



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA**

NATÁLIA SILVA DA TRINDADE

**ESTUDO DA PROTEÍNA DA HETEROCROMATINA (HP1) COMO CO-REGULADOR
DA EXPRESSÃO GÊNICA E O SEU PAPEL NO DESENVOLVIMENTO DO PARASITA
Schistosoma mansoni E NA INFECÇÃO DO HOSPEDEIRO VERTEBRADO**

CAMPINAS

2024

NATÁLIA SILVA DA TRINDADE

**ESTUDO DA PROTEÍNA DA HETEROCROMATINA (HP1) COMO CO-REGULADOR
DA EXPRESSÃO GÊNICA E O SEU PAPEL NO DESENVOLVIMENTO DO PARASITA
Schistosoma mansoni E NA INFECÇÃO DO HOSPEDEIRO VERTEBRADO**

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como parte
dos requisitos exigidos para a obtenção do Título
de Doutora em Biologia Animal, na área de
Relações Antrópicas, Meio Ambiente e
Parasitologia*

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Janku Cabral

ESTE ARQUIVO DIGITAL
CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA NATÁLIA SILVA DA
TRINDADE E ORIENTADA PELA
PROFA. DRA. FERNANDA JANKU
CABRAL.

CAMPINAS
2024

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

T736e Trindade, Natalia Silva da, 1992-
Estudo da proteína da heterocromatina (HP1) como co-regulador da expressão gênica, o seu papel no desenvolvimento do parasita *Schistosoma mansoni* e na infecção do hospedeiro vertebrado / Natália Silva da Trindade. –Campinas, SP : [s.n.], 2024.

Orientador: Fernanda Janku Cabral.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Instituto de Biologia.

1. Proteína da heterocromatina 1. 2. *Schistosoma mansoni*. 3. ChIP-seq. 4. Regulação da expressão gênica. 5. Modificação pós-traducional. I. Cabral, Fernanda Janku, 1973-. II. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Instituto de Biologia. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Study of heterochromatin protein (HP1) as a co-regulator of gene expression and its role in the development of the parasite *Schistosoma mansoni* and in the infection of the vertebrate host

Palavras-chave em inglês:

Heterochromatin protein 1

Schistosoma mansoni

ChIP-seq

Gene expression regulation

Post-translational modification

Área de concentração: Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia

Titulação: Doutora em Biologia Animal

Banca examinadora:

Fernanda Janku Cabral [Orientador]

Andressa Barban do Patrocínio

Fernanda Ramos Gadelha

Gerhard Wunderlich

Sheila Andrade Penteado Corrêa

Data de defesa: 07-06-2024

Programa de Pós-Graduação: Biologia Animal

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-6479-815X>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/6849523348419011>

Campinas, 07 de junho de 2024.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.(a) Dr.(a). Andressa Barban do Patrocínio

Prof.(a). Dr.(a) Fernanda Ramos Gadelha

Prof.(a) Dr(a). Fernanda Janku Cabral

Prof.(a) Dr(a). Gerhard Wunderlich

Prof.(a) Dr(a). Sheila Andrade Penteado Corrêa

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós Graduação em Biologia Animal do Instituto de Biologia.

Dedico esta pesquisa e toda minha trajetória até
aqui à minha irmã Pâmela (*in memoriam*).
Pessoa ímpar que sempre me apoiou, torceu e
me incentivou, mas que nos deixou tão
precocemente e não pôde ver esse sonho se
realizar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Rita e Carlos, por serem meus maiores exemplos, incentivadores e porto seguro, sem vocês esta conquista seria improvável. Obrigada por serem pais maravilhosos e por acreditarem em mim, mesmo quando eu mesma não acreditava.

Agradeço à minha irmã Karla, ao meu cunhado Gustavo e minha sobrinha Melissa, por estarem sempre presentes, incentivando e apoiando.

Agradeço à minha irmã Pâmela, por ter sido grande incentivadora. Você faz falta!

Agradeço ao meu noivo, Sérgio, por dividir comigo esta jornada desafiadora. Obrigada pelo carinho, compreensão e companheirismo. Seu apoio fez toda a diferença.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Fernanda, que não mediu esforços em tornar esta conquista possível. Obrigada pelos ensinamentos, compreensão, conselhos e amizade. Sem dúvidas você possibilitou-me trilhar um caminho com muitas oportunidades e conhecimentos. Você fez a diferença!

Agradeço ao professor Dr. Christoph Grunau, que me recebeu em seu laboratório na França. Obrigada pela paciência ao ensinar, pela hospitalidade e pelos ensinamentos grandiosos. Muito obrigada!

Agradeço à Prof. Dra Silmara, por toda solicitude que demonstrou durante esses anos.

Agradeço à Prof. Dra. Marlene, que sempre esteve presente no laboratório e sempre com um sorriso no rosto. Obrigada pela gentileza de sempre e pelos ensinamentos.

Agradeço aos alunos que estiveram comigo no laboratório, aprendi muito com vocês. Obrigada pelo entusiasmo e boa vontade de sempre.

Agradeço aos técnicos, Dr. Nilson e Camilo, por cuidarem de todos os detalhes.

Agradeço aos professores, Dr. Danilo e Dr. Adriano, por permitirem a utilização de equipamentos.

Agradeço ao professor Dr. Gerhard pela gentileza em ceder o plasmídeo mCherry para nosso estudo.

Agradeço à banca pela disponibilidade em avaliar meu trabalho.

Agradeço a Dra. Ana Paula Masson e ao Prof. Vitor Faça, da Faculdade de Medicina da USP em Ribeirão Preto, pelas análises de Espectrometria de Massas.

Agradeço a CAPES pela bolsa de Demanda Social que me possibilitou realizar o doutorado e ao CEMEX-Labex pelo auxílio financeiro na França.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço ao Fundo de apoio ao ensino, pesquisa e extensão (FAEPEX) pelo apoio financeiro.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro através do projeto regular 2021/14982-6. Agradeço ao RIVOC France (établissement porteur du défi clé: l'Université de Montpellier, Défi Clé de la Région Occitanie, Défi Clé RIVOC).

Agradeço a todas as pessoas que, indiretamente, me ajudaram e estiveram ao meu lado durante este período.

RESUMO

Schistosoma mansoni é o parasita responsável pela esquistossomose no Brasil e possui um ciclo de vida complexo com alterações morfológicas. O ciclo deste parasita é composto por miracídios, esporocitos, cercárias e vermes adultos. Estas alterações morfológicas entre os estágios são reguladas por modificações pós-traducionais de histonas e co-reguladores transcricionais. Estes co-reguladores juntamente com modificações pós-traducionais são responsáveis por manter ou ativar diferentes estados da cromatina e modificar sua paisagem. Em *S. mansoni* já foram descritos co-reguladores transcricionais, além de modificações de histonas que estão envolvidas no silenciamento transcricional do estágio cercaria. Dentre os co-reguladores transcricionais conhecidos, a proteína da heterocromatina 1 (HP1) desempenha funções de silenciamento da cromatina a partir de ligações à marcas epigenéticas relacionadas a heterocromatina, H3K9me3 e H3K27me3. As funções de HP1 são bem estabelecidas em diversos organismos e já foi descrita em *S. mansoni* como uma proteína co-reguladora relacionada à diferenciação sexual e influenciar na taxa de oviposição. Esta proteína foi descoberta em *Drosophila* e possui avanços neste organismo para HP1, assim, *Drosophila* é um excelente modelo comparativo para os resultados. O objetivo deste estudo foi verificar o papel de *SmHP1* na regulação transcricional nas fases de esporocisto e cercárias em *S. mansoni*, o estabelecimento da metodologia de RNA interferente para o gene *SmHP1* e a influência do silenciamento transiente na oviposição do parasita. A metodologia consistiu em obter bibliotecas de ChIP-seq a partir da técnica de ChIPmentation, estudo *in vivo* com camundongos infectados com esquistossômulos 3 dias *knockdown*, imunoprecipitação seguido de espectrometria de massas com extratos de cercárias e western blot do imunoprecipitado para avaliar a ligação de *SmHP1* com as marcas epigenéticas H3K9me3 e H3K27me3. Para o experimento de ChIP-seq foi necessário utilizar *Drosophila* como modelo comparativo, pois não há dados de sequenciamento disponíveis de *SmHP1* para *S. mansoni*, além da necessidade de avaliar a qualidade do anticorpo anti-HP1. Os nossos resultados possibilitaram mostrar que o enriquecimento da cromatina nos estágios testados, esporocistos e cercárias ocorre de forma não-canônica, ou seja, nas regiões finais no transcrito (TES) e não na região inicial da transcrição (TSS), conforme verificado em *D. melanogaster*, utilizando o mesmo anticorpo. E isso se verifica nos dois estágios do ciclo testados, sugerindo uma tendência a esse tipo de regulação no ciclo de vida do parasita. Os experimentos de *knockdown* do gene *SmHP1* mostraram que, a transcrição desse gene e provavelmente o enriquecimento dessa proteína na cromatina está relacionada ao sistema reprodutor do parasita, visto que uma pequena mudança na expressão do gene *SmHP1* foi capaz de aumentar a capacidade de oviposição do parasita, de forma estatisticamente significativa, sugerindo uma modificação no *fitness* do parasita, comparado com os parasitas controles. Os experimentos realizados envolvendo a imunoprecipitação, utilizando o anticorpo anti-HP1 e a análise por espectrometria de massas, mostraram proteínas candidatas a imunoprecipitarem concomitantemente com HP1 em extratos protéicos de cercárias do parasita. Embora isso aconteça, não foi possível provar que exista uma interação com marcas de histonas que desempenham a função de regulação da expressão gênica do parasita.

Palavras-chave: *S. mansoni*; HP1; ChIPmentation; dsRNA; co-reguladores; modificações pós-traducionais

ABSTRACT

Schistosoma mansoni is the main parasite responsible for schistosomiasis in Brazil and has a complex life cycle with morphological changes during its life cycle. The life cycle of this parasite is composed of the stages of miracidia, sporocytes I and II, cercariae and adult worms. These morphological changes between stages are regulated by post-translational modifications of histones and transcriptional co-regulators. These co-regulators together with post-translational modifications are responsible for maintaining or activating different chromatin states and modifying its landscape. In *S. mansoni*, transcriptional co-regulators have been described, in addition to histone modifications that are involved in the transcriptional silencing of the cercaria stage. Among the known transcriptional co-regulators, the heterochromatin protein 1 (HP1) plays a role in chromatin silencing by binding to heterochromatin-related epigenetic marks, H3K9me3 and H3K27me3. The functions of HP1 are well established in several organisms and have been described in *S. mansoni* as a co-regulatory protein related to sexual differentiation and influencing the oviposition rate. This protein was discovered in *Drosophila* and has advanced expression levels in this organism for HP1, thus *Drosophila* is an excellent comparative model for the results. The aim of this study was to verify the role of SmHP1 in transcriptional regulation in the sporocyst and cercariae stages in *S. mansoni*, the establishment of the RNA interference methodology for the SmHP1 gene and the influence of transient silencing on the oviposition of the parasite. The methodology consisted of obtaining ChIP-seq libraries from the ChIPmentation technique, in vivo study with mice infected with 3-day knockdown schistosomula, immunoprecipitation followed by mass spectrometry with cercariae extracts and western blot of the immunoprecipitate to evaluate the binding of SmHP1 to the epigenetic marks H3K9me3 and H3K27me3. For the ChIP-seq experiment, it was necessary to use *Drosophila* as a comparative model, since there is no sequencing data available for SmHP1 for *S. mansoni*, in addition to the need to evaluate the quality of the anti-HP1 antibody. Our results showed that chromatin enrichment in the tested stages, sporocysts and cercariae, occurs in a non-canonical manner, i.e., in the final regions of the transcript (TES) and not in the initial region of transcription (TSS), as verified in *D. melanogaster*, using the same antibody. And this is verified in both stages of the cycle tested, suggesting a tendency towards this type of regulation in the parasite's life cycle. The SmHP1 gene knockdown experiments showed that the transcription of this gene and probably the enrichment of this protein in chromatin is related to the parasite's reproductive system, since a small change in the expression of the SmHP1 gene was able to increase the parasite's oviposition capacity, in a statistically significant manner, suggesting a modification in the parasite's fitness, compared to the control parasites. Experiments involving immunoprecipitation using the anti-HP1 antibody and mass spectrometry analysis showed candidate proteins to immunoprecipitate concomitantly with HP1 in protein extracts of parasite cercariae. Although this occurs, it was not possible to prove that there is an interaction with known histone marks that play the role of regulating parasite gene expression.

