

# EPIGENÉTICA NA INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO EM *Schistosoma mansoni*

**Palavras-Chave:** epigenética, *Schistosoma mansoni*, imunoprecipitação da cromatina

**Autoras:**

**Camila Fernandes Correia (Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Unicamp)**

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fernanda Janku Cabral (orientadora) (Instituto de Biologia/Unicamp)**

**Agência Financiadora: Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento do Estado de São Paulo – FAPESP (2021/01885-2) / (2017/07364-9), FAEPEX (2020/2051)**

---

## INTRODUÇÃO:

No Brasil, a esquistossomose é uma doença parasitária causada pela espécie *Schistosoma mansoni* (Rey, 2008) e a infecção é adquirida através do contato com água doce contaminada pelo parasita, por meio da liberação das formas larvais pelo molusco *Biomphalaria glabrata*, que penetram ativamente na pele do indivíduo (Neves, 2011). A epigenética é uma ferramenta atual para desvendar possíveis mecanismos de patogênese em diversas doenças, como a esquistossomose. É definida como uma informação passada de uma geração à outra sem alteração nas sequências de DNA (Waddington, 1956), além de promover alterações na cromatina que podem ser desencadeadas por diversos fatores como dieta, idade, fatores ambientais, doenças e interação social (Mota *et al*, 2020).

A epigenética nas interações parasita-hospedeiro é importante para analisar como os parasitas desenvolvem estratégias para manipular a transcrição de genes do hospedeiro e expressão de proteínas (Cheesman *et al*, 2015), o que já tem sido realizado para outros parasitas intracelulares. A abordagem epigenética é realizada através da análise de modificações pós-traducionais, como a metilação de histonas, o que representa um importante caminho para elucidação de mecanismos patogênicos e alvos terapêuticos em parasitoses.

O perfil imunológico pode estar relacionado com a indução de alterações nas vias de sinalização do parasita e as marcas epigenéticas podem estar relacionadas com as transcrições entre as fases evolutivas do *S. mansoni* (Mota *et al*, 2020). O processo inflamatório característico da doença é a presença de granulomas hepáticos (Jesus, *et al.*, 2004), no qual é controlado por diversas citocinas como, por exemplo, IL-4, IL-5 e IL-13.

O presente estudo visa avaliar a influência epigenética em camundongos da linhagem C57 BLACK/6 durante infecção por *Schistosoma mansoni*, os seus efeitos na expressão gênica através da análise dos genes relacionados à resposta imunológica IL-4, IL-5 e IL-13 do hospedeiro.

## METODOLOGIA:

As etapas iniciais do projeto foram baseadas em experimentos de isolamento e extração de DNA, experimentos de PCR e eletroforese em gel de agarose das amostras, imunoprecipitação da cromatina (ChIP) e infecção experimental dos camundongos. Tais experimentos possibilitarão analisar os possíveis efeitos da infecção experimental de *S. mansoni* na transcrição de citocinas de camundongos e permitir analisar o impacto epigenético ocasionado, através dos experimentos de ChIP

Inicialmente foi realizado os experimentos de isolamento e extração de DNA de amostras de fígado não infectadas com *S. mansoni* com a finalidade de padronizar a amplificação dos oligonucleotídeos que foram comprados para análises posteriores de PCR com as amostras que adquirimos após a infecção, para comparar o perfil de expressão de citocinas nos animais infectados e não infectados pelo parasita. Nessas análises pretendemos verificar a amplificação das amostras e seus respectivos tamanhos. A análise da amplificação dos primers e seu tamanho molecular (pb) foi observada através dos experimentos de eletroforese em gel de agarose, como método de análise das reações de PCR realizadas.

Em seguida foram iniciados os experimentos de padronização da imunoprecipitação da cromatina (ChIP) para verificar se o protocolo adotado seria adequado ao experimento. Esta técnica tem como finalidade avaliar as interações entre proteína e DNA através da imunoprecipitação da cromatina com anticorpos selecionados. Nesta primeira etapa foi realizado as etapas de sonicação das amostras, que é fundamental na fragmentação do DNA em fragmentos de 400 a 700 bp, para a ligação do anticorpo, purificação dos fragmentos e análise por PCR em tempo real. Esta análise foi realizada, como demonstrado na seção Resultados Parciais, e posteriormente será realizada as demais etapas de imunoprecipitação com os anticorpos H3K9ac, H3K9me3 e H3K27me3.

