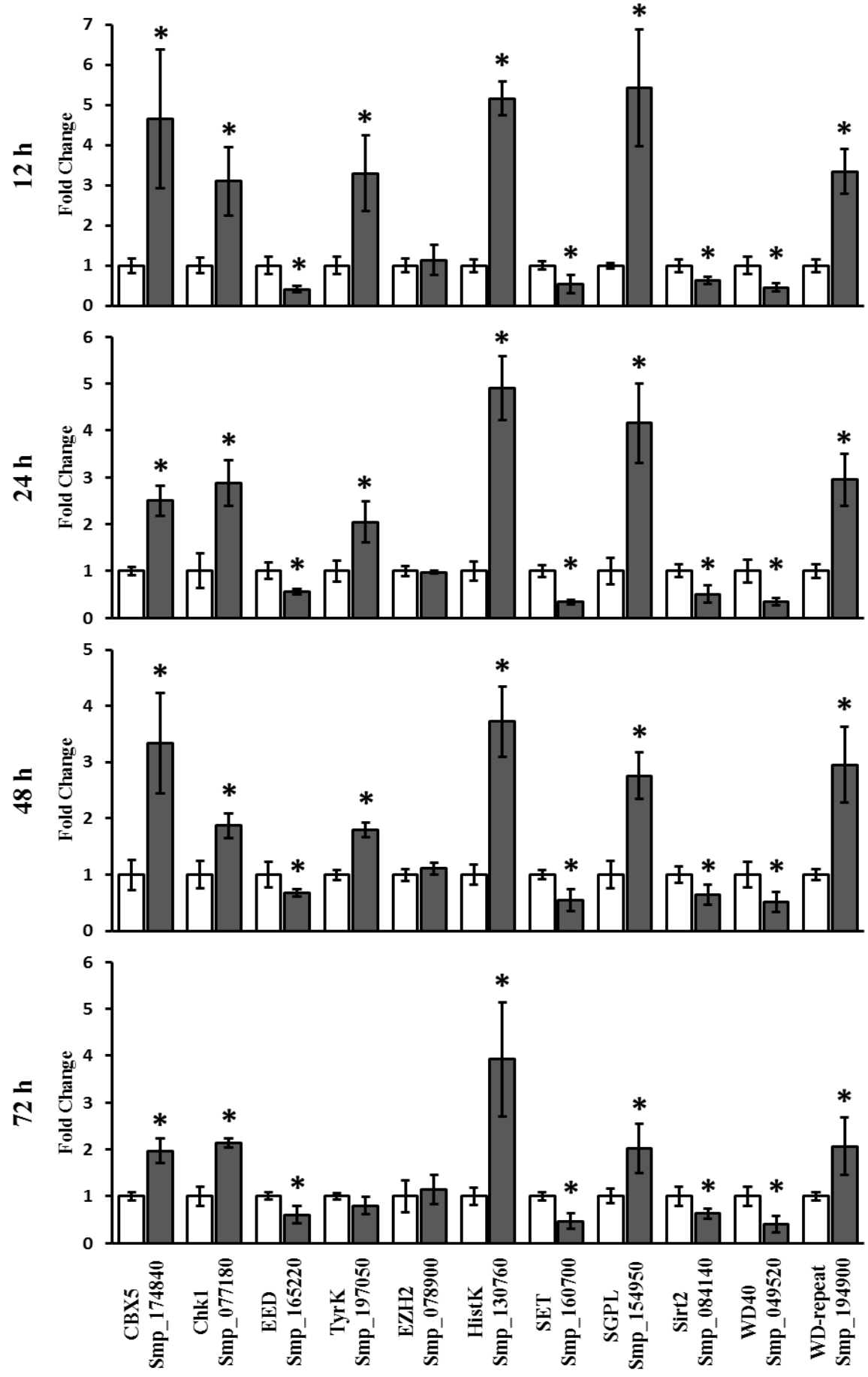
12 h
24 h
48 h
72 h
Fold Change
CBX5 Smp_174840
Chk1 Smp_077180
EED Smp_165220
TyrK Smp_197050
EZH2 Smp_078900
HistK Smp_130760
SET Smp_160700
SGPL Smp_154950
Sirt2 Smp_084140
WD40 Smp_049520
WD-repeat Smp_194900

Figura 10: Validação por RT-qPCR de genes diferencialmente expressos em esquistossômulos tratados com iHDAC por 12, 24, 48 e 72 horas. Painel de genes escolhidos para validação por RT-qPCR com três réplicas biológicas para esquistossômulos tratados com TSA (cinza) ou Etanol (branco), com cálculo da razão entre tratado/controle. A barra de erro mostra a variação entre as três réplicas biológicas para cada tempo distinto. Foi aplicado teste-t comparando as amostras de parasitas tratados versus controle, e genes diferencialmente expressos com *p-value* $\leq 0,05$ estão representados com *.

Entre os genes selecionados para a validação está EZH2 (Smp_078900) que não se apresentou diferencialmente expresso nos *microarrays*, e genes que estão presentes na análise da predição de sua atividade, como EED (Smp_165220), que codifica a proteína que faz parte do PRC2 apresentando expressão reprimida e SGPL1 (Smp_154950) com expressão aumentada. O gene de SGPL1 codifica uma Esfingosina 1-fosfatase liase que degrada a esfingosina 1-fosfato, e o acúmulo deste metabólito em eucariotos tem efeito anti-apoptótico e mitogênico (Spiegel and Milstien 2003), ou seja, com o aumento da expressão desta enzima, estará sendo desregulado o metabolismo de ceramida e esfingosina desencadeando apoptose (Kolesnick and Hannun 1999). Outros genes analisados com a expressão aumentada foram quinases como a Serina/Treonina quinase (Smp_077180), a Tirosina quinase (Smp_197050) e a Histidina quinase (Smp_130760). Os outros genes selecionados para validação codificam proteínas que fazem parte de complexos remodeladores de cromatina, ou possuem domínio leitor de histona como CBX5 (Smp_174840), WD40 (Smp_049520) e WD-repeat (Smp_194900), ou codificam enzimas modificadoras de histonas como SET (Smp_160700) e Sirt2 (Smp_084140).

4.5 Histonas modificadas em região promotora de genes diferencialmente expressos após tratamento de esquistossômulos com iHDAC

Após a análise dos genes diferencialmente expressos induzidos e reprimidos por TSA foi investigado se a regulação da transcrição destes genes está relacionada diretamente com o aumento da acetilação das histonas localizadas em seus loci genômicos. Para isso foi realizada

imunoprecipitação de cromatina (ChIP) com anticorpos específicos para as marcas de histonas, seguida de PCR com *primers* que anelam nas possíveis regiões promotoras de genes diferencialmente expressos. Como descrito na metodologia, apenas para o gene CBX5 os *primers* foram desenhados para o primeiro éxon codificador, pois há uma sequência repetitiva na região *upstream* ao éxon inicial. Os experimentos foram realizados com três réplicas biológicas independentes de esquistossômulos, e para normalizar os valores analisados por qPCR utilizamos *primers* para a região promotora do gene Venom allergen-like Val19 (Smp_123090) que não se mostrou expresso nos *microarrays,* indicando não sofrer alteração na acetilação ou metilação após o tratamento com TSA. Ao avaliar a ocupação por histona H3 (Figura 11) da região promotora de 8 genes selecionados (genes diferencialmente expressos validados por RT-qPCR no tempo de tratamento de 12 h) com expressão induzida (CBX5, Chk1, TyrK, HistK, WD-repeat) ou inibida (EED e WD40), notamos que não há diferença entre amostras controles e tratadas com TSA, indicando não haver alteração na quantidade total de deposição de histonas.

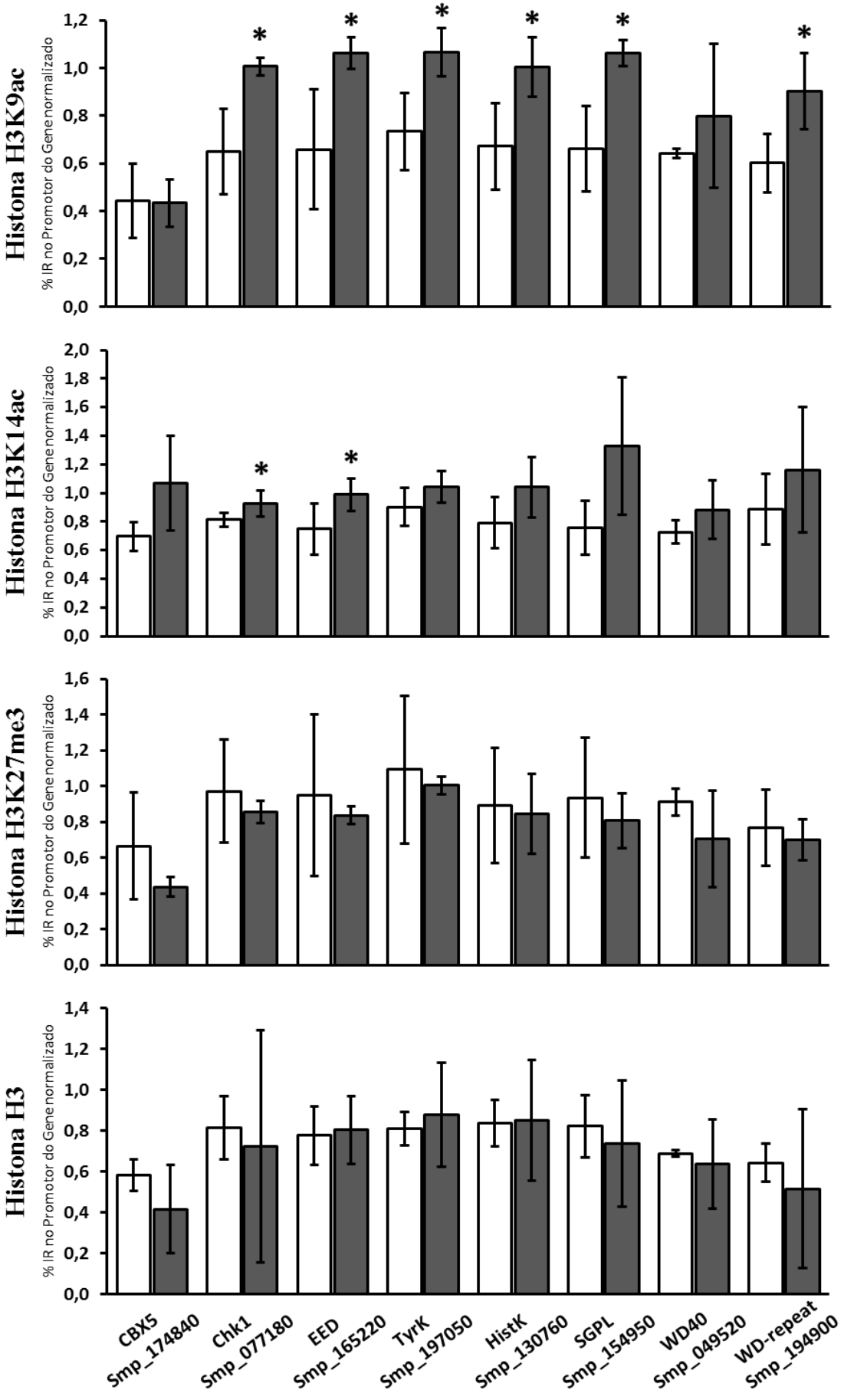
Histona H3K9ac
% IR no Promotor do Gene normalizado
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
Histona H3K14ac
% IR no Promotor do Gene normalizado
2,0
1,8
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
Histona H3K27me3
% IR no Promotor do Gene normalizado
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
Histona H3
% IR no Promotor do Gene normalizado
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
CBX5 Smp_174840
Chk1 Smp_077180
EED Smp_165220
TyrK Smp_197050
HistK Smp_130760
SGPL Smp_154950
WD40 Smp_049520
WD-repeat Smp_194900

Figura 11: Imunoprecipitação de cromatina com anticorpo para H3K9ac, H3K14ac, H3K27me3 e H3 total seguida de qPCR em região promotora de genes diferencialmente expressos em esquistossômulos tratados com TSA. Os experimentos foram realizados com cromatina isolada de esquistossômulos tratados (cinza) e não tratados (branco) com TSA por 12 horas. ChIP foi realizado com anticorpos H3K9ac, H3K14ac, H3K27me3 e H3 total e o DNA presente no imunoprecipitado foi analisado com qPCR usando *primers* para a sequência da região promotora específica de cada gene. Os resultados representam a porcentagem de *input* recuperado (% IR) para a região promotora dos genes alvo normalizado por % IR do promotor do gene de referência Val19. Os resultados são a média de três réplicas biológicas, e o teste-t estatístico foi aplicado mostrando enriquecimento significativo, com *p-value* $\leq$ 0,05 representado por *.