Keywords: *S. mansoni*; HP1; ChIPmentation; dsRNA; co-regulators; post-translational modifications.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição anual da população examinada em unidades da Federação, que são endêmicas, do percentual de positividade e de infecções severas por esquistossomose mansoni, Brasil, 2010-2022	19
Figura 2 – Distribuição da taxa de mortalidade por esquistossomose mansoni, segundo ano e número de óbitos e município de residência, Brasil, 2010-2022	20
Figura 3 – Ciclo de vida do parasita <i>Schistosoma mansoni</i>	22
Figura 4 – Estrutura de um cromossomo e seus componentes	32
Figura 5 – Alinhamento de <i>SmHP1</i> com organismos ortólogos	42
Figura 6 – Resumo das funções de HP1	43
Figura 7 – Mecanismo de ação RNAi	51
Figura 8 – Resumo protocolo de sequenciamento ChIP-seq.....	53
Figura 9 – Comparação técnicas ChIP-seq e ChIPmentation	55
Figura 10 – Experimento <i>in vivo</i> com infecção de esquistossômulos de 3 dias.....	69
Figura 11 – Titulação do anticorpo ab109028 (anti-HP1)	76
Figura 12 – Controle de qualidade após o sequenciamento utilizando a ferramenta FastQC	77
Figura 13 – Alinhamento das sequências de cercárias e esporocistos....	78
Figura 14 – Perfil metagênico e <i>heatmap</i> de <i>SmHP1</i> em torno dos locais finais da transcrição dos estágios de desenvolvimento do ciclo de vida do <i>S. mansoni</i> , cercaria (A) e esporocisto (B)	79
Figura 15 – Perfis metagênicos e <i>Heatmap</i> de <i>Drosophila</i>	81
Figura 16 – <i>Heatmap</i> do enriquecimento de genes nos estágios de desenvolvimento de <i>S. mansoni</i>	82
Figura 17 – Visualização da distribuição dos picos de enriquecimento no cromossomo Z com o programa IGV	83
Figura 18– Amplificação dos primers para a síntese do dsRNA.....	84
Figura 19 – Culturas de esquistossômulos de 3 dias. Esquistossômulos incubados com (A) dsRNA-HP1 e (B) dsRNA-mCH	85
Figura 20 – Histologia do fígado de camundongos infectados com esquistossômulos de 3 dias (Grupos 1-3)	89
Figura 21 – Rede de interações proteína-proteína gerada a partir do banco de dados STRING	90
Figura 22 – Gel de poliacrilamida SDS-page resultante da eletroforese com extratos de cercárias imunoprecipitados com anticorpo humano monoclonal anti-HP1, em triplicata técnica e duplicata experimental	91
Figura 23 – <i>Western Blot</i> da imunoprecipitação	96
Figura 24 – Resultado do <i>stripping</i> das membranas incubadas anteriormente com (A) H3K9me3 e (B) H3K27me3 seguida de incubação com o anticorpo primário anti-S6	97
Figura 25 – Membranas incubadas com os anticorpos primários (A) anti-H3K9me3 e (B) H3K27me3 após o segundo <i>stripping</i> para retirada do anticorpo anti-S6	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Oligonucleotídeos desenhados para amplificação por PCR	62
Tabela 2 – Busca para uso anterior do anticorpo Abcam ab109028	74
Tabela 3 – Proteínas encontradas em pelo menos 2 injeções (Total de 33 proteínas)	92
Tabela 4 – Proteínas filtradas com score acima de 0.8 (Total de 20 proteínas)	94
Tabela 5 – Função das proteínas encontradas por IP-MS	95

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Análise estatística da expressão gênica relativa de culturas de dsRNA de esquistossômulos de 3 dias comparada a expressão de esquistossômulos de 3 dias não tratados	87
Gráfico 2 – Análise estatística dos grupos 1-3 para (A) carga parasitária e (B) quantidades de ovos nas fezes	88
Gráfico 3 – Análises estatísticas do (A) número de granulomas por animal e a (B) área de cada granuloma	88

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
CAPÍTULO I – <i>Schistosoma mansoni</i> E ESQUISTOSSOMOSE	18
1. Panorama da Esquistossomose	19
1.1. Ciclo de Vida do <i>Schistosoma mansoni</i>	21
1.1.1 Ovo e Miracídio	22
1.1.2. Esporocisto	23
1.1.3. Cercária	24
1.1.4. Esquistossômulo e Verme Adulto	26
1.2. Patogênese	26
1.3. Tratamento e Terapias	27
CAPÍTULO II - DNA E O CÓDIGO DE HISTONAS	29
2. DNA e Regulação Gênica	30
2.1. Código de Histonas	30
2.2. Modificações Pós-traducionais de Histonas	33
2.2.1 Fosforilação	33
2.2.2 Acetilação	33
2.2.3. Metilação	34
2.3. Modificações Pós-traducionais em Parasitas	35
2.4. Modificações Pós-traducionais em <i>Schistosoma mansoni</i>	37
CAPÍTULO III - CO-REGULADORES E HP1	39
3. Co-reguladores Transcrpcionais	40
3.1. HP1	41
3.1.1. Visão Geral	41
3.1.2. HP1 em mamíferos	44
3.1.3. HP1 em leveduras	45
3.1.4. HP1 em <i>Drosophila</i>	47
3.1.5. HP1 em parasitas	48
3.2. Métodos knockdown e knockout	50
3.2.1. Técnica Knockdown - RNA de interferência	50
3.3. Métodos de análise de interação DNA-proteína	52
3.3.1. ChIP-seq	53
3.3.2. ChIPmentation	54
4. JUSTIFICATIVA	57
5. OBJETIVOS	59
5.1. Objetivo Geral	60
5.1.1. Objetivos Específicos	60
6. Metodologia	61
6.1. Desenho de oligonucleotídeos	62
6.2. Amplificação do gene <i>SmHP1</i> (Smp_179650) por Reação em cadeia da Polimerase (PCR)	62
6.3. Purificação do produto de PCR do gel	63
6.4. Síntese do dsRNA	63
6.5. Infecção de caramujo com linhagem BH	64
6.6. Cultura de parasitas esquistossômulos	64
6.7. Extração de RNA e PCR em tempo real	65
6.8. Imunoprecipitação	66
6.9. Western Blot	66

6.10. <i>Stripping</i> das membranas de <i>western blot</i>	67
6.11. Digestão do gel – espectrometria de massas	67
6.12. Espectrometria de massa e análise de dados	68
6.13. Infecção de camundongos	68
6.14. Método Kato-Katz	70
6.15. Extração de esporocistos e cercárias	70
6.16. ChIPmentation <i>Schistosoma mansoni</i> (cercárias e esporocistos) e <i>Drosophila melanogaster</i>	71
6.17. Análises de Bioinformáticas	72
7. RESULTADOS	73
7.1. Utilização do Anticorpo Abcam ab109028 e testagem para ChIP-seq	74
7.2. O controle de qualidade do alinhamento mostra uma porcentagem muito boa de alinhamento esperado de mapeamento exclusivo	76
7.3. Enriquecimentos encontrados em torno do TES em <i>S. mansoni</i>	78
7.4. <i>SmHP1</i> está em quase todo o genoma e há diferenças entre esporocistos e cercárias	82
7.5. Padronização do ciclo de PCR para amplificação dos primers para experimento de RNA de interferência	84
7.6. Cultura de Parasitas	85
7.7. Silenciamento gênico por dsRNA	86
7.8. Oviposição duas vezes maior em parasitas knockdown para <i>SmHP1</i>	87
7.9. <i>SmHP1</i> interage com proteínas importantes para a regulação da transcrição	90
7.10. <i>SmHP1</i> parece interagir inespecificamente com H3K9me3 e H3K27me3	96
8. DISCUSSÃO	99
9. CONCLUSÃO	104
REFERÊNCIAS	106
APÊNDICE I – ARTIGO CIENTÍFICO	127
ANEXOS	148
ANEXO I – DECLARAÇÃO DE BIOÉTICA E BIOSSEGURANÇA	149
ANEXO II – DECLARAÇÃO DE DIREITOS AUTORAIS	151

INTRODUÇÃO

O parasita trematódeo *S. mansoni* pertencente à família Schistosomatidae e foi introduzido na América do Sul através do tráfico de escravos. O sucesso no estabelecimento e desenvolvimento do parasita nesta região foi possível devido ao fato de existir um molusco susceptível às formas parasitárias (Knight et al., 2016). Alterações epigenéticas estão relacionadas à susceptibilidade do molusco *B. glabrata* ao parasitismo de *S. mansoni*, pois há modulação da plasticidade que proporciona maior adaptabilidade entre parasita e hospedeiro (Knight et al., 2016). Além das alterações epigenéticas, as de variáveis ambientais como pH, temperatura e osmolaridade, há as variáveis advindas do hospedeiro como sinais bioquímicos, e físicos e imunológicos, que desencadeiam respostas específicas para cada etapa do ciclo de vida do parasita. Um exemplo elucidativo está na diferença de osmolaridade, que é um fator determinante para a eclosão do miracídio, mas este mesmo fator não interfere na mudança de cercarias para vermes adultos (Cosseau et al., 2016).

Alterações epigenéticas são capazes de modificar a paisagem da cromatina, alterando a organização nuclear e controlando a transcrição genética por meio de modificações pós-traducionais de histonas, metilação de DNA e micro-RNAs. Estas modificações permitem ao organismo adaptar-se às mudanças que ocorrem no ambiente (Stephens et al., 2013). O meio pode interferir no fenótipo de um organismo, pois pode, a partir do desencadeamento de modificações de histonas com consequentes transformações na expressão gênica (Duncan et al., 2014).