Tais experimentos possibilitarão avaliar as mudanças nas modificações das histonas e obter informações sobre mudanças na expressão gênica, para correlacionar a expressão gênica com as modificações presentes na cromatina. Juntamente com tais experimentos de padronização foi realizada a infecção experimental dos camundongos para obtenção de amostras de fígados infectados por *S. mansoni*, que serão utilizadas para os posteriores experimentos de isolamento e extração de RNA, que está em andamento, para o preparo das amostras para reações de PCR e a correlação da expressão gênica e modificações epigenéticas através do experimento de ChIP.

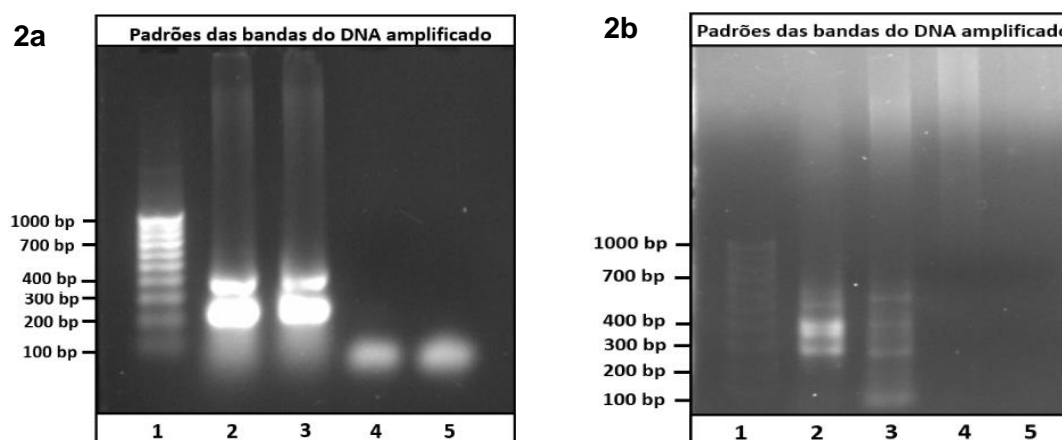


*Infecção experimental de camundongos C57 BLACK/6 fêmeas.  
(Arquivo pessoal)*

## RESULTADOS PARCIAIS:

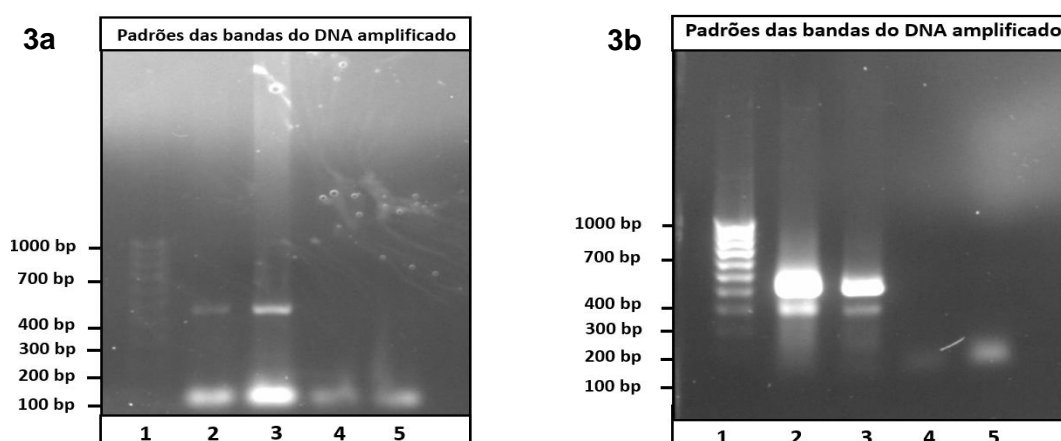
### Padronização da amplificação dos genes que codificam citocinas em DNA de fígado de camundongos