A acetilação das histonas na região promotora dos genes foi avaliada com anticorpos para as marcas de H3K9ac e H3K14ac. Foi possível quantificar aumento significativo da marca de H3K9ac da região promotora dos genes Chk1, EED, TyrR, HistK, SGPL e WD-repeat (Figura 11). Os genes que se mostraram enriquecidos com histona H3K9ac na região promotora são induzidos por iHDAC após 12 horas de tratamento, assim como esperado para o papel da H3K9ac, exceto EED que está com a expressão inibida. Este resultado mostra que a regulação da transcrição de EED após o tratamento com droga inibidora de HDAC não é dependente somente da acetilação da cromatina, e sim possivelmente depende de outros fatores de transcrição não regulados por HDAC (não identificados). Para o gene CBX5 não foi possível detectar nenhum enriquecimento; como os *primers* foram desenhados na região codificadora do gene, esta deve ser a razão pela qual o ensaio não consegue detectar a deposição destas marcas de início de transcrição. O ChIP-qPCR para a H3K14 acetilada (Figura 11) mostrou que o tratamento com iHDAC não alterou a ocupação desta marca em nenhuma das regiões promotoras testadas.

Assim como as marcas de ativação da transcrição (H3K9ac e H3K14ac) foram quantificadas por ChIP-qPCR, foi avaliado se poderia haver alteração da marca de repressão H3K27me3, introduzida pelo complexo PRC2. O resultado observado no *western blotting*, onde não houve alteração da metilação de H3K27 após o tratamento com iHDAC, se manteve nos

ensaios de ChIP-qPCR (Figura 11), não sendo detectada nenhuma alteração quantitativa de H3K27me3 na região promotora dos genes selecionados.

Outra modificação de cromatina analisada foi H3K4me3, sendo esta uma marca de início de transcrição (TSS) não espalhada ao longo da região promotora. Como foi utilizada a técnica de PCR para detectar o enriquecimento de DNA na imunoprecipitação de cromatina, a escolha da região de DNA a ser detectada depende de dados como definição precisa do sítio de inicio de transcrição (TSS) dos genes para predizer a região promotora, o que até o presente momento não foi amplamente explorado. Assim, se torna difícil prever com exatidão a região do TSS dos genes de *S. mansoni* e os resultados com H3K4me3 se apresentaram sem enriquecimento, com valores próximos ao controle negativo IgG.

4.6 Efeito sinérgico de inibidor de HDAC (TSA) com inibidor de EZH2 (GSK343)

As análises de *microarrays* de esquistossômulos tratados com TSA mostraram que o gene EED está com a expressão inibida nos tempos 12, 24 e 48 h, e este gene codifica uma proteína que possui importante papel na manutenção da atividade catalítica de EZH2, ambas fazendo parte do complexo PRC2. Além disso, por análise *in silico* foi possível predizer que a atividade de EZH2 poderia estar reduzida a partir da inibição de HDACs devido ao tratamento com TSA. Apesar de TSA ser uma das poucas drogas a inibir todas as HDACs, ela não desencadeia alta taxa de mortalidade em esquistossômulos (Dubois, Caby et al. 2009), e por isso foi levantada a hipótese de que se outra droga inibisse diretamente a atividade de EZH2 juntamente com o efeito de inibição de HDAC, poderia haver aumento da taxa de mortalidade de parasitas. Esta hipótese foi testada utilizando a droga GSK343, um inibidor de EZH2 desenvolvido pela *GlaxoSmithKline* (Verma, Tian et al. 2012), ainda em fase de testes clínicos para tratamento de câncer. Testamos o efeito de GSK343 em esquistossômulos ao longo de 4 dias de tratamento, em doses isoladas de GSK343 e de forma combinada com TSA. Para este ensaio foi utilizado o marcador de células mortas, iodeto de propídeo (PI), marcando em

vermelho esquistossômulos mortos. Outras características podem ser avaliadas em esquistossômulos como opacidade, motilidade e coloração, porém estes critérios são subjetivos ao analisador do experimento. A escolha por iodeto de propídeo permite acessar a quantificação de esquistossômulos mortos de forma mais confiável, mas apesar disto, o desenho experimental requer cuidados adicionais (Figura 12). Após adição de PI no meio de cultura para contabilizar a mortalidade de esquistossômulos, não é possível retirar este composto do meio o que pode interferir na viabilidade de parasitas ainda vivos. Para retirar esta variabilidade experimental, os esquistossômulos após serem corados com PI e contabilizados, eram descartados, havendo assim um novo conjunto de parasitas para cada contagem em cada tempo.

A quantificação de mortalidade de esquistossômulos mostrou que TSA após quatro dias de tratamento induziu somente 4 % de morte, e GSK343 nas mesmas condições induziu 10 % de morte de esquistossômulos (Figura 13). Porém as duas drogas em combinação induziram a mortalidade de aproximadamente 30 % de esquistossômulos com significância de $p = 0,001$ comparado a somente parasitas tratados com GSK343, indicando um efeito sinérgico entre o iHDAC e iEZH2 no quarto dia de tratamento, aumentando a mortalidade em 3 vezes. Apesar da mortalidade não atingir 100 % dos esquistossômulos, vale considerar que este ensaio foi realizado com a adição de droga somente no tempo zero, não havendo troca de meio com reposição de droga.

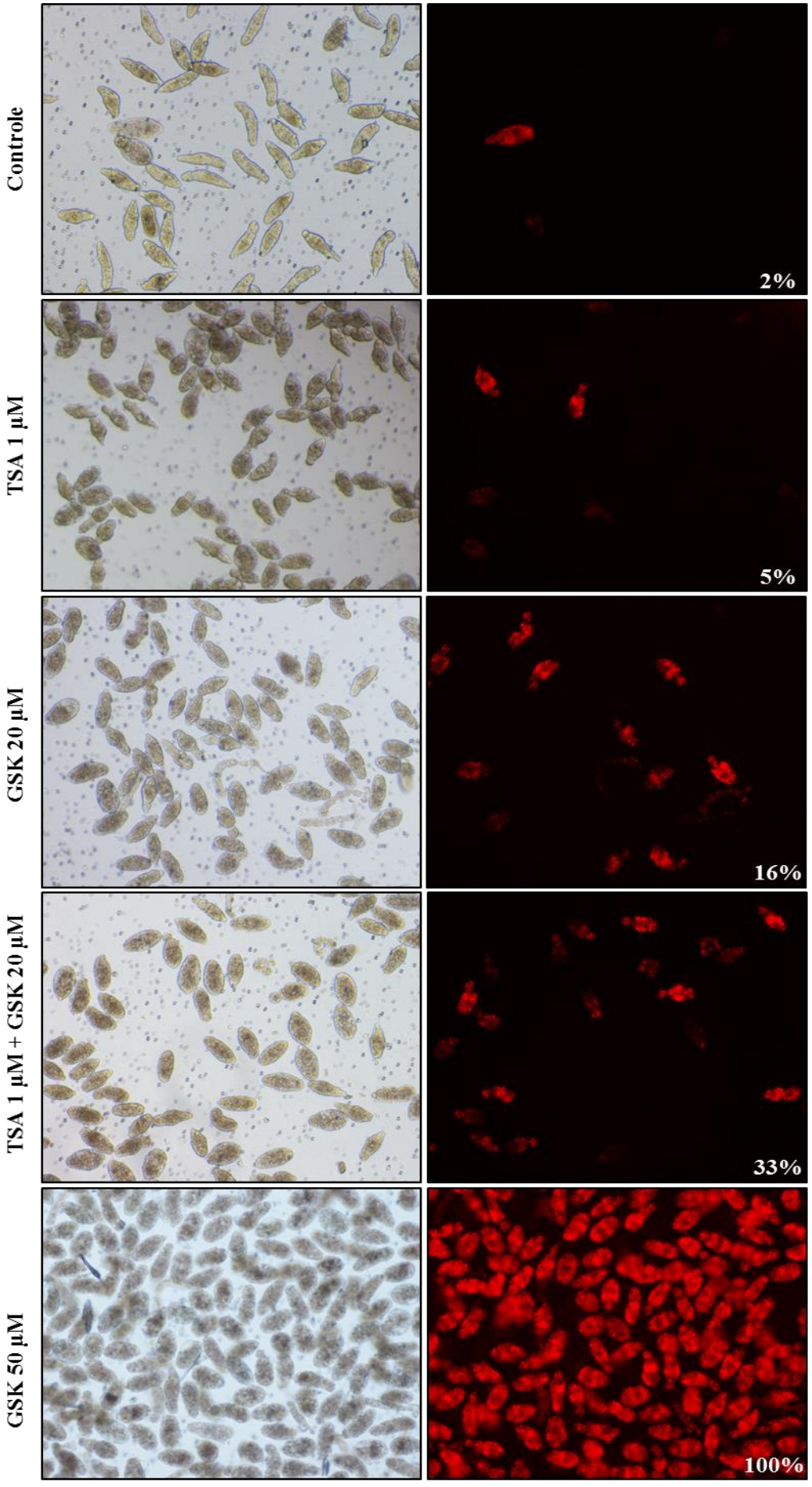
Controle
2%
TSA 1 µM
5%
GSK 20 µM
16%
TSA 1 µM + GSK 20 µM
33%
GSK 50 µM
100%

Figura 12: Ensaio de mortalidade de esquistossômulos tratados com inibidores de HDAC (TSA) e de EZH2 (GSK343). Esquistossômulos tratados por 72 horas e corados com Iodeto de Propídeo (marcador de células mortas) em diferentes condições: veículo da droga (DMSO e Etanol); 1 µM de TSA, 20 µM de GSK343; 20 µM de GSK343; combinação das drogas 1 µM de TSA mais 20 µM de GSK343; 50 µM de GSK343. Na foto da esquerda a microscopia de campo claro de um campo representativo do tratamento, e à direita a foto do mesmo campo com fluorescência, contabilizando em cada imagem a porcentagem dos esquistossômulos corados com iodeto de propídeo.

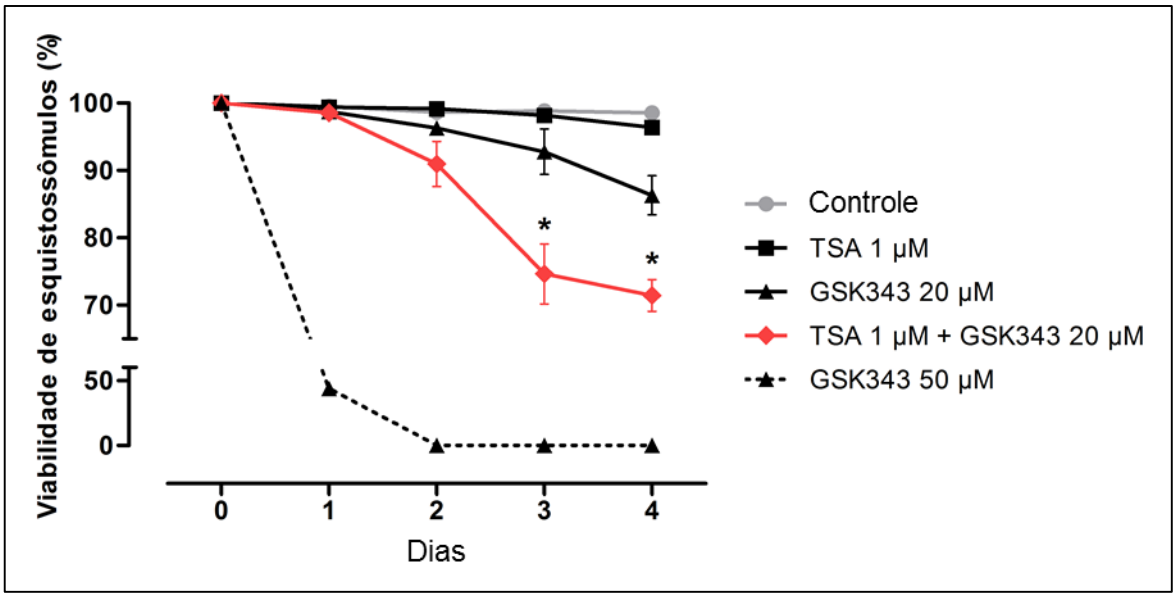

Figura 13: Viabilidade de esquistossômulos tratados com iHDAC e iEZH2 ao longo de quatro dias. Porcentagem de esquistossômulos viáveis (não corados com iodeto de propídeo) ao longo de quatro dias de tratamento. Para cada condição testada foram utilizados aproximadamente 4800 esquistossômulos divididos em seis réplicas biológicas e em quatro tempos analisados. Para os diferentes tempos analisados dentro do mesmo grupo experimental foram utilizados esquistossômulos diferentes, pois a adição de iodeto de propídeo para a contagem de viabilidade poderia interferir no aumento de mortalidade para o próximo tempo analisado. Os asteriscos indicam significância p-value ≤ 0,01 com o teste *two-way ANOVA.*

4.7 Modelagem de EZH2 de *S. mansoni* e *docking* com GSK343

Até o presente momento há poucos estudos sobre GSK343, mostrando a sua alta seletividade para EZH2 humana, bem como o efeito de diminuição da proliferação de células de linhagem de câncer cm alteração epigenética (Verma, Tian et al. 2012). Como GSK343 se mostrou uma droga capaz de induzir a mortalidade em esquistossômulos e de agir sinergicamente com TSA, foi analisado com abordagem computacional de modelagem por

homologia e *docking* se esta droga poderia estar se ligando especificamente com a EZH2 de *S. mansoni*.