As histonas estão sujeitas a várias modificações pós-traducionais como ubiquitinação, sumoilação, fosforilação, metilação e acetilação. Estas mudanças adicionam ou retiram grupamentos químicos que podem tornar a cromatina ativa ou inativa, assim, regulando a expressão dos genes (Karlic et al., 2010). Em *S. mansoni*, as modificações de histonas exercem importantes papéis na diferenciação dos estágios do ciclo de vida do parasita e estão relacionadas ao estado transcricionalmente silenciado das cercarias (Roquis et al., 2015). Neste estágio, há um equilíbrio entre marcas epigenéticas repressivas e permissivas, tornando esta fase importante para o estudo das alterações epigenéticas (Roquis et al., 2015; Dillon et al., 2006). Os estados da cromatina são regulados e mantidos por co-reguladores transcricionais através da formação de complexos proteicos que recrutam proteínas para se ligarem ao DNA da cromatina e silenciar ou ativar determinadas porções do DNA (Valadão et al., 2002).

Importantes co-reguladores já foram descritos em *S. mansoni* e estudos anteriores sugerem que HP1 exerce papel importante no parasita (Trindade et al., 2021; Geyer et al., 2018). HP1 é uma proteína não histona associada à heterocromatina descoberta em *D. melanogaster* e a principal função descrita para esta proteína é manter o estado silenciado da cromatina (James; Elgin, 1986), no entanto, HP1 regula a expressão gênica através de uma variedade de mecanismos moleculares (Schoels; Enigma, 2022). Devido a uma vasta gama de funções desempenhadas por HP1 e o estudo desta proteína em outros organismos (Bui et al., 2021; Bosch-Presegué et al., 2017; Shareef et al., 2001), é esperado que HP1 seja um bom alvo de estudos em *S. mansoni*.

Para proceder a estudos de análises de interações DNA-proteína, são necessários técnicas e protocolos que consigam isolar os complexos proteicos que se ligam ao DNA. A análise de Imunoprecipitação da cromatina- sequenciamento de nova geração (ChIP-seq) permite uma visualização sistêmica da paisagem da cromatina, assim, esta técnica é uma aliada muito importante para investigações epigenômicas (Nakato; Sakata, 2021). Embora esta técnica seja muito utilizada, os altos custos e as longas etapas do protocolo devem ser considerados, nesse sentido, ChIPmentation surgiu como uma alternativa para contornar essas questões. Este método é uma combinação de imunoprecipitação da cromatina com a preparação da biblioteca de sequenciamento pela inserção da transposase Tn5 (Schmidl et al., 2015).

Por outro lado, como parte fundamental para a compreensão do interactoma, é interessante o mapeamento das interações proteína-proteína. Para esta finalidade, a Imunoprecipitação- espectrometria de massas (IP-MS) produz *insights* que podem elucidar partes incompreendidas acerca da função da proteína (Vasilescu; Guo; Kast, 2004; Ewing, et al., 2007).

Portanto, é notório enfatizar que a epigenética desempenha papéis de regulações do ciclo de vida em *S. mansoni*. Vale a pena ressaltar, dessa forma, que este parasita possui grande valor para estudos científicos e sociais, visto que a esquistossomose está relacionada a áreas em condições precárias de saneamento básico. Assim, a compreensão dos fatores que exercem grandes influências para o estabelecimento da doença e progressão do ciclo de vida do parasita tornam-se cada vez mais importantes.

CAPÍTULO I

***Schistosoma mansoni* E ESQUISTOSSOMOSE**

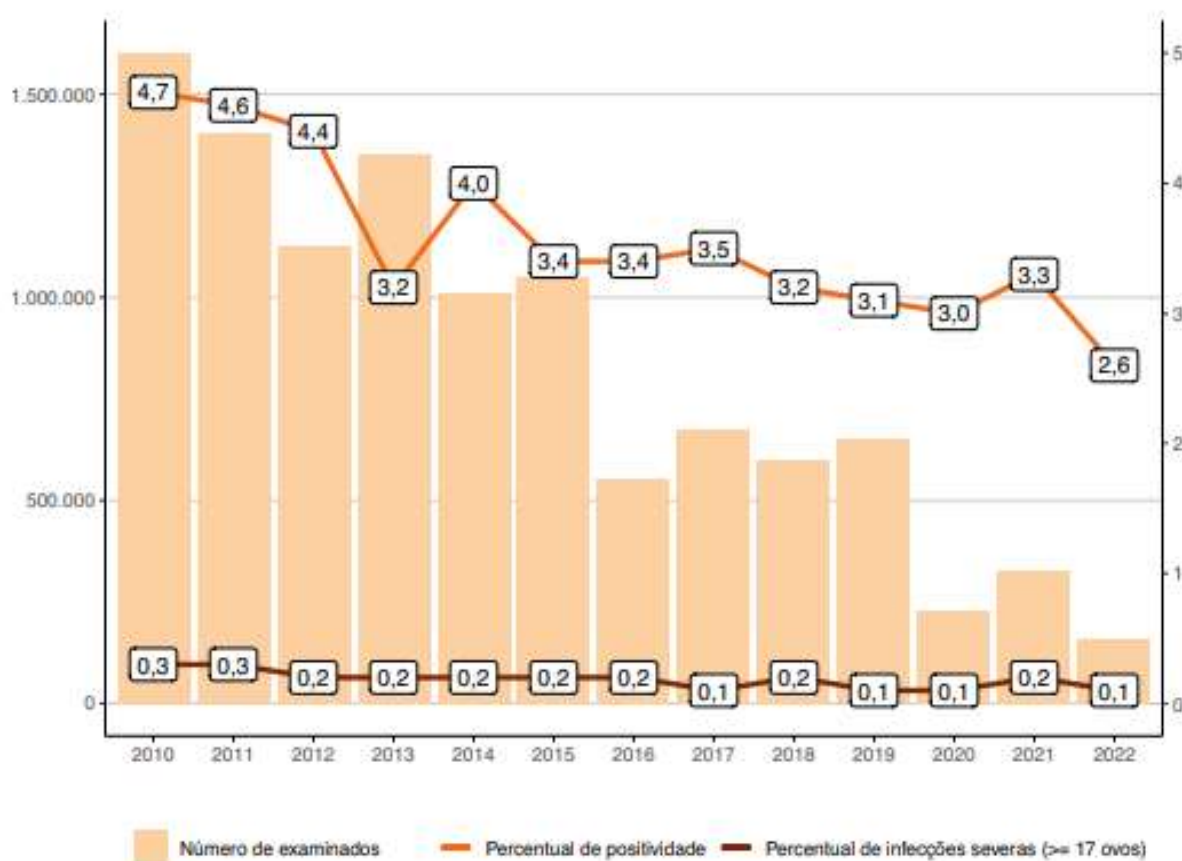
1. Panorama da Esquistossomose

A esquistossomose foi incluída no novo roteiro para doenças negligenciadas 2021-2030 da OMS, com o objetivo de eliminá-la. No entanto, devido a sua epidemiologia complexa oriunda de populações fragilizadas e carentes de saneamento básico e água potável, atingir esta meta pode ser complicado (OMS, 2024; Diaz et al., 2023). A doença está presente em 78 países tropicais e subtropicais, com destaque para a Ásia, África, América do Sul e sul da Europa. Entretanto, os números da África Subsaariana são alarmantes, chegando às 24 mil mortes por ano (Diaz et al., 2023). Segundo a OMS, em 2021 aproximadamente 251,4 milhões de pessoas precisaram de tratamento preventivo (OMS, 2024).

A meta de eliminação da esquistossomose como problema de saúde pública até 2030, inclui todos os países endêmicos (42 na África, 10 nas Américas, 3 no Sudeste Asiático, 6 no Pacífico ocidental, 16 no Mediterrâneo oriental e 1 na Europa), além da interrupção da transmissão em 25 dos 78 países endêmicos (Diaz et al., 2023).

No Brasil, a esquistossomose está presente em quase todos os estados brasileiros, principalmente nas regiões Nordeste e Sudeste. Nesse sentido, são consideradas áreas endêmicas os estados de Alagoas, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba, Sergipe, Espírito Santo, Maranhão e Minas Gerais (Boletim Epidemiológico 43, 2022). Entre os anos de 2010 e 2022, foram realizados 10.731.884 exames para esquistossomose nas áreas endêmicas e, em 3,8% das amostras, foram detectados ovos. Apesar do cenário preocupante, houve uma redução de exames positivos para a doença e no percentual de infecções severas (Figura 1) (Boletim Epidemiológico 43, 2022).

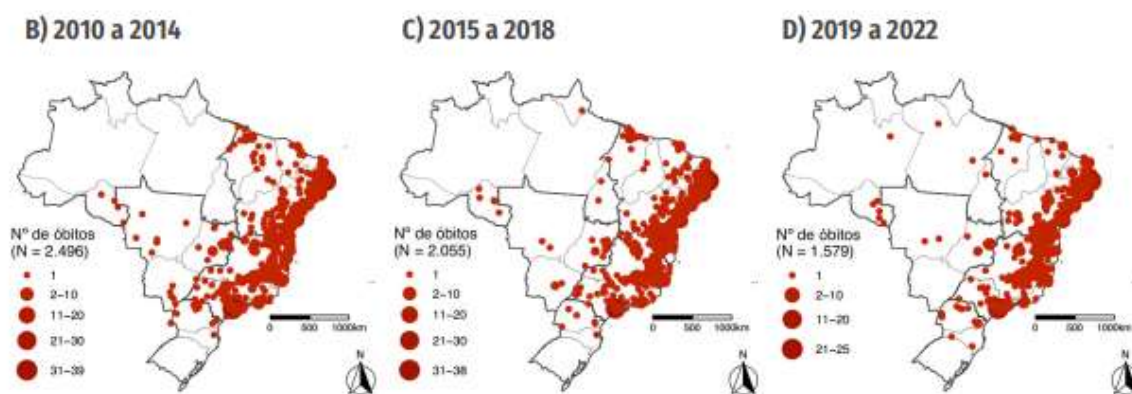
Figura 1 – Distribuição anual da população examinada em unidades da Federação, que são endêmicas, do percentual de positividade e de infecções severas por esquistossomose mansoni, Brasil, 2010-2022.



Fonte: Boletim Epidemiológico 43, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2022/boletim-epidemiologico-vol-53-no43/view>.

O número total de internações por esquistossomose diminuiu, no entanto, os números foram maiores em regiões endêmicas. Houve 2.389 internações entre 2010 e 2022, com média de 184 anuais e 6.130 óbitos no mesmo período, com média de 472 anuais (Figura 2) (Boletim Epidemiológico 43, 2022).

Figura 2 – Distribuição da taxa de mortalidade por esquistossomose mansoni, segundo ano e número de óbitos e município de residência, Brasil, 2010-2022.



Fonte: Boletim Epidemiológico 43, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2022/boletim-epidemiologico-vol-53-no43/view>.