Os resultados obtidos após a realização da eletroforese em gel de agarose podem ser observadas nas imagens abaixo, na qual pode ser estimado a faixa de tamanho de cada fragmento da amostra de DNA analisada. Na imagem **2a** pode ser observado que a faixa de tamanho dos fragmentos de GADPH foi de 250 pb e já a imagem **2b** evidencia que IL-4 apresentou faixa de 400 pb. Na **imagem 3a** pode ser observado que a faixa de tamanho dos fragmentos de IL-5 foi de 500 pb; a **imagem 3b** evidencia que IL-13 apresentou fragmentos de 550 pb. As imagens e suas respectivas legendas podem ser observadas abaixo:



**Figura 2a:** Análise por eletroforese em gel de agarose 1%, com brometo de etídio, dos produtos amplificados por PCR em amostras de fígado de camundongos não infectados. **Legenda:** 1 = peso molecular Bio-Rad (1000 bp); 2 e 3 = primer GADPH; 4 e 5 = controle negativo.

**Figura 2b:** Análise por eletroforese em gel de agarose 1%, com brometo de etídio, dos produtos amplificados por PCR em amostras de fígado de camundongos não infectados. **Legenda:** 1 = padrão peso molecular Bio-Rad (1000 bp); 2 e 3 = primers IL-4; 4 e 5 = controle negativo



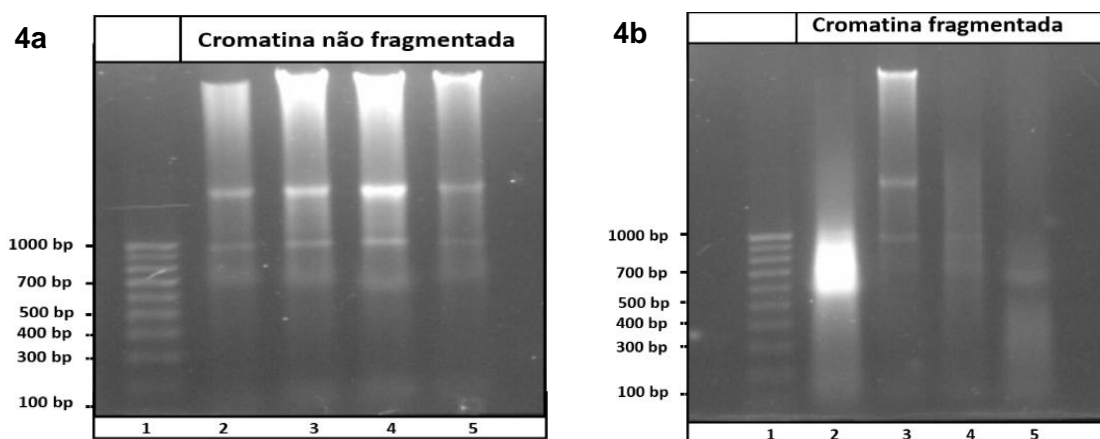
**Figura 3a:** Análise por eletroforese em gel de agarose 1%, com brometo de etídio, dos produtos amplificados por PCR em amostras de fígado de camundongos não infectados. **Legenda:** 1 = peso molecular Bio-Rad (1000 bp); 2 e 3 = primer IL-5; 4 e 5 = controle negativo.

**Figura 3b:** Análise por eletroforese em gel de agarose 1%, com brometo de etídio, dos produtos amplificados por PCR em amostras de fígado de camundongos não infectados. **Legenda:** 1 = peso molecular Bio-Rad (1000 bp); 2 e 3 = primer IL-13; 4 e 5 = controle negativo.

## Padronização da Imunoprecipitação da Cromatina (ChIP)

Os resultados obtidos neste experimento foram similares ao esperado e descritos pelo protocolo seguido (Pirosu *et al*, 2021). Os experimentos foram realizados mais de uma vez e as imagens apresentadas são representativas do melhor resultado obtido. A **imagem 4a** representa os resultados obtidos com as amostras que não foram sonicadas, semelhante ao obtido por Pirosu *et al*, 2021, usadas como controle do experimento, e podemos observar que não foi observado nenhum tipo de fragmentação da cromatina (fragmentos > 1000 bp).