A enzima EZH2 humana (hEZH2) possui 746 aminoácidos com diferentes domínios estruturais e funcionais, porém somente o domínio SET de metiltransferase tem sua estrutura secundária e terciária resolvida (Wu, Zeng et al. 2013). A enzima SmEZH2 Smp_078900 por sua vez possui 1026 aminoácidos preditos, com o domínio SET conservado, e possui identidade de 66 % com cobertura de 48 % em relação a hEZH2 utilizando a sequência completa de aminoácidos. Com a estrutura de dois modelos (4MI0 e 4MI5) do domínio SET humano, foi possível fazer a modelagem *in silico* do mesmo domínio em SmEZH2, dado que a sequência primária de aminoácidos dos moldes da proteína humana e do domínio SET de *S. mansoni* possui identidade acima de 60 %. O programa *Molprobity* (Chen, Arendall et al. 2010) ao avaliar o modelo gerado de SmEZH2 *Modeller* detectou 93,1 % de resíduos em regiões favoráveis, e 99,1 % de resíduos em regiões permitidas no gráfico de Ramachandran, com dois resíduos *outliers,* e o *ERRAT* detectou 68 % da SmEZH2 em regiões confiáveis por avaliação de interação entre átomos. Após refinamentos de estrutura com *SCWRL* e *KobaMIN* o modelo foi reavaliado pelo programa obtendo-se um modelo com 95,7 % de resíduos em região favorável no gráfico de Ramachandran e 99,1 % de resíduos em regiões permitidas, porém ainda contendo dois aminoácidos fora das posições permitidas do gráfico de Ramachandran, e o *ERRAT* indicou 93 % da estrutura modelada em regiões confiáveis. É interessante notar que SmEZH2 possui uma inserção de 19 aminoácidos no domínio SET, para a qual não foi possível predizer a estrutura visto que os modelos utilizados não possuem este trecho de aminoácidos (Figura 14).

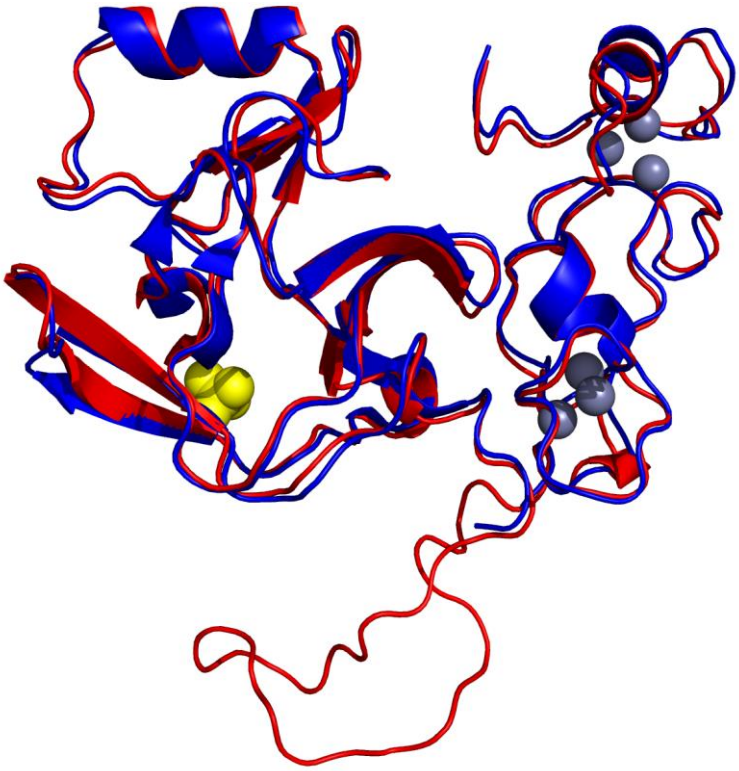

Figura 14: Modelo do domínio SET de SmEZH2 refinado sobreposto com hEZH2. Em vermelho está a estrutura modelada *in silico* do domínio SET de SmEZH2, sobreposta com os modelos de hEZH2 (4MI0 e 4MI5) em azul. Em amarelo está o grupo SO_4 e em cinza os dois grupos formados por três íons de Zn.

A enzima EZH2 possui atividade catalítica quando complexada com EED e SUZ12, e estas interações modulam o domínio SET favorecendo à conformação catalítica (Wu, Zeng et al. 2013). Além disso, a estrutura cristalizada de hEHZ2 revelou que quando a enzima não está complexada com as proteínas associadas, a porção C-terminal se dobra para dentro do sítio catalítico bloqueando a ligação ao substrato (Antonysamy, Condon et al. 2013). A região com os aminoácidos do domínio SET de hEZH2 que tem contato com o cofator SAM (Antonysamy, Condon et al. 2013) foi utilizada para sinalizar ao programa AutoDock Vina (Trott and Olson 2010) a área que deveria ser usada para o cálculo do acoplamento da droga GSK343 ou do cofator SAM com a SmEZH2. O *docking* apontou que GSK343 e SAM se ligam na SmEZH2 na mesma região do domínio SET, e os aminoácidos que foram identificados como envolvidos nesta ligação a uma distância de 3,5 Å estão indicados na sequência primária do domínio, onde

estão sublinhados os aminoácidos participantes da interação com SAM (Figura 15, laranja) ou com GSK343 (Figura 15, vermelho). Nota-se que a maioria dos aminoácidos que participam desta interação com cada um dos dois ligantes são idênticos nos dois casos (SAM ou GSK343), sugerindo que a droga poderia agir de forma competitiva (Figura 15). As estruturas tridimensionais do domínio SET de SmEZH2 com SAM ou GSK343 ligados, que foram obtidas pelo *docking*, estão mostradas na Figura 16 abaixo. O acoplamento de SAM à hEZH2 por nós calculado usando *docking* ocorre no domínio SET na mesma região descrita por Antonysamy e colaboradores (Antonysamy, Condon et al. 2013) (não mostrado), e os aminoácidos de hEZH2 que participam da interação estão sublinhados na Figura 15, azul. Nota-se pelo alinhamento múltiplo entre SmEZH2 e hEZH2 que apenas 2 aminoácidos são diferentes em *S. mansoni* (V904I e Y908T) no trecho envolvido com a interação com os ligantes na EZH2 humana (V904 até Y908). Apesar disso, a maioria dos aminoácidos preditos como interagindo com os ligantes na hEZH2 (nosso trabalho e (Antonysamy, Condon et al. 2013)) é diferente daqueles preditos como interagindo com SmEZH2 (Figura 15), havendo porém dois aminoácidos em comum (S910 e L912).

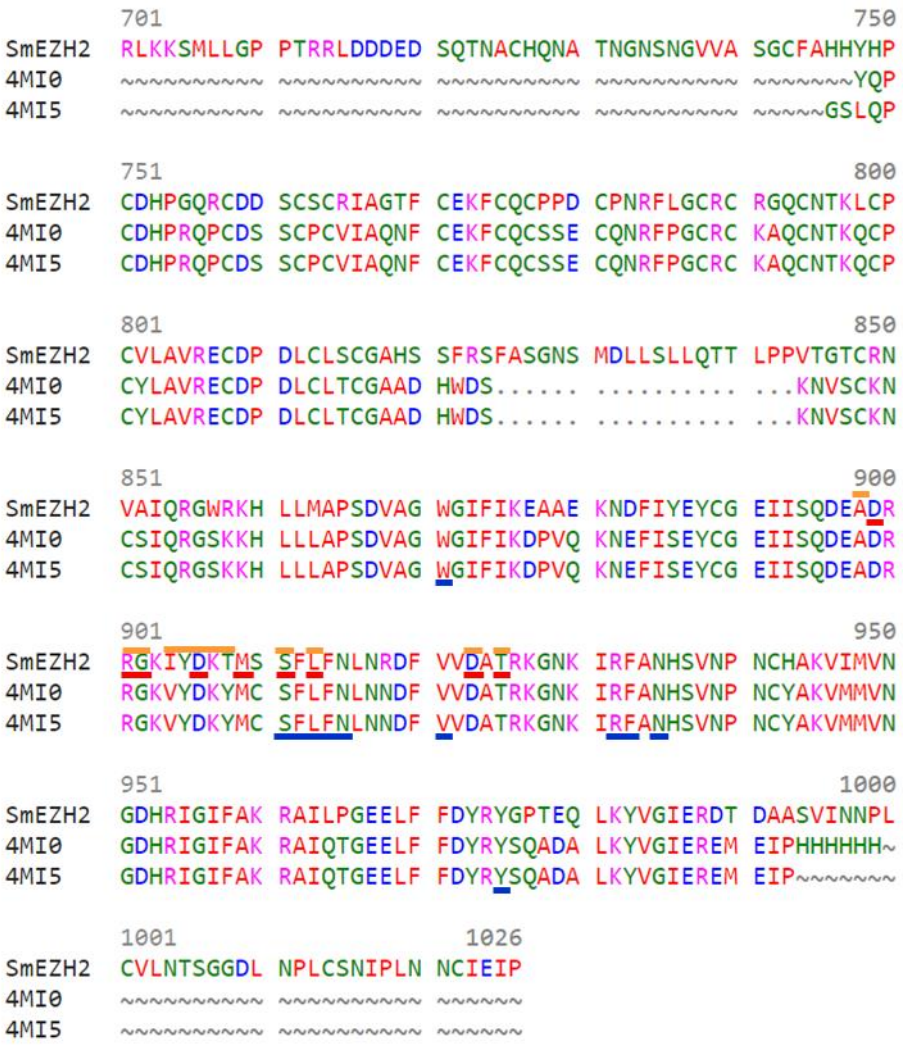

Figura 15: Alinhamento da sequência de aminoácidos do domínio SET de SmEZH2 com as duas sequências de hEZH2, indicando região predita de interação com GSK343 e SAM. Alinhamento múltiplo da sequência SmEZH2 com as duas sequências de hEZH2 (indicadas como 4MI0 e 4MI5) usando-se *Clustal Omega*, com numeração de aminoácidos referente a sequência de SmEZH2. As linhas em vermelho indicam os aminoácidos de SmEZH2 que foram preditos pelo *docking* dos ligantes na estrutura tridimensional do domínio SET como tendo proximidade de 3,5 Å com GSK343; as linhas em laranja indicam os aminoácidos de SmEZH2 que tem proximidade de 3,5 Å com SAM; as linhas em azul indicam os aminoácidos de hEZH2 que tem proximidade de 3,5 Å com SAM, de acordo com as estruturas cristalinas com resolução atômica da hEZH2 depositadas no banco PDB com os números de acesso 4MI0 e 4MI5.

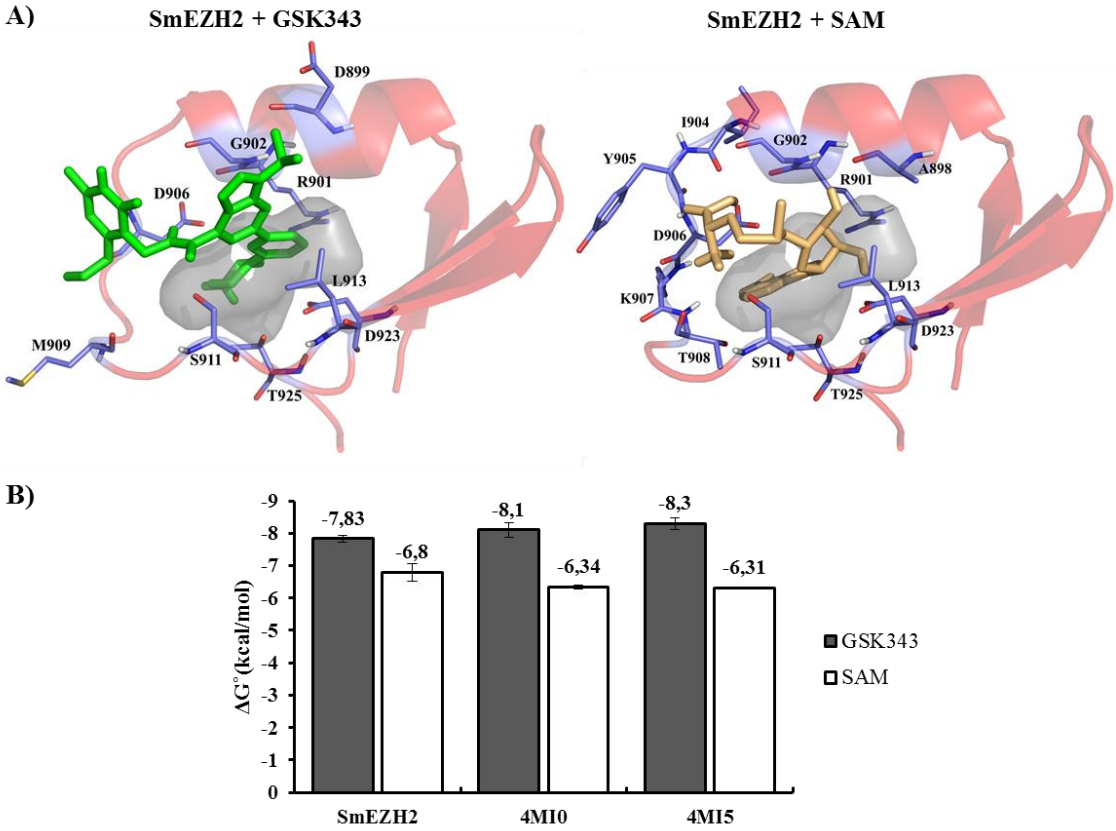

Figura 16: Acoplamento de GSK343 e SAM ao modelo de SmEZH2. (A) Região de acoplamento no domínio SET de SmEZH2 modelado por homologia, mostrando os aminoácidos interagindo a 3,5 Å com GSK343 (verde à esquerda) e SAM (laranja, à direita) (B) Média entre os cálculos de menor energia livre obtidos a partir de 20 simulações de acoplamento da proteína SmEZH2, 4MI0 e 4MI5 com cada ligante (GSK343 ou SAM).