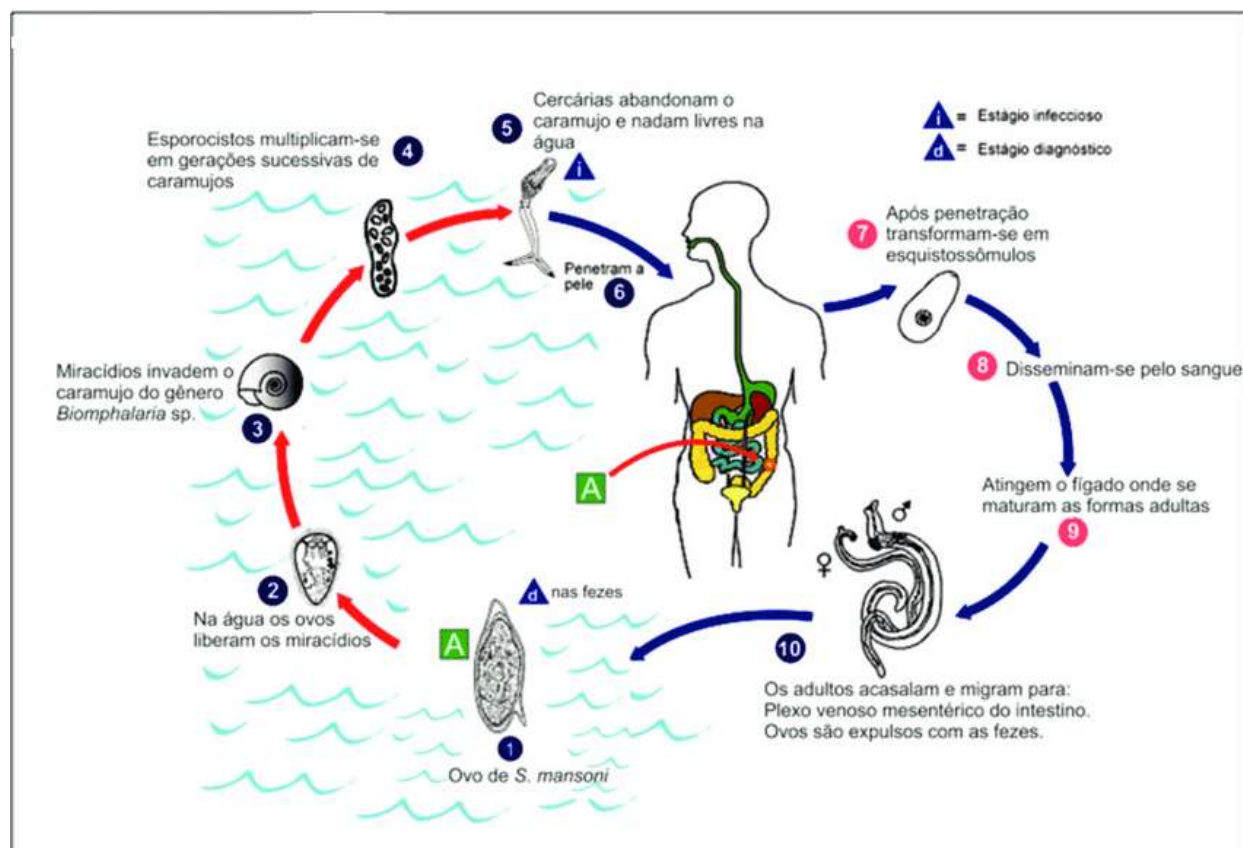
Apesar das taxas de positividade e severidade estarem abaixo dos números recomendados impostos pela OMS para a erradicação da esquistossomose até 2030, há altas preocupantes em regiões pontuais. Dessa forma, medidas conjuntas devem ser tomadas para o alcance da meta imposta (Boletim Epidemiológico 43, 2022). Além disso, há uma sinalização para a implementação do Plano Nacional de Eliminação da Esquistossomose como forma de continuação dos esforços produzidos desde 1975, com o Programa Especial de Controle da Esquistossomose (PCE) (Boletim Epidemiológico 43, 2022; Vigilância Da Esquistossomose Mansoni, 2014).

1.1 Ciclo de Vida do parasita *Schistosoma mansoni*

O ciclo de vida do parasita *S. mansoni* está ilustrado a seguir (Figura 3). O ciclo completo necessita dos hospedeiros intermediário e definitivo. A reprodução assexuada ocorre no molusco de água doce, hospedeiro intermediário, e a reprodução sexuada no hospedeiro definitivo, o homem. Os moluscos, geralmente, são do gênero *Biomphalaria* e a espécie predominante no Brasil é o *B. glabrata*. Os miracídeos são responsáveis pela infecção destes gastrópodes, após, há a mudança de fase para esporocisto e, em seguida, para cercárias. Com as condições ambientais favoráveis, as cercárias são liberadas no meio aquático e ficam livres para penetrarem na pele do hospedeiro definitivo. Neste momento, as cercárias perdem as caudas e tornam-se esquistossômulos, migram pela corrente sanguínea e alojam-se no sistema porta-hepático. No

mesentério e no sistema porta-hepático, os vermes macho e fêmea encontram-se pareados, maturam sexualmente e iniciam a oviposição (Nelwan, 2019). As fases estão descritas mais detalhadamente a seguir.

Figura 3 - Ciclo de vida do parasita do *Schistosoma mansoni*.



Fonte: (Gomes; Domingues; Barbosa, 2017). Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/320615656_Esquistossomose_manejo_clinico_e_epidemiologico_o_na_atencao_basica](https://www.researchgate.net/publication/320615656_Esquistossomose_manejo_clinico_e_epidemiologico_na_atencao_basica).

1.1.1 Ovo e Miracídio

Os esquistossomos, como o *S. mansoni*, são vermes parasitas digenéticos. As fêmeas de *S. mansoni* liberam aproximadamente 350 ovos diariamente, o equivalente a um ovo a cada 5 minutos. O processo de formação do óvulo começa no ovário, onde o ovócito é liberado no oviduto para fertilização. O esperma do reservatório de espermatozoides fertiliza o ovócito no oviduto antes de passar para o ducto vitelino, onde as células vitelinas da glândula vitelina circundam o ovócito fertilizado. O oócito, junto com as células vitelinas circundantes, move-se

então para o oótipo através da glândula de Mehlis, que desempenha um papel na formação da casca do ovo, liberando proteínas precursoras da casca do ovo (Walick et al., 2012).

Uma vez no oótipo, as contrações estimulam a liberação de grânulos contendo proteínas precursoras da casca do ovo das células vitelinas, iniciando a formação da casca do ovo. A atividade da tirosinase fortalece a casca do ovo através da ligação cruzada das proteínas precursoras liberadas. O óvulo totalmente formado, consistindo de casca de ovo reticulada, óvulo e células vitelinas, estão então prontos para passar pelo útero e ser liberado na circulação, onde o miracídio dentro da casca do ovo amadurece ainda mais (Walick et al., 2012; Constain et al., 2018).

O ovo fertilizado já é cromossomicamente determinado, macho e fêmea, homozigoto (ZZ) e heterozigoto (ZW), respectivamente (Ribeiro-Paes; Rodrigues, 1997). Os ovos passam por modificações fisiológicas e morfológicas, resultando em aumento significativo e medem em média 150 µm de comprimento por 65 µm de largura, quando maduros, ou seja, há a formação de miracídio, além de possuírem espinho lateral. No entanto, esse tamanho pode sofrer alterações quando o hospedeiro definitivo é o homem (Carvalho; Coelho; Lenzi, 2008). Os ovos são eliminados nas fezes e estão sujeitos às variações ambientais para determinar a viabilidade dos miracídios. Fatores como osmolaridade do meio, temperatura e luminosidade influenciam na eclosão do miracídio, devido a mudanças dos movimentos larvais (Matsuyama et al., 2004). Os miracídios são cilíndricos, ciliados e possuem intensa atividade natatória. Após a eclosão, os miracídios nadam em busca do hospedeiro, o molusco. Na parte posterior, estão células germinativas que darão continuidade ao desenvolvimento dentro do molusco, dando origem ao esporocisto (Carvalho; Coelho; Lenzi, 2008). A transição de miracídio para esporocisto dentro do hospedeiro intermediário é marcada por alterações na morfologia e fisiologia do parasita. Dessa forma, é plausível supor que há alterações na expressão gênica que regulam essa transição (Xiao-Jun Wu., et al., 2009).

1.1.2. Esporocisto

Para se adaptarem ao novo ambiente, os miracídios passam por rápidas mudanças morfológicas e fisiológicas e após um período de 2 horas há a perda do revestimento ciliado e estruturas externas, como glândulas de adesão e penetração. Em um período de 48 horas, a larva

perde o epitélio ciliado, o terebratório, a musculatura subepitelial e, por último, o sistema nervoso, que pode persistir por alguns dias adicionais. Durante esse processo, a larva se transforma em um saco com paredes cuticulares contendo células germinativas, iniciando um intenso processo de multiplicação. As células germinativas, em número de 50 a 100, se reproduzem vigorosamente, resultando na formação do esporocisto primário (Silva; Neves; Gomes, 2008).

O esporocisto primário (I) é formado após 2 dias e é recoberto por uma camada externa, formando um tegumento (Carvalho; Coelho; Lenzi, 2008). O esporocisto não possui boca e nem sistema digestivo, dessa forma, os nutrientes são absorvidos pelo tegumento, este também é responsável pelas respostas imunopatológicas do hospedeiro (Carvalho; Coelho; Lenzi, 2008).

O desenvolvimento continua até que o esporocisto secundário (II) seja formado a partir de sucessivas divisões das células germinativas da parede interna do esporocisto I. Estes esporocistos apresentam uma estrutura organizada, incluindo uma dupla camada muscular associada à formação de espinhos na cutícula, fundamentais para a migração intratecidual das larvas. A migração dos esporocistos secundários nos tecidos do molusco começa ao redor do 18º dia, levando-os das glândulas digestivas, onde se desenvolvem até os espaços intertubulares destas glândulas. As modificações anatômicas nos esporocistos secundários podem levar à formação de esporocistos terciários, originando múltiplas gerações sucessivas de esporocistos, o que pode explicar a prolongada eliminação de cercárias durante o ciclo de vida do *Schistosoma* (Coelho et al., 2008). O tempo necessário para o alcance da maturidade é em torno de 4 semanas. Após esse período, as cercárias estão prontas para serem liberadas (Mouahid et al., 2018).

1.1.3. Cercária

A formação das cercárias de *Schistosoma* tem início com a disposição das células germinativas em uma mórula, na qual uma grande célula basófila central origina as glândulas de penetração. As células externas formam as camadas celulares da cercária, enquanto uma cutícula acelular e as ventosas são desenvolvidas simultaneamente. Esse processo pode durar de 27 a 30 dias, sob condições ideais de temperatura. Cada miracídio é capaz de gerar cerca de 300 mil cercárias, sendo que o sexo das cercárias é determinado previamente. A regulação do desenvolvimento das formas parasitárias no molusco está relacionada à carga infectante dos

miracídeos, sugerindo um mecanismo para evitar uma carga parasitária excessiva (Lenzi et al., 2008).

Após a penetração no hospedeiro definitivo, as cercárias passam por uma série de transformações, incluindo a evolução para esquistossômulos de pele, esquistossômulos pulmonares, vermes imaturos e, finalmente, vermes adultos machos ou fêmeas (Lenzi et al., 2008). As cercárias medem 500 µm, possui cauda bifurcada que auxilia na atividade natatória, corpo alongado e receptores sensoriais que respondem aos estímulos ambientais, tais como luminosidade, temperatura e pH (Knudsen et al., 2005). As cercárias são estimuladas pelos lipídeos presentes na superfície da pele do hospedeiro e iniciam a penetração. Para a efetivação e sucesso desta etapa, é necessário que as ponte intercelulares entre as células epidérmicas membrana basal e matriz extracelular da derme sejam degradadas. Esse processo permite às cercárias perderem a cauda e tornarem-se esquistossômulos (Knudsen et al., 2005).