Já a **imagem 4b** representa as amostras que foram sonicadas, nas quais podemos observar diferentes graus de sonicação: a amostra 2 apresentou uma banda mais espessa (faixa de 500-800 bp) que indica a fragmentação esperada, com uma pequena perda do material; a amostra 3 (faixas de 1000 bp e > 1000 bp) representa uma fragmentação considerada não ideal, pois não foi possível observar se ocorreu de fato o isolamento esperado; na amostra 4 podemos observar duas bandas nítidas (700 bp e 1000 bp) correspondentes ao isolamento ótimo, com uma pequena perda do material; por fim, a amostra 5 apresentou uma banda fraca (700 bp), correspondente à etapa de maior perda de material.



**Figura 4a:** Análise por eletroforese em gel de agarose 1%, com brometo de etídio, de amostras de fígado não contaminado para padronização da sonicação. **Legenda:** 1 = peso molecular Bio-Rad (1000 bp); 2 a 5 = amostras de fígado de camundongos não infectados que não passaram por sonicação

**Figura 4b:** Análise por eletroforese em gel de agarose 1%, com brometo de etídio, de amostras de amostras de fígado não contaminado para padronização da sonicação. **Legenda:** 1 = peso molecular Bio-Rad (1000 bp); 2 a 5 = amostras de fígado de camundongos não infectados passaram por sonicação e foram fragmentadas.

## CONCLUSÕES:

Os experimentos de padronização da amplificação dos primers apresentaram resultados satisfatórios e foi possível certificar sua correta amplificação para uso nas próximas etapas do projeto, que já estão em andamento. De acordo com o protocolo utilizado para o experimento de ChIP (Pirosu *et al*, 2021), o tamanho ideal dos fragmentos de fígado seria na faixa de 500-700 pb, para serem detectados por PCR em tempo real. No entanto, de acordo este protocolo, a quantidade de DNA pode variar de acordo com a composição do tecido e é esperado que o tamanho do fragmento também varie, conforme

confirmado pelos resultados apresentados. Os resultados obtidos neste experimento são satisfatórios para a continuidade do experimento de ChIP e PCR em tempo real.

As amostras de fígado dos camundongos infectados apresentaram granulomas visíveis, como era esperado devido à infecção por *S. mansoni*, pois a formação dos granulomas é uma condição presente nesta doença, em 8 semanas de infecção. Já as amostras de fígado dos camundongos não infectados não apresentaram a formação dos granulomas, como esperado.

## BIBLIOGRAFIA

CHEESEMAN K, WEITZMAN JB. **Host-parasite interactions: an intimate epigenetic relationship.** *Cell Microbiol.* 2015;17(8):1121-1132. doi:10.1111/cmi.12471

JESUS, A.R., *et al.* **Association of Type 2 Cytokines with Hepatic Fibrosis in Human *Schistosoma mansoni* Infection.** *Infect. Immun.,* Washington, v. 72, n. 6, p.3391-3397, 2004

MOTA EA, Patrocínio ABD, Rodrigues V, Da Silva JS, Pereira VC, Guerra-Sá R. **Epigenetic and parasitological parameters are modulated in EBi3<sup>-/-</sup> mice infected with *Schistosoma mansoni*.** *PLoS Negl Trop Dis.* 2020;14(2): e0008080. Published 2020 Feb 20. doi: 10.1371/journal.pntd.0008080

NEVES, David Pereira. **Parasitologia humana.** 12. ed. São Paulo, SP: Atheneu, 2011

PIROSU, A., Allweiss, L., Dandri, M. **Chromatin Extraction from Frozen Chimeric Liver Tissue for Chromatin Immunoprecipitation Analysis.** *J. Vis. Exp.* (169), e62179, doi:10.3791/62179 (2021)

REY, Luís. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais.** 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008

WADDINGTON, C. (1956). **Genetic Assimilation of the Bithorax Phenotype.** *Evolution*, 10(1), 1-13. doi:10.2307/2406091