O cálculo da energia livre de ligação entre SmEZH2 e GSK343 ou entre SmEZH2 e SAM mostrou que ela é mais negativa no primeiro caso (Figura 16, B), sugerindo uma maior afinidade da enzima pela droga comparada ao cofator natural, apesar do cofator interagir com maior número de aminoácidos. Valores semelhantes foram encontrados para a interação de hEZH2 com GSK343 ou SAM, porém a predição de acoplamento mostrou que esta interação ocorre com alguns aminoácidos diferentes comparado com SmEZH2. Esta ligação de SmEZH2 com GSK343, além de mostrar que a droga pode estar agindo por inibição competitiva, também abre a perspectiva de desenvolvimento de uma droga com maior afinidade para a enzima de *S. mansoni* do que para a enzima humana, visto que há interação com diferentes aminoácidos do domínio SET.

5. Discussão

Este trabalho descreve a ação de uma droga inibidora de histona deacetilases que altera diretamente o remodelamento da cromatina em *S. mansoni*, contemplando análise das histonas (alvo das HDACs), análise de expressão gênica e inibição de um novo alvo com ação sinérgica de uma droga que age sobre outra enzima modificadora de histonas, a histona metiltransferase EZH2.

Inicialmente decidimos fazer catalogação dos genes codificadores de histonas de *S. mansoni*, identificando no genoma quais genes foram preditos e classificando-os nas famílias de histonas. A análise *in silico* das predições gênicas do parasita apontou quais codificam cada variante de histona, indicando a possível existência de 29 genes de histonas. Apesar de podermos classificar todas as predições gênicas, a busca por evidência de transcrição utilizando o banco público de ESTs permitiu confirmar que apenas 21 predições gênicas são transcritas com mRNA correspondendo total ou parcialmente à sequência do gene predito. Há uma grande dificuldade em se encontrar transcritos de mRNA de histonas em bibliotecas de ESTs, não pelo fato da limitação das técnicas disponíveis, mas provavelmente pela meia-vida curta destes RNAs de aproximadamente 10 minutos, além de serem transcritos entre a fase G1 e S do ciclo celular, acumulando de 15 a 30 vezes na fase S (Osley 1991). A busca por ESTs compreendeu todos os estágios de vida do parasita, porém como os transcritos são derivados de diferentes células em diferentes fases do ciclo celular, acreditamos que este fato possa diminuir a chance de encontrar evidência de transcrição para todas as histonas. Apesar de não encontrar transcrito para todas as variantes de histona, a detecção de ESTs para alguns destes genes indicou possíveis falhas na arquitetura do gene predito, apontando para erro na sequência codificadora resultante (Anderson, Pierce et al. 2012), como detalhado a seguir.

A detecção de transcritos derivados de um gene permite a checagem da predição gênica, e ao realizar esta análise com ESTs de histonas de *S. mansoni* foi possível realizar a curagem

manual de dois genes (Smp_176670 e Smp_035980), onde houve o rearranjo da arquitetura com alteração do códon inicial e códon final. Destacamos que estas curagens manuais de genes permitem uma maior confiabilidade da anotação do genoma. Recentemente o banco de dados de genômica *WormBase* discutiu sobre a necessidade de integração entre dados curados pela comunidade científica com dados semi-automáticos, visto que com o aumento no volume e complexidade de dados gerados para diferentes vermes, a automação da análise se faz necessária, porém não torna dispensável a checagem manual de predição de função de um gene ou sua estrutura (Howe, Bolt et al. 2016).

A observação de inserção de introns no gene de histona atraiu nossa atenção pois esta característica é incomum entre genes codificadores de histonas em eucariotos, sendo observado em alguns casos em espécies de fungo (Yun and Nishida 2011). Além disso, o fato da sequência peptídica predita por estes genes gerar uma proteína com massa molecular superior quando comparado às histonas de outros organismos, indicou um possível erro da predição de genes a partir da sequência genômica. A curagem manual da histona H4 Smp_149600 utilizando somente a sequência genômica sem *gap* permitiu adicionar os 9 primeiros códons na porção amino-terminal da predição, visto que a sequência possui *open reading frame* (ORF) até o códon inicial (ATG) (Anderson, Pierce et al. 2012). Desta forma esta predição gênica corrigida codifica uma proteína com massa molecular concordante com as outras histonas H4 de diferentes espécies sendo, portanto, compatível com a formação do nucleossomo.

Estas análises com as predições gênicas de histonas foram realizadas antes da publicação científica da versão 5.0 do genoma e transcriptoma por Protasio e colaboradores, em 2012, quando algumas melhorias foram realizadas nas predições gênicas do parasita (Protasio, Tsai et al. 2012). Apesar disso, estas curagens das histonas descritas por nosso grupo, bem como a anotação de variante de histona, infelizmente não foram incorporadas ao repositório de informações do genoma de *S. mansoni* (Protasio, Tsai et al. 2012). A anotação

de genes de *S. mansoni* está sendo aperfeiçoada constantemente por diversos grupos, a partir de novos sequenciamentos de DNA e RNA, porém ainda há uma grande dificuldade em conseguir organizar os 885 *scaffolds* de sequência genômica nos 8 pares de cromossomos, apesar de que 81 % das bases já sejam organizadas em cromossomos (Protasio, Tsai et al. 2012). Esta dificuldade se deve à grande quantidade de transposons e sequências repetitivas no genoma, se tornando um grande quebra-cabeça na montagem de sequências mais longas. Este fato se reflete diretamente na anotação de predições gênicas, pois com a grande quantidade de *gaps* presente, os algoritmos falham na montagem da arquitetura do gene, já que devem atender a critérios de éxons sem sobreposição, manter o quadro de leitura dos éxons e encontrar o códon de início e fim (Mathe, Sagot et al. 2002).

Outro aspecto importante observado nos genes codificadores de histonas foi a identificação *in silico* de elementos regulatórios do mRNA em *S. mansoni* como presença de sequência capaz de formar o 3´-*hairpin* responsável por interagir com a proteína SLBP Smp_137390. A identificação deste elemento conservado do mRNA que se liga e recruta proteínas responsáveis por processamento e transporte do núcleo para o citoplasma, revelou que este mecanismo também está preservado no parasita (Anderson, Pierce et al. 2012).

Com a identificação dos genes codificadores de histonas em *S. mansoni*, passamos a estudar o mecanismo de remodelamento de cromatina no parasita, visto que tem sido apontado nos últimos anos como relevante alvo para o desenvolvimento de novas drogas dado que é o cerne da regulação da expressão gênica. Para isso, utilizamos o inibidor de HDAC Trichostatin A (TSA) o qual pertence à classe dos hidroxamatos, assim como SAHA (Vorinostat) que já passou por testes clínicos e está aprovado pela *Food and Drug Administration – FDA* o seu uso para tratamento de linfoma cutâneo de células T. Apesar das duas drogas serem da mesma classe e terem atividade antitumoral, o TSA se mostrou altamente tóxico e com muitos efeitos colaterais para ser testado clinicamente (Rodriguez-Paredes and Esteller 2011). Ainda que em

humanos tenha alta toxicidade, em *S. mansoni* o TSA se mostrou eficaz em induzir mortalidade em esquistossômulos *in vitro* por ativação de caspases e aumento da acetilação global de histona H3 e H4 em vermes adultos e esquistossômulos (Dubois, Caby et al. 2009), revelando seu potencial como droga para estudo de novos alvos terapêuticos. Com isso, escolhemos TSA para estudo do efeito na indução de morte no parasita, explorando aspectos de regulação de cromatina e alteração na expressão gênica.

Primeiramente, para estudar o efeito da droga no parasita, analisamos como as histonas, alvos das HDACs, alteraram seu padrão de modificações pós-traducionais. Anteriormente, Dubois e colaboradores (2009) quantificaram a acetilação global de histonas H3 e H4 de parasitas tratados com TSA, porém se sabe que cada modificação específica gera um código de histonas, responsável por desencadear efeitos distintos na cromatina. No presente trabalho nós detectados que houve um aumento significativo de acetilação nas posições H3K9, H3K14 e H4K5 das histonas de vermes adultos tratados com TSA. A acetilação de histona está intimamente associada com relaxamento da cromatina rompendo o contato entre histona e DNA, tornando o DNA acessível para a transcrição gênica ou replicação do DNA.

Analisamos a expressão gênica em larga-escala de parasitas tratados com o inibidor de HDAC (TSA) utilizando *microarrays.* Atualmente a técnica de *microarray* está sendo substituída por sequenciamento de RNA em larga escala (RNA-Seq) (Anderson, Amaral et al. 2015), sendo que ambas as técnicas podem ser utilizadas para a quantificação de níveis de expressão de genes. Apesar da análise de expressão por sequenciamento em larga-escala de RNA a princípio não necessitar do conhecimento prévio do genoma ou dos genes, há ainda uma grande dificuldade em aplicar os diferentes métodos e algoritmos de análise existentes e se obter o perfil de expressão diferencial entre as diversas condições em estudo, especialmente pela existência de *splicings* alternativos dos transcritos, que dificultam o *assembly* das sequências de RNA (Fang, Martin et al. 2012, Huang, Niu et al. 2015). Já a técnica de *microarray* possui

a limitação de exigir a síntese prévia das sondas para os transcritos que serão medidos, dependendo portanto do conhecimento prévio de todos os genes ou transcritos que serão medidos. Porém as ferramentas de análises de dados de *microarray* foram bem estabelecidas ao longo da última década (Dudoit, Gentleman et al. 2003, Reimers and Carey 2006, Zhang, Szustakowski et al. 2009), com inúmeros trabalhos em diferentes áreas apontando para sua alta reprodutibilidade e acurácia, permitindo uma visão detalhada sobre o transcriptoma em estudo. De fato, a confiabilidade dos dados de *microarray* aqui mostrados se baseia em uma taxa de validação por RT-qPCR acima de 90 % para um conjunto de genes selecionados, o que está acima de 70 % encontrado na literatura (Morey, Ryan et al. 2006).

Outro aspecto interessante das análises aqui obtidas é a relação direta entre hiperacetilação de histonas e expressão de genes. A imunoprecipitação de cromatina seguida de sequenciamento ChIP-Seq permite gerar o perfil global das proteínas associadas ao DNA ou MPT de histonas, acessando a regulação de genes e os mecanismos epigenéticos na célula (Park 2009). Da mesma forma o ChIP-PCR para regiões promotoras de genes selecionados permite o acesso a que tipo de regulação está associada a transcrição no locus. Entre os oito genes selecionados que tem a expressão alterada pelo tratamento com iHDAC, foi detectado enriquecimento de acetilação da H3K9 na região promotora de seis genes (Chk1, EED, TyrR, HistK, SGPL e WD-repeat), sendo que somente um apresenta transcrição inibida após o tratamento, o que não condiz com o esperado. Porém como a regulação da transcrição em eucariotos é um mecanismo muito complexo, envolvendo fatores de transcrição, enzimas que alteram o estado da cromatina e até mesmo proteínas que estabilizam o RNA, não se pode atribuir somente à hiperacetilação de histona a regulação da transcrição. Além do mais, como discutido anteriormente, proteínas de complexos remodeladores de histona tem também a sua expressão alterada com o tratamento de iHDAC, podendo desta forma inibir a expressão de genes.

DISCUSSÃO

Utilizando os *microarrays*, observamos que nos tempos iniciais de tratamento com TSA houve desregulação na expressão de mais de 40 % dos genes do parasita, sendo que parte dos genes teve sua expressão induzida e outra parte teve sua expressão reprimida. Este fato chamou a nossa atenção pois se sabe que o acúmulo de acetilação em histonas leva à abertura da cromatina e possivelmente ao aumento da expressão de genes, o que não ocorreu em nosso estudo como foi possível observar na Figura 7, onde há uma parte dos genes com expressão induzida e outra parte dos genes com expressão inibida. Este dado sugere que a expressão está sendo alterada por efeitos secundários, sobre outras vias de regulação, desencadeados pela hiperacetilação de histonas. Além disso, a comparação do perfil de expressão gênica em esquistossômulos tratados com TSA mostrou haver um grande número de genes diferencialmente expressos exclusivos para cada tempo, principalmente após 24 e 48 horas de tratamento onde mais de mil genes alterados são únicos em cada tempo.