Após a penetração no hospedeiro definitivo, as cercárias passam por uma série de transformações, incluindo a evolução para esquistossômulos de pele, esquistossômulos pulmonares, vermes imaturos e, finalmente, vermes adultos machos ou fêmeas (Lenzi et al., 2008). As adaptações bioquímicas e morfológicas são essenciais para a sobrevivência dos parasitas no novo ambiente. A transformação de cercária para esquistossômulo é acompanhada pela perda da maioria do glicocálix, alterações no tegumento e no metabolismo para uma forma anaeróbica. Estas adaptações respondem rapidamente ao novo ambiente, incluindo um aumento na área de superfície da membrana plasmática para absorção ou secreção de materiais (Lenzi et al., 2008).

Apesar do sexo já estar definido, as cercárias não apresentam órgãos genitais específicos. Os machos apresentam maior infectividade enquanto as fêmeas se desenvolvem melhor em moluscos maiores. A longevidade das cercárias é diretamente proporcional às suas reservas energéticas, pois não se alimentam enquanto buscam seu hospedeiro. Os movimentos de alongamento e encurtamento fazem com que ocorra a fixação na pele do hospedeiro (Silva; Neves; Gomes, 2008).

Em esquistossômulos, as alterações gênicas estão associadas ao aumento na síntese de proteínas. Nas primeiras 24 horas, a proteína HSP 70 responde corretamente às mudanças de temperatura no hospedeiro. Entretanto, apesar da disponibilidade de vários mRNAs, a síntese de

proteínas em cercarias e esquistossômulos é falha, sugerindo uma regulação pós-transcricional (Lenzi et al., 2008).

1.1.4. Esquistossômulo e Verme Adulto

O esquistossômulo apresenta o tegumento com grandes vacúolos, corpos alongados e pequenos corpos membranosos, além da membrana externa heptalaminada. Outra transformação considerável é a funcionalidade do tubo digestivo, que agora é ativo. É necessário transpor barreiras da epiderme e derme para alcançar a corrente sanguínea e/ou linfática (Silva; Neves; Gomes, 2008). Assim, quando atingem a circulação venosa, os esquistossômulos migram para órgãos como coração e pulmões. Após, retornam e passam novamente pelo coração, em seguida conseguem chegar ao fígado para se diferenciarem sexualmente e crescerem. Neste órgão, os vermes amadurecem, encontram um parceiro e os pares migram do fígado para os locais de postura. Os vermes adultos, em pares, migram para a vasculatura venosa ao redor dos intestinos e os ovos vão em direção ao lúmen intestinal (Nation et al., 2020).

1.2. Patogênese

A resposta imunológica granulomatosa é induzida por ovos maduros através do recrutamento de macrófagos, no entanto, os ovos imaturos não possuem capacidade de recrutar macrófagos, e, portanto, não induzem granuloma (Takaki et al., 2021). Os ovos que não são liberados nas fezes ficam retidos na parede intestinal ou em órgãos como o fígado, gerando uma potente resposta inflamatória granulomatosa levando a hepatoesplenomegalia (Llanwarne; Helmby, 2020). Inicialmente, a resposta imune é mediada por Th1 e citocinas como IL-1, IL-12, TNF- α e interferon (IFN)- γ e dura entre de seis e oito semanas. Após, se inicia a deposição de ovos e ocorre mudança na resposta imune para Th2, aumento das interleucinas IL-4, IL-5, IL-13 e produção de imunoglobulina (Ig)E. Dessa forma, há formação de granulomas e fibrose tecidual (Llanwarne; Helmby, 2020)

O granuloma também foi descrito para desempenhar a função protetora do hospedeiro, impedindo a translocação de bactérias para os tecidos à medida que o ovo rompe a parede intestinal, assim, o granuloma não permite a exposição de antígenos tóxicos do ovo ao

hospedeiro (Takaki et al., 2021). Além disso, o parasita depende extremamente do hospedeiro para montar uma reação granulomatosa aos ovos, pois essa resposta inflamatória facilita a excreção bem-sucedida dos ovos do hospedeiro (Hams et al., 2013). No entanto, os granulomas ainda são os responsáveis pela patogênese e morbidade da doença.

O granuloma crônico causado pelo *S. mansoni* possui uma composição celular complexa, caracterizada pela presença abundante de células mieloides, linfócitos, eosinófilos e fibroblastos. Essas células trabalham em conjunto para desencadear a patologia tecidual associada à infecção (Hams et al., 2013; Takaki et al., 2021).

O fato de apenas ovos maduros serem encontrados nas fezes, pode estar relacionado aos ovos imaturos serem imunologicamente inativos, assim, não há formação de granulomas que auxiliam na expulsão destes ovos. Dessa forma, os ovos podem manipular ativamente o momento da formação do granuloma, de modo a prevenir a destruição imunológica do hospedeiro (Takaki et al., 2021).

1.3. Tratamento e Terapias

Atualmente, as formas disponíveis para conter a esquistossomose se resumem em quimioterapia, controle de caramujos, educação em saúde, melhor acesso à água potável, saneamento e higiene. A doença é tratada com uma dose única do medicamento Praziquantel, seu uso é indicado para todos, com exceção de crianças menores de 2 anos de idade. Este medicamento é um anti-helmíntico de amplo espectro desenvolvido na década de 1970 e tem sido amplamente distribuído, graças aos esforços da farmacêutica MerckMerck que se comprometeu em doar anualmente 250 milhões de comprimidos para crianças em idade escolar (Summers et al., 2022). Com o objetivo da OMS de eliminar a esquistossomose até 2030, a quimioterapia preventiva, realizada com Praziquantel, tem sido eficiente em reduzir casos graves da doença em regiões endêmicas. O uso incessante deste medicamento pode produzir fenótipos resistentes, além de dados sugerirem redução na eficácia em áreas endêmicas. No entanto, a ausência de novos medicamentos traz importantes reflexões acerca do uso do Praziquantel (Summers et al., 2022; Tesfie et al., 2020).

O desenvolvimento de uma vacina profilática contra o *Schistosoma mansoni* tem sido dificultado pela complexidade biológica do parasita, no entanto, vacinas que utilizam cercárias

atenuadas por radiação e vacinas de subunidades recombinantes estão sendo consideradas como candidatas a vacinas (Woellner-Santos et al., 2024). A Fiocruz apresentou a vacina Schistovac (Egesa et al., 2017), a qual entrará no calendário do SUS em 2025. Esta vacina tem como alvo o antígeno presente na pele do parasita (Egesa et al., 2017). Diante do exposto, poucas são as opções de tratamento e controle da esquistossomose, porém, muitos avanços científicos importantes foram e estão sendo realizados. Todavia, a busca por cenários mais promissores deve ser constante.

CAPÍTULO II

DNA E O CÓDIGO DE HISTONAS

2. DNA e Regulação Gênica

A estrutura e função molecular da molécula de DNA estão relacionados a hereditariedade entre os organismos (Travers, Muskhelishvili, 2015). O processo responsável pela herança genética é a replicação do DNA (Chagin, Stear, Cardoso, 2010), no entanto, os processos de transcrição e tradução são importantes, pois estão condicionados ao processamento das fitas moldes de DNA. A transcrição consiste em transferir a informação presente no DNA para o RNA mensageiro (mRNA) (Cramer, 2019) e a tradução é responsável pela formação de uma cadeia polipeptídica a partir da molécula de mRNA (Kornblihtt, Schor, Alló, 2013).

Durante a transcrição, a enzima RNA polimerase liga-se ao DNA na região promotora e sintetiza uma molécula complementar de RNA a partir de uma das fitas do DNA. Esse mRNA recém sintetizado contém o código genético que será traduzido em proteínas durante a etapa de tradução (Kornblihtt, Schor, Alló, 2013; Cramer, 2019).

Na tradução o mRNA migra do núcleo para o citoplasma, onde os ribossomos, moléculas responsáveis pela síntese proteica, ligam-se ao mRNA (Kornblihtt, Schor, Alló, 2013). Os processos de transcrição e tradução são essenciais para a expressão gênica e a síntese de proteínas que desempenham papéis vitais no funcionamento celular e na manutenção da vida (Agirrezabala, Frank, 2010).

O DNA está empacotado dentro das células, formando os cromossomos. Dentro de um cromossomo, o DNA e as proteínas associadas formam unidades estruturais chamadas nucleossomos. Cada nucleossomo é composto por um segmento de DNA que se enrola em torno de um complexo de proteínas chamadas histonas, que desempenham um papel crucial na compactação do DNA e na regulação da expressão gênica (Cutter, Hayes, 2015). As histonas estão no centro da regulação epigenética e são reguladores cruciais na proliferação celular (Andreas Lennartsson, Karl Ekwall, 2009).

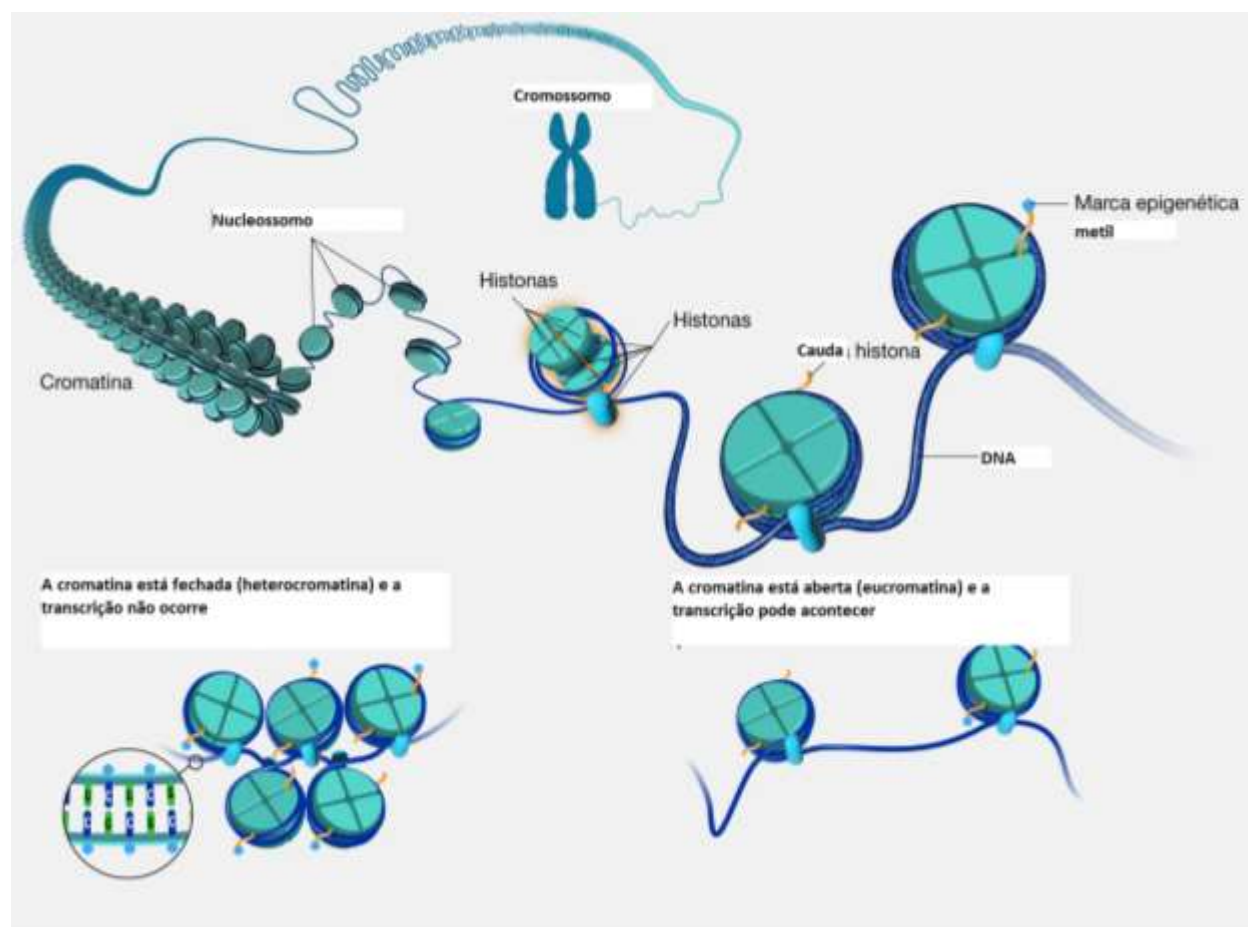
2.1. Código de Histonas

Os nucleossomos são os componentes básicos da cromatina e são formados pelo complexo de DNA e histonas. Cinco tipos de histonas (H1, H2A, H2B, H3 e H4) compõem o nucleossomo na forma de octâmeros, sendo um tetrâmero H2A-H2B e dois dímeros H3-H4 (Zhang et al., 2020). O domínio globular é responsável pela interação das histonas e está ligado