A classificação por ontologia gênica (GO) dos genes diferencialmente expressos em cada tempo de tratamento permite acessar quais processos biológicos são afetados no parasita sob efeito do iHDAC, e possivelmente tenham um papel importante na resposta de morte do esquistossômulo ou mesmo na resposta antagônica à morte. As categorias que se mostraram enriquecidas estão intimamente relacionadas com processos metabólicos na célula como ligação de ATP, atividade catalítica, proteólise, atividade oxidoredutase ou ainda categorias relacionadas com estrutura celular como membrana plasmática, complexo de microtúbulos e organização nuclear.

A partir destas categorias enriquecidas, exploramos individualmente quais funções as proteínas codificadas pelos genes com expressão alterada desempenham na célula, e qual seria um possível mecanismo para o iHDAC estar desencadeando a morte no parasita. De modo notável, genes relacionados a regulação da forquilha de replicação se mostraram com expressão induzida como apontado pela categoria enriquecida de replicação de DNA (GO:0006260) nos

tempos de 24 e 48 horas de tratamento com o iHDAC, e categoria do complexo MCM (GO: 0042555) após 48 horas de tratamento. Entre os genes diferencialmente expressos, estão genes do complexo de organização da replicação, como complexo de reconhecimento e origem (ORC1, ORC2, ORC3), CDC6 (proteína de controle de divisão celular 6), CDT1 (fator de replicação de DNA) e complexo de manutenção do mini-cromossomo (MCM3, MCM4, MCM5, MCM6, MCM7, MCM10, HBO1 e FACT). Sabe-se que a acetilação de histona está intimamente ligada a origem de replicação do DNA, estimulando o reconhecimento do complexo de reconhecimento de origem (ORC) (Mechali 2010). Depois que o complexo ORC se liga ao DNA, os fatores CDC6 e CDT1 são recrutados facilitando o acoplamento do complexo MCM composto por proteínas MCM2-7 com atividade de helicase, formando um anel ao redor da origem de replicação e finalmente todas estas proteínas compõe o complexo de pré-replicação (Pre-RC) (Alabert and Groth 2012). Por sua vez, a proteína CDT1 recruta a histona acetiltransferase ligante de ORC1 (HBO1) para o Pre-RC, que possui atividade sobre histona H4K5, K8 e K12, facilitando a acessibilidade das proteínas MCM2-7 (Iizuka, Matsui et al. 2006). A forquilha de replicação também envolve a chaperona de histona FACT que interage diretamente com os dímeros de histonas H2A-H2B e H3-H4 promovendo a montagem e desmontagem do nucleossomo (Abe, Sugimura et al. 2011). A proteína MCM10 se liga ao complexo permitindo a ligação de Polimerase-α Primase para a síntese da sequência de RNA iniciadora da replicação (Alabert and Groth 2012).

Estes genes relacionados a replicação do DNA encontram-se diferencialmente expressos principalmente após 24 horas de tratamento (Figura 17), e alguns permanecem com este mesmo padrão de expressão após 48 horas de tratamento. Com isso levantamos a hipótese de que o iHDAC esteja induzindo de forma indireta a replicação de DNA no parasita, por alterar a expressão de genes com importante papel na regulação da forquilha de replicação e início da replicação, bem como por alterar a deposição de histonas acetiladas na cromatina.

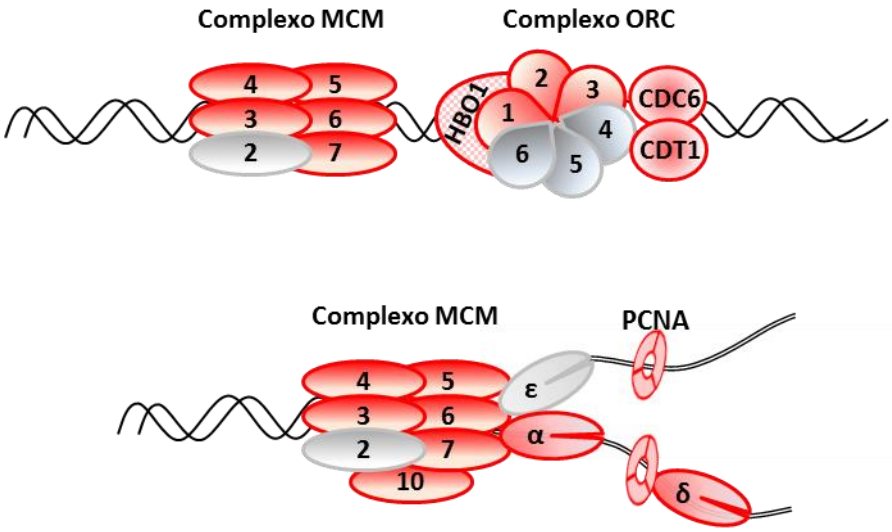

Figura 17: Representação de proteínas da maquinaria de replicação de DNA com expressão gênica alterada em esquistossômulos após tratamento com iHDAC. Genes que pertencem à maquinaria de replicação do DNA, como complexo MCM, complexo ORC e Polimerases tiveram a expressão induzida com inibição de HDACs em 24 horas de tratamento. O estado de acetilação da cromatina regula a replicação do DNA, modulando a associação de nucleossomos e proteínas de complexos.

A deposição de histonas na cromatina recém-sintetizada está associada a diacetilação da histona H4 na K5 e K12, e estas marcas são também encontradas associadas com a chaperona de histona ASF1, responsável pelo transporte para o núcleo da H3 e H4 (Sobel, Cook et al. 1995, Jasencakova, Scharf et al. 2010). Esta chaperona de histona, ao contrário das outras proteínas descritas anteriormente, está com a expressão inibida após 48 horas de tratamento com o iHDAC em esquistossômulos. Outras marcas de histonas associadas ao DNA são H3K14 e K18 acetiladas que evitam a monometilação da H3K9 o que poderia levar a cromatina ao seu estado de repressão (Alvarez, Munoz et al. 2011). Além disso, se sabe que a falha na remoção de marcas de histonas relacionadas a deposição também estão associadas a perda do silenciamento de *loci* assim como rompimento da heterocromatina pericentromérica (Ekwall, Olsson et al. 1997). Com a quantificação de histona modificada em resíduos específicos no esquistossômulo foi possível observar um aumento acentuado de acetilação em H3K9 e H4K5 após o tratamento com iHDAC, o que pode estar sinalizando a replicação do DNA. Além de

tudo, o aumento na expressão gênica de proteínas de origem do complexo de replicação, progressão da forquilha e dinâmica de histonas, além da hiperacetilação de marcas específicas de histonas, são todos indicativos que fomentam a hipótese de haver abertura de cromatina devido ao tratamento com iHDAC induzindo a célula à replicação de DNA.

O mecanismo de deacetilação é importante para a maturação da cromatina nascente, e necessário para a progressão da forquilha de replicação e estabilidade. Se sabe que a desregulação das funções das HDACs por efeito do iHDAC diretamente afeta a replicação e gera reduções das forquilhas de replicação (Conti, Leo et al. 2010). O homotrímero PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) como componente central da forquilha de replicação por orquestrar a síntese de DNA e montagem dos nucleossomos, também recruta HDACs para a maturação da cromatina, assim como outros fatores de maturação (Alabert and Groth 2012). Detectamos o gene PCNA com sua expressão aumentada com o tratamento de iHDAC em esquistossômulos, e possivelmente este aumento pode estar afetando os anéis de coesina na passagem da forquilha. Outra função importante de PCNA é estimular a atividade da DNA Polimerase Delta que tem a função de extensão na replicação. As três polimerases envolvidas na replicação da cromatina, Pol alpha, Pol épsilon e Pol delta, tiveram sua expressão alterada com o tratamento de iHDAC, sendo que a Pol alpha e Pol delta foram detectadas com a expressão aumentada em diferentes tempos, e a Pol épsilon teve a expressão reprimida no primeiro tempo de tratamento. Portanto, a inibição de HDACs pode estar influenciando diretamente na replicação da cromatina por aumentar a expressão de genes componentes da maquinaria da replicação celular.

Na literatura também se discute que a inibição de HDAC na replicação da cromatina leva à diminuição da velocidade da forquilha de replicação, criando a possibilidade de dano ao DNA pelo estado de hiperacetilação da cromatina e exposição do DNA (Conti, Leo et al. 2010). Como já discutido anteriormente, observamos um aumento significativo de acetilação em

algumas marcas específicas de histonas em parasitas tratados com o iHDAC, e além de alterar a expressão gênica de importantes genes, a hiperacetilação de histona pode estar afetando diretamente outras funções celulares como reparo do DNA. O reparo de DNA por quebra de fitas duplas (*Double-strand break – DBS)* é coordenado por acetilação de histonas H2A.X, H3 e H4 (Gong and Miller 2013). Algumas modificações de histonas são especificamente afetadas por quebra de DNA, e podem participar do processo de resposta ao dano de DNA, como a H3K56 que é deacetilada por HDAC1 e HDAC2 recrutadas nos sítios com dano no DNA, e com isso permitindo o reparo por união terminal não-homóloga (*Non-Homologous End-Joining - NHEJ*) (Miller, Tjeertes et al. 2010). Também já foi observado na literatura que o aumento da acetilação em H2A e H4 permitem a abertura rápida da cromatina nas regiões de dano ao DNA, e esta acetilação se entende por centenas de kilobases além do ponto inicial (Downs, Allard et al. 2004, Murr, Loizou et al. 2006). Todos os complexos de reparo do DNA possuem HATs e HDACs, regulando os níveis de acetilação nas marcas de histonas (Gong and Miller 2013). Assim, com a inibição de HDACs possivelmente levando à indução de replicação de DNA e exposição a danos, os processos de reparo também estão sendo diretamente afetados por desorganização da sinalização de marcas de histonas no parasita, podendo desencadear o processo de morte celular.

Outro grupo de genes interessante com a expressão afetada pelo tratamento com iHDAC foi o dos genes codificadores de proteínas que possuem motivos *histone readers*. Estas proteínas reconhecem especificamente as MPTs e recrutam componentes de sinalização nuclear da cromatina, que medeiam processos como transcrição, replicação do DNA, resposta ao dano de DNA e remodelamento de cromatina (Musselman, Lalonde et al. 2012). Entre as proteínas *histone readers*, destacamos EED Smp_165220 com domínio WD40 capaz de identificar H3K27me3 e H3K9me3 e CBX Smp_174840 com cromo-domínio capaz de reconhecer H3K9me3 e me2, H3K27me3 e me2 (Musselman, Lalonde et al. 2012). EED faz parte do

complexo PRC2 juntamente com SUZ12, e sua interação com EZH2 permite a atividade catalítica de metiltransferase do domínio SET de EZH2 (Pasini, Bracken et al. 2004, Han, Xing et al. 2007). EZH2 ao modular a cromatina induz em humanos o silenciamento de genes relacionados a ciclo celular, senescência, diferenciação celular e câncer, e sua expressão elevada está intimamente ligada a malignidade de tumor e mau prognóstico (Sauvageau and Sauvageau 2010). Desta forma EZH2 se tornou um alvo para drogas de tratamento de câncer, e alguns inibidores estão em desenvolvimento e em fase de testes (McCabe and Creasy 2014).

Com a expressão de SmEED inibida por TSA, a análise de interações de genes e proteínas usando a ferramenta *Ingenuity* apontou para uma possível inibição da atividade enzimática de SmEZH2, evidenciada pela alteração da regulação dos genes *downstream.* Desta forma, o parasita na presença do iHDAC TSA, após a indução de hiperacetilação de histonas e abertura de cromatina, estaria com a atividade de PRC2 reduzida, não silenciando os seus genes sabidamente alvos. Com essa observação em mãos, levantamos a hipótese de que ao se adicionar um iEZH2 juntamente com o iHDAC poderiamos reduzir ainda mais a atividade do complexo PRC2, desencadeando um efeito maior de desregulação da cromatina e induzindo a morte. A partir desta hipótese, testamos o inibidor GSK343, que já havia sido descrito em humanos como sendo um competidor do cofator SAM de hEZH2 no domínio SET (Antonysamy, Condon et al. 2013), e observamos que somente o iEZH2 não induzia grande mortalidade em esquistossômulos. Porém ao adicionar o iHDAC (TSA), notamos um aumento significativo da mortalidade, indicando um possível sinergismo entre TSA e GSK343, supostamente pelo mecanismo proposto acima. Assim, acreditamos que inibidores de enzimas modificadoras de cromatina podem atuar por alterar a expressão de genes e desregular mecanismos da cromatina, além de agir sinergicamente para desencadear a morte celular no parasita.