ao DNA nucleossômico, enquanto a histona H1, estabiliza o nucleossomo ligando-se ao DNA que não interage diretamente com o octâmero de histonas (Aboud et al., 2023) (Figura 4). A histona H1 tem sido descrita para além de uma proteína estrutural importante para a cromatina, pois foram identificadas muitas modificações pós-traducionais de histonas (Posttranslational Histone Modifications PTMs) (Andrés et al., 2020). A partir dos domínios globulares das histonas, projetam-se os domínios carboxi-terminais curtos, que possuem menos de 40 aminoácidos de comprimento. Estas sequências são ricas em resíduos básicos e estão sujeitas às múltiplas PTMs (Campos; Reinberg, 2009).

A cromatina é o conjunto complexo de DNA, proteínas histonas e outros componentes protéicos não-histonas e pode se encontrar em dois estados, condensada (heterocromatina) e descondensada (eucromatina) (Trojerm; Reinberg, 2007). A heterocromatina é geneticamente inativa, ao passo que, a eucromatina é geneticamente ativa, ou seja, quando a cromatina está descondensada há transcrição devido à acessibilidade ao DNA (Berger, 2007; Trojerm; Reinberg, 2007, Vaquero et al., 2003). Há dois mecanismos disponíveis, nos quais a cromatina utiliza para modificar sua paisagem. O primeiro mecanismo, envolve alterações diretas na cromatina através de mudanças nas cargas eletrostáticas, interferindo na ligação dos fatores de transcrição ao DNA. O segundo mecanismo, envolve modificação do nucleossomo através de ligações químicas que permitem associação de proteínas de ligação à cromatina (Berger, 2007).

Figura 4 - Estrutura de um cromossomo e seus componentes. O cromossomo é formado por DNA e proteínas associadas que dão origem à cromatina. Esta é composta por nucleossomos e cada um é formado por um octâmero de histonas envoltos pelo DNA. As histonas projetam caudas na superfície do nucleossomo que são passíveis de modificações pós-traducionais através de ligações de grupamentos químicos. Essas modificações tornam a cromatina mais ou menos condensada, impedindo ou permitindo a transcrição gênica, respectivamente.



Fonte: Imagem traduzida do Instituto Nacional de Pesquisa do Genoma Humano. Disponível em: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Nucleosoma>

O código de histonas refere-se às modificações químicas que ocorrem nas proteínas histonas, que estão envolvidas na compactação do DNA e na regulação da expressão gênica. A epigenética está relacionada aos mecanismos de regulação gênica que não alteram a sequência de DNA, pois a regulação ocorre a partir de modificações covalentes (Sueoka et al., 2018). Esse código explica as correlações entre PTMs de histonas e processos biológicos, ou seja, uma função biológica é determinada por combinações de histonas. No entanto, as reações enzimáticas específicas na cromatina dependem de processos celulares como transdução de sinais,

progressão do ciclo celular, remodelação de nucleossomos e interconversões enzimáticas de PTMs de histonas (Campos; Reinberg, 2009). Assim, o código de histonas teoriza a importância das histonas para a transcrição e outros processos da cromatina. A compreensão de PTMs torna-se indispensável para o entendimento da herança epigenética. A seguir, serão descritos três tipos de PTMs importantes para o entendimento e elucidação do presente trabalho.

2.2. Modificações Pós-traducionais de Histonas

2.2.1 Fosforilação

Todas as caudas de histonas podem ser fosforiladas e desfosforiladas por proteínas quinases e fosfatases, respectivamente. Os resíduos das histonas que podem ser fosforilados são serina, treonina e tirosina (Rossetto; Avvakumov; Côté, 2012). Essa fosforilação parece estar relacionada a resposta aos danos ocasionados no DNA. Essa observação foi relatada para histona H2A, pois promove a retenção e o acúmulo de proteínas de reparo do DNA nos locais de dano. Além disso, a fosforilação de sítios da histona H2A recruta modificadores de histonas e remodeladores da cromatina (Van Attikum; Gasser, 2005).

A expressão genética está relacionada a um vasto sítio de resíduos fosforilados nas histonas, por exemplo, a fosforilação das serinas 10, 28 e 32 das histonas H3 e H2B, respectivamente, influenciam no processo de transcrição, assim como a fosforilação da tirosina 11 da histona H3 (Rossetto; Avvakumov; Côté, 2012). É fato que a fosforilação atua como uma etapa intermediária crítica na condensação cromossômica durante a divisão celular, além de interagir com outras PTMs para regular a expressão gênica (Banerjee; Chakravarti, 2011).

2.2.2 Acetilação

A acetilação é catalisada por duas classes de enzimas, lisina acetiltransferase e lisina desacetilase, que transfere um grupamento acetil para um resíduo de lisina e remove o grupamento acetil, respectivamente. Há mais de 40 sítios de acetilação nas quatro histonas centrais, no entanto, esse PTM não ocorre somente em histonas. A acetilação de proteínas não histonas inclui proteínas envolvidas na degradação de proteínas, organização da cromatina, tradução e processamento de RNA (Shvedunova; Ahtar, 2022).

Em termos gerais, a acetilação está associada ao estado ativo da cromatina, enquanto a desacetilação está associada ao estado inativo da cromatina (Shen; Wei; Zhou, 2015). A acetilação de histonas segue os dois mecanismos postulados no código de histonas para regulação da expressão gênica, ou seja, ocorre alteração direta da estrutura da cromatina ou pode agir como marcadores que recrutam complexos modificadores da cromatina (Choi; Howe, 2009).

Os genes transcritos ativamente possuem acetilação nas caudas amino-terminais das histonas e é frequentemente encontrada nos promotores. A hiperacetilação de histonas pode aumentar a ligação de fatores de transcrição ao DNA nucleossômico, sugerindo um importante envolvimento da acetilação de histonas em diferentes etapas da transcrição (Choi; Howe, 2009).

O direcionamento de enzimas acetiltransferases à cromatina depende de fatores de transcrição ou de PTMs pré-existentes, assim, foi sugerido que a metilação das histonas seja um possível determinante para que ocorra a acetilação de histonas (Shvedunova; Ahtar, 2022).

2.2.3. Metilação

A metilação ocorre pela adição de um grupamento metil a um resíduo de lisina ou arginina e pode ser monometilada, dimetilada e trimetilada no resíduo de lisina, enquanto no resíduo de arginina a metilação ocorre somente nas formas monometilada ou dimetilada. As enzimas que catalisam a adição e remoção dos grupamentos metil são histonas metiltransferase e histonas desmetilases, respectivamente. As histonas metiltransferases podem ser divididas e incluem o domínio SET contendo enzimas e proteínas do tipo Dot1 que atuam nas lisinas, além de enzimas arginina N-metiltransferase que metilam argininas. Estas metilam histonas incorporadas à cromatina, mas proteínas não histonas também podem ser substratos (Gong; Miller, 2017).

No ano de 2000, foi descoberta a primeira metiltransferase, identificada como SUV39H (Rea et al., 2000). Esta enzima catalisa a inserção de di e trimetilação na lisina 9 da histona H3 (H3K9me2/3) e desempenha importantes funções na manutenção da heterocromatina e na repressão gênica. Esta enzima consiste em um domínio SET e um domínio cromo que se liga a H3K9me2/3. O direcionamento heterocromático das enzimas SUV39H é ainda melhorado pela interação com proteínas HP1 e RNA associado à repetição (Weirich, Khella e Albert Jeltsch,

2021). Esta enzima mostrou-se conservada entre as espécies e parece desempenhar a mesma função nos organismos (Black; Rechem; Whetstine, 2012).

Os padrões de metilação podem alterar a paisagem da cromatina e definir seus estados. H3K4me3 está presente no TSS e é altamente enriquecido neste sítio. Esta marca pode ser encontrada em promotores inativos e ativos, assim, ele marca não apenas um gene transcrito/ativo, mas também genes que podem se tornar ativos. O enriquecimento de H3K4me3 próximo ao TSS pode desempenhar um papel funcional no início da transcrição. Promotores ativos estão associadas ao enriquecimento em H4K20me1, H2BK5me1 e H3K36me3, enquanto os promotores inativos são frequentemente marcados por H3K27me3 ou H3K9me3 (Black, Rechem e Whetstine, 2012). Um subconjunto especial de promotores inativos, os genes bivalentes, são marcados pela metilação tanto para H3K4me3 quanto para H3K27me3 (Bernstein et al., 2006).

2.3. Modificações Pós-traducionais em Parasitas

Parasitas são ótimos modelos para o estudo das alterações genéticas, pois estes organismos precisam se adaptar rapidamente aos diferentes hospedeiros para completarem seus ciclos de vida e passam por consideráveis transições de desenvolvimento, assim são necessárias modificações específicas na expressão gênica (Dixon et al., 2010). O escape do sistema imunológico do hospedeiro permite aos parasitas causarem doenças prolongadas e está relacionado ao silenciamento dos membros de famílias de genes que codificam os principais antígenos contra o parasita. Este silenciamento envolve modificações reversíveis e pontuais que podem ser transmitidas aos descendentes (Wyse et al., 2013).

O sucesso no estabelecimento da leishmaniose está relacionado aos mecanismos de sobrevivência intracelular e à resistência medicamentosa. A plasticidade da *Leishmania sp* pode ser causada por mecanismos epigenéticos que são mediados por estímulos ambientais externos (Kamran et al., 2023). A regulação da expressão gênica neste parasita envolve processamento e estabilidade do RNA (Clayton; Shapira, 2007), além disso, quando comparadas às formas evolutivas do parasita, amastigota e promastigota, observaram uma regulação negativa da produção de RNA (Kamran et al., 2023).

Em adição às observações de processamento do RNA em *Leishmania*, foram descritas PTMs como fosforilação, acetilação, metilação e glicosilação, atuando como influenciadores na diferenciação axênica em amastigotas através de proteínas modificadas (Kamran et al., 2023). As MAP quinases regulam processos importantes em *Leishmania* como morfologia, ciclo de vida e resistência a medicamentos através da fosforilação de seus substratos (Kamran et al., 2023).

No parasita *Plasmodium falciparum*, a transcrição dos genes *var*, responsáveis pela variação antigênica e virulência, depende de processos epigenéticos (Cortés; Deitsch, 2017). Entretanto, processos como progressão no ciclo de vida e respostas transcricionais adaptativas estão relacionadas à cromatina nestes parasitas. Assim, a regulação da expressão gênica por mecanismos epigenéticos em *Plasmodium* vão além dos genes *var* (Cortés et al., 2012).

Os genes variantes clonais de *Plasmodium* são encontrados na eucromatina e heterocromatina, ou seja, são característicos da cromatina bivalente que pode ser mantida entre as gerações (Cortés et al., 2012). A estabilidade e herdabilidade dos estados da cromatina envolvem modificações dos nucleossomos que recrutam enzimas que modificam os nucleossomos próximos (Dodd et al., 2007). Marcas epigenéticas como H3K9ac e H3K4me2/3 estão envolvidas no estado ativo da cromatina, no entanto, quando a metilação ocorre na lisina 9 (H3K9me3), há mudanças na paisagem da cromatina, pois esta marca é encontrada na heterocromatina e é característica do estado silenciado (Cortés et al., 2012).

Em *Plasmodium*, já foi descrita uma desmetilase que possui afinidade com H3K9me3 (Cui et al., 2008) e possivelmente há outras marcas relacionadas à compactação da cromatina atuando neste parasita. H3K27me3 é uma marca epigenética encontrada em eucariotos multicelulares relacionada à heterocromatina, mas não foi encontrada em *Plasmodium* (Cortés et al., 2012).

O controle epigenético também já foi descrito para tripanossomas, com mais de 350 PTMs. As marcas epigenéticas mudam durante o ciclo de vida do parasita e/ou ciclo celular, mesmo quando o controle de transcrição específico do gene da proteína codificada é ausente. Por exemplo, a acetilação de H4K10 e H4K14 participa da replicação e transcrição do DNA, enquanto a metilação H3K76 é essencial para a progressão do ciclo celular, segregação cromossômica e diferenciação de parasitas e o nível de metilação difere entre os estágios de vida do *T. cruzi* (Menezes et al., 2023).

2.4. Modificações Pós-traducionais em *Schistosoma mansoni*

Um estudo inicial realizado por Fantappié (2000) demonstrou que o genoma do *S. mansoni* não era metilado, entretanto, estudo posterior revelou padrões de metilação no genoma deste parasita, porém em níveis variáveis (Geyer et al., 2011). Este estudo indicou SmDnmt2 como uma DNA metiltransferase funcional, além de demonstrarem que componentes de metilação do DNA são co-regulados durante o desenvolvimento (Geyer et al., 2011). Dnmt2 é um membro da família de enzimas DNA metiltransferase e muito conservada entre os organismos (Schaefer; Lyko, 2010), assim, a descoberta em *S. mansoni* foi importante para vislumbrar novos *insights* a respeito das PTMs neste parasita. Em parasitas tratados com inibidores de metiltransferases, foram observados efeitos na oviposição e morfologia ovariana em pares de vermes adultos decorrentes da ausência de metilação (Geyer et al., 2011).

Os diferentes estágios de vida do parasita parecem ser regulados por PTMs, além de exercer importante papel para a patogênese (Liu, 2016). A transcrição gênica difere entre os estágios de vida do parasita, com destaque ao estágio cercária. Em 2006, o trabalho de Dillon e colaboradores trouxe resultados interessantes que suportavam a teoria da regulação pós-traducional no parasita, demonstrando que o estágio cercária   transcricionalmente silenciado, no entanto, a transcrição é prontamente ativada quando há mudança para o estágio esquistossômulo (Dillon et al., 2006). As cercárias possuem uma combinação de marcas epigenéticas em torno dos TSS, ou seja, a trimetilação bivalente de H3K27 e H3K4 são características deste estágio. H3K27me3 aparece em regiões heterocromáticas e está associada   repressão da transcrição, enquanto a H3K4me3 está associada   ativação da transcrição (Roquis et al., 2015). Outra observação do grupo que corrobora com o estado transcricionalmente silenciado da cercária   que H3K9me3 está ligeiramente a montante e H3K9ac está ligeiramente a jusante, porém, perto do TSS. H3K4me3 e H3K9ac aumentam enquanto H3K9me3 e H3K27me3 diminuem durante a transição de cercárias para adultos. (Roquis et al., 2015).

O dimorfismo sexual fenotípico   aparente somente após a infecção no hospedeiro definitivo, assim, um estudo evidenciou que existem diferenças de enriquecimento da marca H3K27me3 dentre os sexos no estágio cercária. Dessa forma, os reguladores epigenéticos possivelmente desempenham importantes funções na determinação e diferenciação sexual (Picard et al., 2016). Todavia, as PTMs se mostram cruciais para o ciclo de vida do parasita, no

entanto, essas modificações também estão presentes nas interações patógeno-hospedeiro (Liu et al., 2016). O tratamento com inibidores de HDAC bloqueia reversivelmente a transição de miracídios para esporocistos (Azzi; Cosseau; Grunau, 2009) e o tratamento das larvas podem levar a novas variantes fenotípicas com expressão de antígenos de superfície variantes do tipo mucina (SmPoMuc), que são importantes para a interação patógeno-hospedeiro (Rogério et al., 2008). A paisagem da cromatina nos estágios de vida do parasita difere, remetendo a metilação de histonas como um importante processo regulatório durante o desenvolvimento, ou seja, são necessárias para a progressão do ciclo de vida do parasita (Roquis et al., 2018).

CAPÍTULO III

CO-REGULADORES E HP1

3. Co-reguladores Transcricionais

Os co-reguladores regulam a expressão gênica através de ligação a fatores de transcrição ou de complexos multiproteicos, assim, os sinais celulares são integrados e as enzimas com atividades relacionadas à unidade de transcrição atuam no processo a fim de ativar ou reprimir a transcrição (O'Malley; Qin; Lanz, 2008). Essa sinalização permite que complexos de remodelação da cromatina atuem no relaxamento permitindo o acesso e à ligação dos complexos co-reguladores aos genes alvo (Kumar et al., 2017).

As interações regulatórias entre PTMs moldam as interações entre PTM em histonas e co-reguladores (Kumar et al., 2017). Essas interações criam sítios específicos de reconhecimento para proteínas remodeladoras de histonas que alteram a cromatina no gene alvo, além disso, a integração das vias de sinais também fica a cargo dos remodeladores da cromatina (Kumar et al., 2017). PTMs são responsáveis pela regulação dos co-reguladores e a forma de ação depende das enzimas de sinalização que estão envolvidas no processo (O'Malley; Qin; Lanz, 2008).

Assim, a remodelação da cromatina, a ativação do fator de transcrição e co-reguladores são necessários para a regulação transcricional. Os co-reguladores podem ser divididos em co-ativadores e co-repressores (Kumar; Wang; Barnes, 2004). As interações proteína-proteína com os fatores de transcrição do gene alvo recrutam os co-ativadores, estes se ligam às proteínas de ligação ao DNA e enzimas modificadoras de histonas, possibilitando alterações na cromatina. De modo oposto, os co-repressores interagem diretamente com fatores de transcrição de ligação ao DNA e inativam complexos proteicos transcricionalmente ativos, além de recrutarem enzimas modificadoras de histonas que tornam a cromatina mais condensada (Kumar; Wang; Barnes, 2004).

Em *S. mansoni* as histonas H3 e H4 mostraram-se conservadas durante o processo evolucionário, assim, é provável que ambas desempenhem as mesmas funções no parasita. Estas histonas são conhecidas por serem os principais substratos para o complexo histona metiltransferase. O homólogo da proteína arginina metiltransferase de *S. mansoni* (*SmPRMT1*) demonstrou um alto grau de similaridade com proteína de vertebrados, no entanto, *SmPRMT1* metilou apenas os peptídeos H4 (Fantappié et al., 2008). Outros resultados interessantes incluem histona acetil transferase, *SmGCN5*, que acetila a histona H3 e possui um domínio HAT e CBP/p300, uma família de co-ativadores de transcrição que são responsáveis pela ativação de

diversos genes. Além de proteínas do domínio LIM, geralmente associadas a funções regulatórias e estão principalmente envolvidas em interações proteína-proteína (Fantappié et al., 2008).

Neste contexto de regulação da transcrição em *S. mansoni*, há muito ainda a ser estudado, entretanto, avanços já foram obtidos a fim de elucidar este complexo processo. Assim, o estudo de co-reguladores transcricionais em outros organismos pode ser extrapolado para *S. mansoni*. Nesse sentido, temos HP1, um co-regulador bem descrito anteriormente e que está presente em *S. mansoni* (Trindade et al., 2021).