Ao contrário do TSA que não possui afinidade por uma única HDAC, GSK343 foi desenvolvido para inibir especificamente a hEZH2 (Verma, Tian et al. 2012, Antonysamy, Condon et al. 2013). A alta similaridade entre SmEZH2 e hEZH2 permitiram gerar um modelo *in silico* da estrutura da histona metiltransferase de *S. mansoni*. Com o modelo do domínio SET testamos se GSK343 poderia se ligar à SmEZH2, e verificamos que a droga pode estar inibindo a enzima por competição com o cofator SAM, e com isso aumentando a mortalidade dos esquistossômulos como mostrado no ensaio de sinergismo de drogas. Na literatura há indicação de quais aminoácidos de hEZH2 interagem com SAM (Figura 15) (Antonysamy, Condon et al. 2013), e ao analisarmos *in silico* a ligação de SAM com SmEZH2 notamos que alguns aminoácidos são os mesmos que interagem com SAM em hEZH2, porém a maioria dos aminoácidos são distintos, indicando que SAM interage na mesma região da proteína mas mantém interações com resíduos diferentes. Ao realizarmos esta mesma análise com GSK343 vimos que há um grande compartilhamento de aminoácidos de SmEZH2 que interagem com a droga e com o cofator, indicando a possível inibição competitiva. Os dados de sinergismo de droga entre o iHDAC e iEZH2 juntamente com os dados de acoplamento de GSK343 em SmEZH2 agindo por inibição competitiva, sugerem esta HMT como novo alvo epigenético a ser explorado no desenvolvimento de drogas para tratamento da esquistossomose.

6. Conclusão

A análise de histonas de *S. mansoni* permitiu identificar quais variantes estão presentes no genoma do parasita, identificando predições gênicas com evidência de transcrição, porém com arquitetura equivocada. Assim, foi possível corrigir algumas predições gênicas e catalogá-las por similaridade como homólogas a outras histonas. Adicionalmente identificamos a sequência responsável por formar *hairpin* no 3´UTR do mRNA de histonas em *S. mansoni.*

A inibição de HDACs nos vermes adultos se mostrou capaz de aumentar os níveis de acetilação global da histona H3 nos resíduos de lisina 9 e 14, e histona H4 na lisina 5, sendo estas marcas de histonas relacionadas diretamente à ativação da transcrição. A marca de repressão da transcrição H3K27me3 não foi afetada com o tratamento, indicando que apesar desta modificação não ser alvo de HDACs, o parasita não está induzindo uma resposta compensatória para inibição da transcrição. Entre as centenas de genes afetados com o tratamento com iHDAC de esquistossômulos, o perfil de modificação da expressão de genes se mostrou bimodal, com indução e inibição da transcrição, indicando um efeito possivelmente indireto, induzido pela hiperacetilação de histonas. A hiperacetilação de histonas por inibição de HDACs induziu o aumento da expressão de genes relacionados a replicação de DNA, tais como complexo MCM e ORC, porém estes fatores orquestrados de forma desorganizada possivelmente induziram um estresse celular e morte.

Além de alterar a expressão de genes de replicação de DNA, foi possível predizer que após o tratamento com iHDAC a atividade enzimática do complexo PRC2 estaria reduzida, a partir da análise *in silico* da expressão de genes *downstream* de EHZ2; já que não houve alteração da marca H3K27me3 após o tratamento com iHDAC, esta diminuição da atividade deve estar relacionada à diminuição da expressão de EED, o regulador do complexo PRC2, que foi detectada na presença de iHDAC. O tratamento dos esquistossômulos com o inibidor de EHZ2 GSK343 mostrou um sinergismo com a inibição de HDAC, causando um aumento

significativo na mortalidade de esquistossômulos. Este possível novo alvo de drogas, a enzima SmEZH2, foi analisado computacionalmente e por ensaio *in silico* de acoplamento se mostrou capaz de ligar com GSK343 e com o cofator SAM na mesma região e com afinidades próximas às da enzima humana, sugerindo que GSK343 é um inibidor competitivo, e apontando assim para o interesse de desenvolvimento de novas drogas específicas para SmEZH2.

7. Referências

Abe, T., K. Sugimura, Y. Hosono, Y. Takami, M. Akita, A. Yoshimura, S. Tada, T. Nakayama, H. Murofushi, K. Okumura, S. Takeda, M. Horikoshi, M. Seki and T. Enomoto (2011). "The histone chaperone facilitates chromatin transcription (FACT) protein maintains normal replication fork rates." J Biol Chem **286**(35): 30504-30512.

Alabert, C. and A. Groth (2012). "Chromatin replication and epigenome maintenance." Nat Rev Mol Cell Biol **13**(3): 153-167.

Alberini, C. M. (2009). "Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity." Physiol Rev **89**(1): 121-145.

Almeida, G. T., M. S. Amaral, F. C. Beckedorff, J. P. Kitajima, R. Demarco and S. Verjovski-Almeida (2011). "Exploring the *Schistosoma mansoni* adult male transcriptome using RNA-seq." Exp Parasitol.

Almeida, G. T., R. C. Lage, L. Anderson, T. M. Venancio, H. I. Nakaya, P. A. Miyasato, H. K. Rofatto, A. Zerlotini, E. Nakano, G. Oliveira and S. Verjovski-Almeida (2015). "Synergy of Omeprazole and Praziquantel In Vitro Treatment against *Schistosoma mansoni* Adult Worms." PLoS Negl Trop Dis **9**(9): e0004086.

Alvarez, F., F. Munoz, P. Schilcher, A. Imhof, G. Almouzni and A. Loyola (2011). "Sequential establishment of marks on soluble histones H3 and H4." J Biol Chem **286**(20): 17714-17721.

Anderson, L., M. S. Amaral, F. Beckedorff, L. F. Silva, B. Dazzani, K. C. Oliveira, G. T. Almeida, M. R. Gomes, D. S. Pires, J. C. Setubal, R. DeMarco and S. Verjovski-Almeida (2015). "*Schistosoma mansoni* Egg, Adult Male and Female Comparative Gene Expression Analysis and Identification of Novel Genes by RNA-Seq." PLoS Negl Trop Dis **9**(12): e0004334.

Anderson, L., R. J. Pierce and S. Verjovski-Almeida (2012). "*Schistosoma mansoni* histones: from transcription to chromatin regulation; an in silico analysis." Mol Biochem Parasitol **183**(2): 105-114.

Antonysamy, S., B. Condon, Z. Druzina, J. B. Bonanno, T. Gheyi, F. Zhang, I. MacEwan, A. Zhang, S. Ashok, L. Rodgers, M. Russell and J. Gately Luz (2013). "Structural context of disease-associated mutations and putative mechanism of autoinhibition revealed by X-ray crystallographic analysis of the EZH2-SET domain." PLoS One **8**(12): e84147.

Armstrong, J. C. (1965). "Mating Behavior and Development of Schistosomes in the Mouse." J Parasitol **51**: 605-616.

Azzi, A., C. Cosseau and C. Grunau (2009). "*Schistosoma mansoni*: developmental arrest of miracidia treated with histone deacetylase inhibitors." Exp Parasitol **121**(3): 288-291.

Barratt, M. J., C. A. Hazzalin, E. Cano and L. C. Mahadevan (1994). "Mitogen-stimulated phosphorylation of histone H3 is targeted to a small hyperacetylation-sensitive fraction." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(11): 4781-4785.

Battle, D. J. and J. A. Doudna (2001). "The stem-loop binding protein forms a highly stable and specific complex with the 3' stem-loop of histone mRNAs." RNA **7**(1): 123-132.

Bauer, S., S. Grossmann, M. Vingron and P. N. Robinson (2008). "Ontologizer 2.0--a multifunctional tool for GO term enrichment analysis and data exploration." Bioinformatics **24**(14): 1650-1651.

REFERÊNCIAS

Baylin, S. B. and J. E. Ohm (2006). "Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction?" Nat Rev Cancer **6**(2): 107-116.

Beckmann, S. and C. G. Grevelding (2010). "Imatinib has a fatal impact on morphology, pairing stability and survival of adult *Schistosoma mansoni* in vitro." Int J Parasitol **40**(5): 521-526.

Beckmann, S., T. Quack, C. Burmeister, C. Buro, T. Long, C. Dissous and C. G. Grevelding (2010). "*Schistosoma mansoni:* signal transduction processes during the development of the reproductive organs." Parasitology **137**(3): 497-520.

Berger, S. L., T. Kouzarides, R. Shiekhattar and A. Shilatifard (2009). "An operational definition of epigenetics." Genes Dev **23**(7): 781-783.

Berman, H. M., J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov and P. E. Bourne (2000). "The Protein Data Bank." Nucleic Acids Res **28**(1): 235-242.

Berriman, M., B. J. Haas, P. T. LoVerde, R. A. Wilson, G. P. Dillon, G. C. Cerqueira, S. T. Mashiyama, B. Al-Lazikani, L. F. Andrade, P. D. Ashton, M. A. Aslett, D. C. Bartholomeu, G. Blandin, C. R. Caffrey, A. Coghlan, R. Coulson, T. A. Day, A. Delcher, R. DeMarco, A. Djikeng, T. Eyre, J. A. Gamble, E. Ghedin, Y. Gu, C. Hertz-Fowler, H. Hirai, Y. Hirai, R. Houston, A. Ivens, D. A. Johnston, D. Lacerda, C. D. Macedo, P. McVeigh, Z. Ning, G. Oliveira, J. P. Overington, J. Parkhill, M. Pertea, R. J. Pierce, A. V. Protasio, M. A. Quail, M. A. Rajandream, J. Rogers, M. Sajid, S. L. Salzberg, M. Stanke, A. R. Tivey, O. White, D. L. Williams, J. Wortman, W. Wu, M. Zamanian, A. Zerlotini, C. M. Fraser-Liggett, B. G. Barrell and N. M. El-Sayed (2009). "The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*." Nature **460**(7253): 352-358.

Bertin, B., F. Oger, J. Cornette, S. Caby, C. Noel, M. Capron, M. R. Fantappie, F. D. Rumjanek and R. J. Pierce (2006). "*Schistosoma mansoni* CBP/p300 has a conserved domain structure and interacts functionally with the nuclear receptor SmFtz-F1." Mol Biochem Parasitol **146**(2): 180-191.

Boissier, J., F. Cosledan, A. Robert and B. Meunier (2009). "In vitro activities of trioxaquines against *Schistosoma mansoni*." Antimicrob Agents Chemother **53**(11): 4903-4906.

Bolden, J. E., M. J. Peart and R. W. Johnstone (2006). "Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors." Nat Rev Drug Discov **5**(9): 769-784.

Brindley, P. J. and A. Sher (1987). "The chemotherapeutic effect of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is dependent on host antibody response." J Immunol **139**(1): 215-220.

Brunmeir, R., S. Lagger and C. Seiser (2009). "Histone deacetylase HDAC1/HDAC2-controlled embryonic development and cell differentiation." Int J Dev Biol **53**(2-3): 275-289.

Burke, M. L., M. K. Jones, G. N. Gobert, Y. S. Li, M. K. Ellis and D. P. McManus (2009). "Immunopathogenesis of human schistosomiasis." Parasite Immunol **31**(4): 163-176.

Caby, S. and R. J. Pierce (2009). "Quantitative chromatin immunoprecipitation (Q-ChIP) applied to *Schistosoma mansoni*." Mol Biochem Parasitol **166**(1): 77-80.

Cass, C. L., J. R. Johnson, L. L. Califf, T. Xu, H. J. Hernandez, M. J. Stadecker, J. R. Yates, 3rd and D. L. Williams (2007). "Proteomic analysis of Schistosoma mansoni egg secretions." Mol Biochem Parasitol **155**(2): 84-93.

Celic, I., H. Masumoto, W. P. Griffith, P. Meluh, R. J. Cotter, J. D. Boeke and A. Verreault (2006). "The sirtuins hst3 and Hst4p preserve genome integrity by controlling histone h3 lysine 56 deacetylation." Curr Biol **16**(13): 1280-1289.

REFERÊNCIAS

Chen, V. B., W. B. Arendall, 3rd, J. J. Headd, D. A. Keedy, R. M. Immormino, G. J. Kapral, L. W. Murray, J. S. Richardson and D. C. Richardson (2010). "MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **66**(Pt 1): 12-21.

Chow, C. M., A. Georgiou, H. Szutorisz, A. Maia e Silva, A. Pombo, I. Barahona, E. Dargelos, C. Canzonetta and N. Dillon (2005). "Variant histone H3.3 marks promoters of transcriptionally active genes during mammalian cell division." EMBO Rep **6**(4): 354-360.

Colley, D. G., A. L. Bustinduy, W. E. Secor and C. H. King (2014). "Human schistosomiasis." Lancet **383**(9936): 2253-2264.

Colovos, C. and T. O. Yeates (1993). "Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions." Protein Sci **2**(9): 1511-1519.

Consortium, E. P. (2012). "An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome." Nature **489**(7414): 57-74.

Conti, C., E. Leo, G. S. Eichler, O. Sordet, M. M. Martin, A. Fan, M. I. Aladjem and Y. Pommier (2010). "Inhibition of histone deacetylase in cancer cells slows down replication forks, activates dormant origins, and induces DNA damage." Cancer Res **70**(11): 4470-4480.

Cosseau, C., A. Azzi, K. Smith, M. Freitag, G. Mitta and C. Grunau (2009). "Native chromatin immunoprecipitation (N-ChIP) and ChIP-Seq of *Schistosoma mansoni:* Critical experimental parameters." Mol Biochem Parasitol **166**(1): 70-76.

Davila Lopez, M. and T. Samuelsson (2008). "Early evolution of histone mRNA 3' end processing." RNA **14**(1): 1-10.

de Moraes Maciel, R., R. F. da Costa, F. M. de Oliveira, F. D. Rumjanek and M. R. Fantappie (2008). "Protein acetylation sites mediated by *Schistosoma mansoni* GCN5." Biochem Biophys Res Commun **370**(1): 53-56.

de Moraes Maciel, R., D. L. de Silva Dutra, F. D. Rumjanek, L. Juliano, M. A. Juliano and M. R. Fantappie (2004). "*Schistosoma mansoni* histone acetyltransferase GCN5: linking histone acetylation to gene activation." Mol Biochem Parasitol **133**(1): 131-135.

Doenhoff, M. J., D. Cioli and J. Utzinger (2008). "Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis." Curr Opin Infect Dis **21**(6): 659-667.

Dominski, Z., L. X. Zheng, R. Sanchez and W. F. Marzluff (1999). "Stem-loop binding protein facilitates 3'-end formation by stabilizing U7 snRNP binding to histone pre-mRNA." Mol Cell Biol **19**(5): 3561-3570.

Downs, J. A., S. Allard, O. Jobin-Robitaille, A. Javaheri, A. Auger, N. Bouchard, S. J. Kron, S. P. Jackson and J. Cote (2004). "Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites." Mol Cell **16**(6): 979-990.

Dubois, F., S. Caby, F. Oger, C. Cosseau, M. Capron, C. Grunau, C. Dissous and R. J. Pierce (2009). "Histone deacetylase inhibitors induce apoptosis, histone hyperacetylation and up-regulation of gene transcription in *Schistosoma mansoni*." Mol Biochem Parasitol **168**(1): 7-15.

Dudoit, S., R. C. Gentleman and J. Quackenbush (2003). "Open source software for the analysis of microarray data." Biotechniques **Suppl**: 45-51.

Ekwall, K., T. Olsson, B. M. Turner, G. Cranston and R. C. Allshire (1997). "Transient inhibition of histone deacetylation alters the structural and functional imprint at fission yeast centromeres." Cell **91**(7): 1021-1032.

Fairfax, K., M. Nascimento, S. C. Huang, B. Everts and E. J. Pearce (2012). "Th2 responses in schistosomiasis." Semin Immunopathol **34**(6): 863-871.

Fang, Z., J. Martin and Z. Wang (2012). "Statistical methods for identifying differentially expressed genes in RNA-Seq experiments." Cell Biosci **2**(1): 26.

Fishelson, Z., P. Amiri, D. S. Friend, M. Marikovsky, M. Petitt, G. Newport and J. H. McKerrow (1992). "*Schistosoma mansoni:* cell-specific expression and secretion of a serine protease during development of cercariae." Exp Parasitol **75**(1): 87-98.

Fraga, M. F., E. Ballestar, A. Villar-Garea, M. Boix-Chornet, J. Espada, G. Schotta, T. Bonaldi, C. Haydon, S. Ropero, K. Petrie, N. G. Iyer, A. Perez-Rosado, E. Calvo, J. A. Lopez, A. Cano, M. J. Calasanz, D. Colomer, M. A. Piris, N. Ahn, A. Imhof, C. Caldas, T. Jenuwein and M. Esteller (2005). "Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer." Nat Genet **37**(4): 391-400.

Gong, F. and K. M. Miller (2013). "Mammalian DNA repair: HATs and HDACs make their mark through histone acetylation." Mutat Res **750**(1-2): 23-30.

Greenberg, R. M. (2013). "New approaches for understanding mechanisms of drug resistance in schistosomes." Parasitology **140**(12): 1534-1546.

Griffiths-Jones, S., A. Bateman, M. Marshall, A. Khanna and S. R. Eddy (2003). "Rfam: an RNA family database." Nucleic Acids Res **31**(1): 439-441.

Gryseels, B. (2012). "Schistosomiasis." Infect Dis Clin North Am **26**(2): 383-397.

Han, Z., X. Xing, M. Hu, Y. Zhang, P. Liu and J. Chai (2007). "Structural basis of EZH2 recognition by EED." Structure **15**(10): 1306-1315.

Henikoff, S. (2008). "Nucleosome destabilization in the epigenetic regulation of gene expression." Nat Rev Genet **9**(1): 15-26.

Howe, K. L., B. J. Bolt, S. Cain, J. Chan, W. J. Chen, P. Davis, J. Done, T. Down, S. Gao, C. Grove, T. W. Harris, R. Kishore, R. Lee, J. Lomax, Y. Li, H. M. Muller, C. Nakamura, P. Nuin, M. Paulini, D. Raciti, G. Schindelman, E. Stanley, M. A. Tuli, K. Van Auken, D. Wang, X. Wang, G. Williams, A. Wright, K. Yook, M. Berriman, P. Kersey, T. Schedl, L. Stein and P. W. Sternberg (2016). "WormBase 2016: expanding to enable helminth genomic research." Nucleic Acids Res **44**(D1): D774-780.

Huang, H. C., Y. Niu and L. X. Qin (2015). "Differential Expression Analysis for RNA-Seq: An Overview of Statistical Methods and Computational Software." Cancer Inform **14**(Suppl 1): 57-67.

Iizuka, M., T. Matsui, H. Takisawa and M. M. Smith (2006). "Regulation of replication licensing by acetyltransferase Hbo1." Mol Cell Biol **26**(3): 1098-1108.

Jasencakova, Z., A. N. Scharf, K. Ask, A. Corpet, A. Imhof, G. Almouzni and A. Groth (2010). "Replication stress interferes with histone recycling and predeposition marking of new histones." Mol Cell **37**(5): 736-743.

Jenuwein, T. and C. D. Allis (2001). "Translating the histone code." Science **293**(5532): 1074-1080.

Jiz, M. A., H. Wu, R. Olveda, B. Jarilla and J. D. Kurtis (2015). "Development of Paramyosin as a Vaccine Candidate for Schistosomiasis." Front Immunol **6**: 347.

Joshi, A. A. and K. Struhl (2005). "Eaf3 chromodomain interaction with methylated H3-K36 links histone deacetylation to Pol II elongation." Mol Cell **20**(6): 971-978.

REFERÊNCIAS

Keene, W. E., K. H. Jeong, J. H. McKerrow and Z. Werb (1983). "Degradation of extracellular matrix by larvae of *Schistosoma mansoni*. II. Degradation by newly transformed and developing schistosomula." Lab Invest **49**(2): 201-207.

Keiser, J., J. Chollet, S. H. Xiao, J. Y. Mei, P. Y. Jiao, J. Utzinger and M. Tanner (2009). "Mefloquine--an aminoalcohol with promising antischistosomal properties in mice." PLoS Negl Trop Dis **3**(1): e350.

Khorasanizadeh, S. (2004). "The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation." Cell **116**(2): 259-272.

King, C. H., S. K. Olbrych, M. Soon, M. E. Singer, J. Carter and D. G. Colley (2011). "Utility of repeated praziquantel dosing in the treatment of schistosomiasis in high-risk communities in Africa: a systematic review." PLoS Negl Trop Dis **5**(9): e1321.

Knobloch, J., R. Winnen, M. Quack, W. Kunz and C. G. Grevelding (2002). "A novel Syk-family tyrosine kinase from *Schistosoma mansoni* which is preferentially transcribed in reproductive organs." Gene **294**(1-2): 87-97.

Kolesnick, R. and Y. A. Hannun (1999). "Ceramide and apoptosis." Trends Biochem Sci **24**(6): 224-225; author reply 227.

Kouzarides, T. (2007). "Chromatin modifications and their function." Cell **128**(4): 693-705.

Krivov, G. G., M. V. Shapovalov and R. L. Dunbrack, Jr. (2009). "Improved prediction of protein side-chain conformations with SCWRL4." Proteins **77**(4): 778-795.

Maas, N. L., K. M. Miller, L. G. DeFazio and D. P. Toczyski (2006). "Cell cycle and checkpoint regulation of histone H3 K56 acetylation by Hst3 and Hst4." Mol Cell **23**(1): 109-119.

Marchler-Bauer, A., M. K. Derbyshire, N. R. Gonzales, S. Lu, F. Chitsaz, L. Y. Geer, R. C. Geer, J. He, M. Gwadz, D. I. Hurwitz, C. J. Lanczycki, F. Lu, G. H. Marchler, J. S. Song, N. Thanki, Z. Wang, R. A. Yamashita, D. Zhang, C. Zheng and S. H. Bryant (2015). "CDD: NCBI's conserved domain database." Nucleic Acids Res **43**(Database issue): D222-226.

Marek, M., S. Kannan, A. T. Hauser, M. Moraes Mourao, S. Caby, V. Cura, D. A. Stolfa, K. Schmidtkunz, J. Lancelot, L. Andrade, J. P. Renaud, G. Oliveira, W. Sippl, M. Jung, J. Cavarelli, R. J. Pierce and C. Romier (2013). "Structural basis for the inhibition of histone deacetylase 8 (HDAC8), a key epigenetic player in the blood fluke *Schistosoma mansoni*." PLoS Pathog **9**(9): e1003645.

Margueron, R., N. Justin, K. Ohno, M. L. Sharpe, J. Son, W. J. Drury, 3rd, P. Voigt, S. R. Martin, W. R. Taylor, V. De Marco, V. Pirrotta, D. Reinberg and S. J. Gamblin (2009). "Role of the polycomb protein EED in the propagation of repressive histone marks." Nature **461**(7265): 762-767.

Margueron, R. and D. Reinberg (2010). "Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information." Nat Rev Genet **11**(4): 285-296.

Margueron, R. and D. Reinberg (2011). "The Polycomb complex PRC2 and its mark in life." Nature **469**(7330): 343-349.

Martins-Melo, F. R., M. C. Pinheiro, A. N. Ramos, Jr., C. H. Alencar, F. S. Bezerra and J. Heukelbach (2014). "Trends in schistosomiasis-related mortality in Brazil, 2000-2011." Int J Parasitol **44**(14): 1055-1062.

Mathe, C., M. F. Sagot, T. Schiex and P. Rouze (2002). "Current methods of gene prediction, their strengths and weaknesses." Nucleic Acids Res **30**(19): 4103-4117.

Mathieson, W. and R. A. Wilson (2010). "A comparative proteomic study of the undeveloped and developed Schistosoma mansoni egg and its contents: the miracidium, hatch fluid and secretions." Int J Parasitol **40**(5): 617-628.

McCabe, M. T. and C. L. Creasy (2014). "EZH2 as a potential target in cancer therapy." Epigenomics **6**(3): 341-351.

McKerrow, J. H., W. E. Keene, K. H. Jeong and Z. Werb (1983). "Degradation of extracellular matrix by larvae of *Schistosoma mansoni*. I. Degradation by cercariae as a model for initial parasite invasion of host." Lab Invest **49**(2): 195-200.

Mechali, M. (2010). "Eukaryotic DNA replication origins: many choices for appropriate answers." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(10): 728-738.

Meneghini, M. D., M. Wu and H. D. Madhani (2003). "Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin." Cell **112**(5): 725-736.

Miller, K. M., J. V. Tjeertes, J. Coates, G. Legube, S. E. Polo, S. Britton and S. P. Jackson (2010). "Human HDAC1 and HDAC2 function in the DNA-damage response to promote DNA nonhomologous end-joining." Nat Struct Mol Biol **17**(9): 1144-1151.

Morey, J. S., J. C. Ryan and F. M. Van Dolah (2006). "Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR." Biol Proced Online **8**: 175-193.

Mountford, A. P. and R. Harrop (1998). "Vaccination against Schistosomiasis: The case for Lung-stage Antigens." Parasitol Today **14**(3): 109-114.

Murr, R., J. I. Loizou, Y. G. Yang, C. Cuenin, H. Li, Z. Q. Wang and Z. Herceg (2006). "Histone acetylation by Trrap-Tip60 modulates loading of repair proteins and repair of DNA double-strand breaks." Nat Cell Biol **8**(1): 91-99.

Musselman, C. A., M. E. Lalonde, J. Cote and T. G. Kutateladze (2012). "Perceiving the epigenetic landscape through histone readers." Nat Struct Mol Biol **19**(12): 1218-1227.

Nightingale, K. P., L. P. O'Neill and B. M. Turner (2006). "Histone modifications: signalling receptors and potential elements of a heritable epigenetic code." Curr Opin Genet Dev **16**(2): 125-136.

Oger, F., F. Dubois, S. Caby, C. Noel, J. Cornette, B. Bertin, M. Capron and R. J. Pierce (2008). "The class I histone deacetylases of the platyhelminth parasite *Schistosoma mansoni*." Biochem Biophys Res Commun **377**(4): 1079-1084.

Oliveira, K. C., M. L. Carvalho, T. M. Venancio, P. A. Miyasato, T. Kawano, R. DeMarco and S. Verjovski-Almeida (2009). "Identification of the *Schistosoma mansoni* TNF-alpha receptor gene and the effect of human TNF-alpha on the parasite gene expression profile." PLoS Negl Trop Dis **3**(12): e556.

Osley, M. A. (1991). "The regulation of histone synthesis in the cell cycle." Annu Rev Biochem **60**: 827-861.

Pandolfi, P. P. (2001). "Histone deacetylases and transcriptional therapy with their inhibitors." Cancer Chemother Pharmacol **48 Suppl 1**: S17-19.

Park, P. J. (2009). "ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology." Nat Rev Genet **10**(10): 669-680.

Pasini, D., A. P. Bracken, M. R. Jensen, E. Lazzerini Denchi and K. Helin (2004). "Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity." EMBO J **23**(20): 4061-4071.

Pathogen-Profile-Dictionary. (2015). "Pathogen Profile Dictionary - *Schistosoma mansoni*." Retrieved December, 2015, from http://www.ppdictionary.com/parasites/mansoni.htm.

Peak, E., I. W. Chalmers and K. F. Hoffmann (2010). "Development and validation of a quantitative, high-throughput, fluorescent-based bioassay to detect schistosoma viability." PLoS Negl Trop Dis **4**(7): e759.

Pearce, E. J. and A. S. MacDonald (2002). "The immunobiology of schistosomiasis." Nat Rev Immunol **2**(7): 499-511.

Perrin, C., J. M. Lepesant, E. Roger, D. Duval, S. Fneich, V. Thuillier, J. F. Alliene, G. Mitta, C. Grunau and C. Cosseau (2013). "*Schistosoma mansoni* mucin gene (SmPoMuc) expression: epigenetic control to shape adaptation to a new host." PLoS Pathog **9**(8): e1003571.

Peterson, W. P. and F. Von Lichtenberg (1965). "Studies on granuloma formation. IV. In vivo antigenicity of schistosome egg antigen in lung tissue." J Immunol **95**(5): 959-965.

Pettersen, E. F., T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng and T. E. Ferrin (2004). "UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis." J Comput Chem **25**(13): 1605-1612.

Pierce, R. J., F. Dubois-Abdesselem, J. Lancelot, L. Andrade and G. Oliveira (2012). "Targeting schistosome histone modifying enzymes for drug development." Curr Pharm Des **18**(24): 3567-3578.

Protasio, A. V., I. J. Tsai, A. Babbage, S. Nichol, M. Hunt, M. A. Aslett, N. De Silva, G. S. Velarde, T. J. Anderson, R. C. Clark, C. Davidson, G. P. Dillon, N. E. Holroyd, P. T. LoVerde, C. Lloyd, J. McQuillan, G. Oliveira, T. D. Otto, S. J. Parker-Manuel, M. A. Quail, R. A. Wilson, A. Zerlotini, D. W. Dunne and M. Berriman (2012). "A systematically improved high quality genome and transcriptome of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*." PLoS Negl Trop Dis **6**(1): e1455.

Reimers, M. and V. J. Carey (2006). "Bioconductor: an open source framework for bioinformatics and computational biology." Methods Enzymol **411**: 119-134.

Rodrigues, J. P., M. Levitt and G. Chopra (2012). "KoBaMIN: a knowledge-based minimization web server for protein structure refinement." Nucleic Acids Res **40**(Web Server issue): W323-328.

Rodriguez-Paredes, M. and M. Esteller (2011). "Cancer epigenetics reaches mainstream oncology." Nat Med **17**(3): 330-339.

Roquis, D., J. M. Lepesant, M. A. Picard, M. Freitag, H. Parrinello, M. Groth, R. Emans, C. Cosseau and C. Grunau (2015). "The Epigenome of *Schistosoma mansoni* Provides Insight about How Cercariae Poise Transcription until Infection." PLoS Negl Trop Dis **9**(8): e0003853.

Roth, S. Y., J. M. Denu and C. D. Allis (2001). "Histone acetyltransferases." Annu Rev Biochem **70**: 81-120.

Santini-Oliveira, M., R. N. Coler, J. Parra, V. Veloso, L. Jayashankar, P. M. Pinto, M. A. Ciol, R. Bergquist, S. G. Reed and M. Tendler (2015). "Schistosomiasis vaccine candidate

Sm14/GLA-SE: Phase 1 safety and immunogenicity clinical trial in healthy, male adults." Vaccine.

Sauvageau, M. and G. Sauvageau (2010). "Polycomb group proteins: multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer." Cell Stem Cell **7**(3): 299-313.

Sayed, A. A., A. Simeonov, C. J. Thomas, J. Inglese, C. P. Austin and D. L. Williams (2008). "Identification of oxadiazoles as new drug leads for the control of schistosomiasis." Nat Med **14**(4): 407-412.

Scully, R. and A. Xie (2013). "Double strand break repair functions of histone H2AX." Mutat Res **750**(1-2): 5-14.

Shechter, D., H. L. Dormann, C. D. Allis and S. B. Hake (2007). "Extraction, purification and analysis of histones." Nat Protoc **2**(6): 1445-1457.

Skelly, P. J. and C. B. Shoemaker (2000). "Induction cues for tegument formation during the transformation of *Schistosoma mansoni* cercariae." Int J Parasitol **30**(5): 625-631.

Sobel, R. E., R. G. Cook, C. A. Perry, A. T. Annunziato and C. D. Allis (1995). "Conservation of deposition-related acetylation sites in newly synthesized histones H3 and H4." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(4): 1237-1241.

Spiegel, S. and S. Milstien (2003). "Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(5): 397-407.

Strahl, B. D. and C. D. Allis (2000). "The language of covalent histone modifications." Nature **403**(6765): 41-45.

Talbert, P. B. and S. Henikoff (2010). "Histone variants--ancient wrap artists of the epigenome." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(4): 264-275.

Thiagalingam, S., K. H. Cheng, H. J. Lee, N. Mineva, A. Thiagalingam and J. F. Ponte (2003). "Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code." Ann N Y Acad Sci **983**: 84-100.

Trelle, M. B., A. M. Salcedo-Amaya, A. M. Cohen, H. G. Stunnenberg and O. N. Jensen (2009). "Global histone analysis by mass spectrometry reveals a high content of acetylated lysine residues in the malaria parasite Plasmodium falciparum." J Proteome Res **8**(7): 3439-3450.

Trojer, P. and D. Reinberg (2006). "Histone lysine demethylases and their impact on epigenetics." Cell **125**(2): 213-217.

Trott, O. and A. J. Olson (2010). "AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading." J Comput Chem **31**(2): 455-461.

Tsang-Pai, L. and Y. Pei-Ming (2015). "Autophagic effect of SAM-competitive EZH2 inhibitors on cancer cells." Cancer Cell & Microenvironment **2**(1): 4.

Tusher, V. G., R. Tibshirani and G. Chu (2001). "Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(9): 5116-5121.

Verjovski-Almeida, S., R. DeMarco, E. A. Martins, P. E. Guimaraes, E. P. Ojopi, A. C. Paquola, J. P. Piazza, M. Y. Nishiyama, Jr., J. P. Kitajima, R. E. Adamson, P. D. Ashton, M. F. Bonaldo, P. S. Coulson, G. P. Dillon, L. P. Farias, S. P. Gregorio, P. L. Ho, R. A. Leite, L. C. Malaquias, R. C. Marques, P. A. Miyasato, A. L. Nascimento, F. P. Ohlweiler, E. M. Reis, M. A. Ribeiro, R. G. Sa, G. C. Stukart, M. B. Soares, C. Gargioni, T. Kawano, V. Rodrigues, A. M. Madeira, R. A. Wilson, C. F. Menck, J. C. Setubal, L. C. Leite and E. Dias-

Neto (2003). "Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*." Nat Genet **35**(2): 148-157.

Verma, S. K., X. Tian, L. V. LaFrance, C. Duquenne, D. P. Suarez, K. A. Newlander, S. P. Romeril, J. L. Burgess, S. W. Grant, J. A. Brackley, A. P. Graves, D. A. Scherzer, A. Shu, C. Thompson, H. M. Ott, G. S. Aller, C. A. Machutta, E. Diaz, Y. Jiang, N. W. Johnson, S. D. Knight, R. G. Kruger, M. T. McCabe, D. Dhanak, P. J. Tummino, C. L. Creasy and W. H. Miller (2012). "Identification of Potent, Selective, Cell-Active Inhibitors of the Histone Lysine Methyltransferase EZH2." ACS Med Chem Lett **3**(12): 1091-1096.

Verma, S. K., X. R. Tian, L. V. LaFrance, C. Duquenne, D. P. Suarez, K. A. Newlander, S. P. Romeril, J. L. Burgess, S. W. Grant, J. A. Brackley, A. P. Graves, D. A. Scherzer, A. Shu, C. Thompson, H. M. Ott, G. S. Van Aller, C. A. Machutta, E. Diaz, Y. Jiang, N. W. Johnson, S. D. Knight, R. G. Kruger, M. T. McCabe, D. Dhanak, P. J. Tummino, C. L. Creasy and W. H. Miller (2012). "Identification of Potent, Selective, Cell-Active Inhibitors of the Histone Lysine Methyltransferase EZH2." Acs Medicinal Chemistry Letters **3**(12): 1091-1096.

Wang, Z. F., M. L. Whitfield, T. C. Ingledue, 3rd, Z. Dominski and W. F. Marzluff (1996). "The protein that binds the 3' end of histone mRNA: a novel RNA-binding protein required for histone pre-mRNA processing." Genes Dev **10**(23): 3028-3040.

Webb, B. and A. Sali (2014). "Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER." Curr Protoc Bioinformatics **47**: 5 6 1-5 6 32.

West, A. C. and R. W. Johnstone (2014). "New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment." J Clin Invest **124**(1): 30-39.

WHO. (2015, May 2015). "Schistosomiasis. Word Health Organization; Fact sheet N˚115." from http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/.

Wigler, M., D. Levy and M. Perucho (1981). "The somatic replication of DNA methylation." Cell **24**(1): 33-40.

Wolffe, A. P. and J. J. Hayes (1999). "Chromatin disruption and modification." Nucleic Acids Res **27**(3): 711-720.

Wu, H., H. Zeng, A. Dong, F. Li, H. He, G. Senisterra, A. Seitova, S. Duan, P. J. Brown, M. Vedadi, C. H. Arrowsmith and M. Schapira (2013). "Structure of the catalytic domain of EZH2 reveals conformational plasticity in cofactor and substrate binding sites and explains oncogenic mutations." PLoS One **8**(12): e83737.

Yun, C. S. and H. Nishida (2011). "Distribution of introns in fungal histone genes." PLoS One **6**(1): e16548.

Yun, M., J. Wu, J. L. Workman and B. Li (2011). "Readers of histone modifications." Cell research **21**(4): 564-578.

Zhang, Y., J. Szustakowski and M. Schinke (2009). "Bioinformatics analysis of microarray data." Methods Mol Biol **573**: 259-284.

Zupkovitz, G., J. Tischler, M. Posch, I. Sadzak, K. Ramsauer, G. Egger, R. Grausenburger, N. Schweifer, S. Chiocca, T. Decker and C. Seiser (2006). "Negative and positive regulation of gene expression by mouse histone deacetylase 1." Mol Cell Biol **26**(21): 7913-7928.

8. Lista de Anexos em CD-ROM

1. Tabela Suplementar: Lista de genes de *S. mansoni* analisados com *microarray*, contendo informação de expressão e teste estatístico de genes diferencialmente expressos para esquistossômulos tratados com TSA nos tempos 12, 24, 48 e 72 horas.

2. Artigo publicado: Anderson, L., R. J. Pierce and S. Verjovski-Almeida (2012). "*Schistosoma mansoni* histones: from transcription to chromatin regulation; an in silico analysis." Mol Biochem Parasitol 183(2): 105-114.

3. Artigo publicado: Anderson, L., M. S. Amaral, F. Beckedorff, L. F. Silva, B. Dazzani, K. C. Oliveira, G. T. Almeida, M. R. Gomes, D. S. Pires, J. C. Setubal, R. DeMarco and S. Verjovski-Almeida (2015). "*Schistosoma mansoni* Egg, Adult Male and Female Comparative Gene Expression Analysis and Identification of Novel Genes by RNA-Seq." PLoS Negl Trop Dis **9**(12): e0004334 doi:10.1371/journal.pntd.0004334

4. Artigo publicado: Almeida, G. T., R. C. Lage, L. Anderson, T. M. Venancio, H. I. Nakaya, P. A. Miyasato, H. K. Rofatto, A. Zerlotini, E. Nakano, G. Oliveira and S. Verjovski-Almeida (2015). "Synergy of Omeprazole and Praziquantel In Vitro Treatment against *Schistosoma mansoni* Adult Worms." PLoS Negl Trop Dis 9(9): e0004086.