3.1 HP1

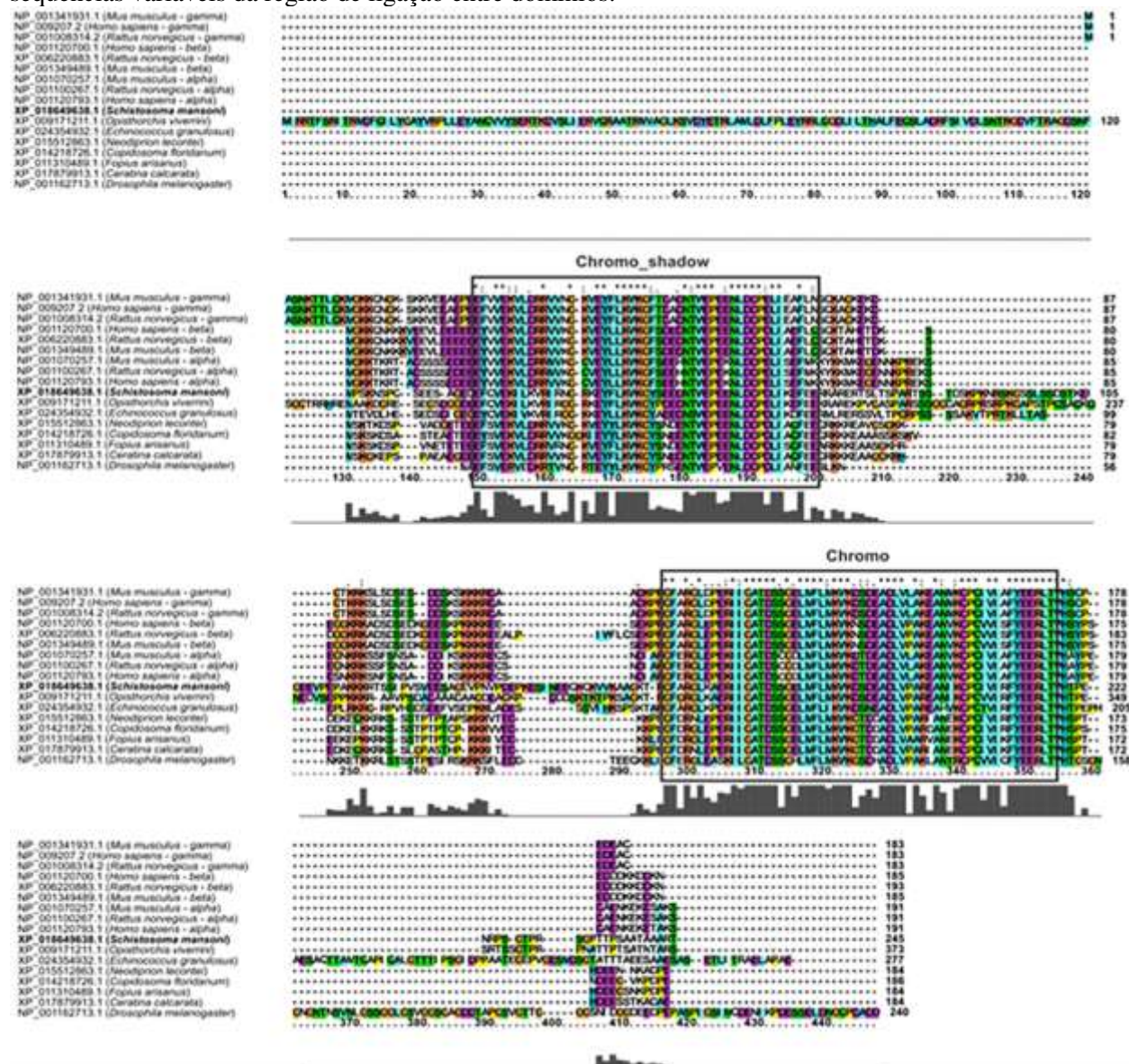
3.1.1. Visão Geral

HP1 é uma proteína descoberta inicialmente em *D. melanogaster* (James; Elgin, 1986) associada à supressão dominante da variação de efeito de posição (Eissenberg et al., 1990). Esta proteína é altamente conservada entre as espécies (Trindade et al., 2021; Schoelz e Riddle, 2022) e consiste em dois domínios, CD localizado na porção N-terminal e CSD na porção C-terminal, separados por uma região variável. CD é necessário para a ligação na cromatina e CSD medeia as interações proteína-proteína. A região que conecta os dois domínios possui comprimento variável e a sequência de aminoácidos não é conservada entre os organismos (Trindade et al., 2021), porém, exerce papel importantes nas diversas interações incluindo ligação com histona H1, ligação não específica de DNA e RNA e ligação de cromatina, além de ser suscetível a modificações pós-traducionais, assim, é uma região de controle central na regulação das proteínas HP1 (Piacentini et al., 2003; Lomberg; Wallrath; Urrutia, 2006).

Em trabalho anterior, demonstramos a conservação dos domínios de HP1 durante a evolução (Trindade et al., 2021). Dada essa conservação (Figura 5), é plausível supor que a função se manteve conservada durante o processo de evolução. O CD de HP1 reconhece e se liga às caudas metiladas das histonas. Essa interação é importante para o recrutamento de HP1 para regiões heterocromáticas do genoma (Nielsen et al., 2002). O CSD de HP1 tem sido implicado numa ampla variedade de interações proteína-proteína com fatores que incluem componentes de cromatina, reguladores de transcrição, modificadores de cromatina, fatores relacionados com o

ciclo de replicação celular, e proteínas nucleares. Além de ser responsável por mediar a homo e heterodimerização (Brasher, 2000; Schoelz; Riddle, 2022).

Figura 5 - Alinhamento de *SmHP1* com organismos ortólogos. Os domínios CD e CSD estão em destaque. É possível notar a conservação das sequências de aminoácidos nos dois domínios e as sequências variáveis da região de ligação entre domínios.



Fonte: (Trindade et al., 2021).

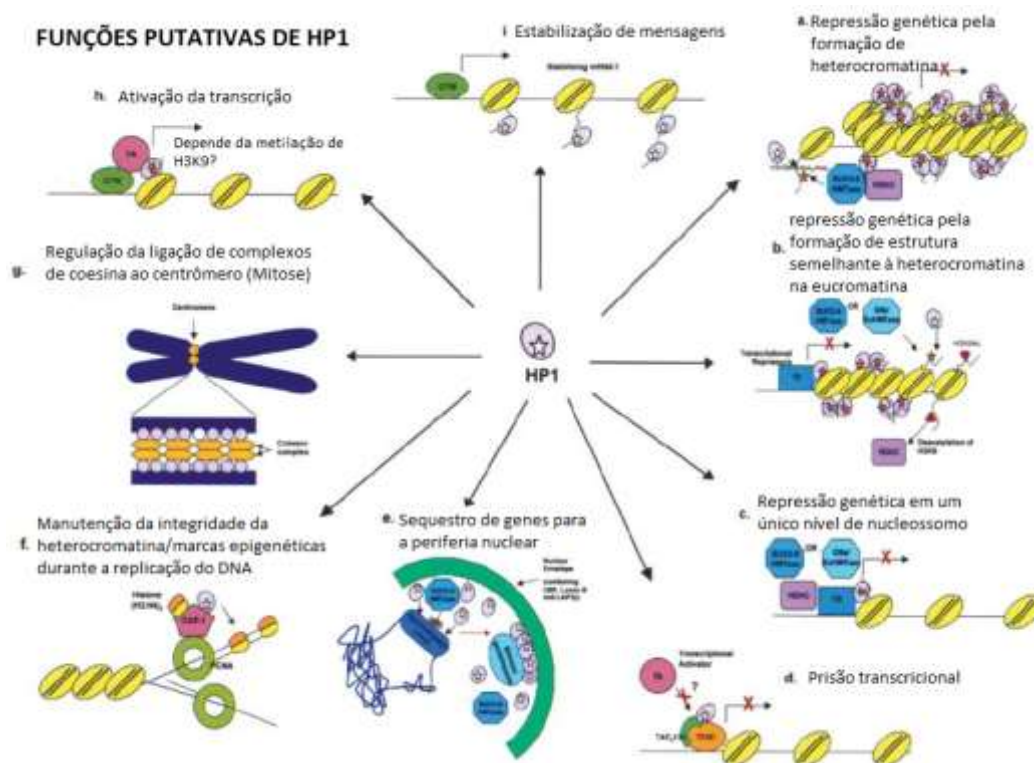
Todas as proteínas que possuem o domínio CD, podem alterar a paisagem da cromatina. Este domínio foi encontrado na proteína Polycomb, um silenciador gênico. A comparação entre os domínios CD de HP1 e Polycomb, revela que HP1 compartilha 60% de identidade com o

domínio CD de Polycomb. Esse domínio demonstrou ser importante na ligação ao sítio-alvo e na preferência do alvo (Lomberk; Wallrath; Urrutia, 2006).

A família de proteínas de HP1 se diferencia das proteínas cromobox pela presença do domínio CSD. Este domínio dimeriza em solução, sendo o oposto do domínio CD nas mesmas condições. A dimerização cria um sulco apolar, que pode acomodar proteínas que interagem com HP1 contendo a sequência de consenso PXVXL (Lomberk; Wallrath; Urrutia, 2006).

HP1 tem sido associada a uma variedade de funções (Figura 6) como segregação cromossômica, condensação da cromatina, replicação e reparo do DNA, manutenção de telômeros, modulador da dinâmica da cromatina, diferenciação celular, ciclo celular e controle da divisão celular. Essa versatilidade de funções implica em grandes redes de interações com DNA, RNA, proteínas e modificações pós-traducionais (Kumar; Kono, 2020).

Figura 6 - Resumo das funções de HP1.



Fonte: traduzida e modificada de Hiragami e Festenstein (2005).

(a) Em regiões heterocromáticas, HP1 mantém uma posição de ligação à lisina 9 da histona H3 e através metiltransferase ou desacetilases mantém repressão gênica por formação de

heterocromatina. (b) O complexo HP1-repressor transcricional pode formar estruturas na eucromatina para repressão genética. (c) A repressão gênica pode ser a nível de um único nucleossomo. (d) A interação de HP1 com fator de ligação à proteína de ligação a TATA de 130 kD pode impedir a associação da maquinaria transcricional geral ou fatores com o ativador transcricional, resultando em parada transcricional/repressão genética. (e) Os genes que foram silenciados pela ligação de HP1 a H3K9, podem ser sequestrados para a periferia nuclear pela interação de HP1 com componentes do envelope nuclear. (f) HP1 interage com a subunidade grande do fator de montagem da cromatina 1 (CAF1), p150. CAF1 transporta um tetrâmero de histona (H3/H4) para a forquilha de replicação através da interação com antígeno nuclear de células em proliferação (PCNA). O recrutamento de HP1 para a forquilha de replicação na fase S tardia do ciclo celular, pode ser importante para manter a integridade da heterocromatina e possivelmente o status epigenético dos genes silenciados. (g) Durante a mitose, é necessária a interação entre HP1 ligado à cromatina e um componente do complexo de coesina. (h) HP1 pode estar envolvido também na ativação transcricional. O recrutamento do complexo HP1/ativador transcricional pode ser dependente ou independente da metilação de H3K9. (i) HP1 pode funcionar como um ‘estabilizador de mensagem’, ligando ao mRNA nascente no local da transcrição.

3.1.2 HP1 em mamíferos

Os genes que codificam HP1s de camundongo (*Cbx5*, *Cbx1* e *Cbx3*) e HP1s humanos (*CBX5*, *CBX1* e *CBX3*), cada um compreende cinco exons separados por quatro íntrons (Lomberk; Wallrath; Urrutia, 2006). Em mamíferos, são encontradas três isoformas, HP1 α , HP1 β e HP1 γ (Jones; Cowell; Singh, 2000) e são localizadas em diferentes regiões da cromatina. Enquanto HP1 α está localizada apenas na heterocromatina, HP1 β e HP1 γ são encontradas tanto na heterocromatina quanto na eucromatina (Jones, Cowell e Singh, 2000). A diferença de distribuição genômica das isoformas infere desempenhos de papéis distintos, assim, as interações específicas e as modificações pós-traducionais variam de acordo com cada isoforma (Bosch-Presegué et al., 2017).

Todas as isoformas são capazes de homodimerizar ou heterodimerizar, associar-se à cromatina por meio da lisina 9 da histona H3, sendo trimetilada ou não e servir como repressores

de genes ou como ativadores de genes (Bosch-Presegué et al., 2017). O estabelecimento e propagação da heterocromatina está associada à ligação de HP1 a marca H3K9me3 e a metiltransferase que catalisa essa modificação. Neste caso, HP1 se liga também à SUV39H1 que tem por função metilar a lisina 9, além de atuar como moléculas adaptadoras que ligam outros fatores à heterocromatina, como Suv420h2 ou DNA metiltransferases (Bosch-Presegué et al., 2017).

Foi relatado que HP1 de rato e humano se liga ao co-repressor transcricional TIF1 β para silenciamento transcricional através da formação de heterocromatina. O domínio CSD é responsável pela ligação a co-repressores e reguladores cromossômicos (Nielsen et al., 2001), além de ser importante por interagir diretamente com a metiltransferase SUV39H1. Outra metiltransferase chave na ligação de HP1 pode ser SETDB1, pois HP1 se liga à proteína KAP-1, responsável pela ligação à metiltransferase SETDB1 (Sales-Gil; Vagnarelli, 2020). KAP-1 tem como função regular a organização dinâmica de estrutura da cromatina através de sua capacidade de influenciar padrões epigenéticos e compactação da cromatina (Iyengar; Farnham, 2011).

PTMs também podem ocorrer em HP1 e podem modular de forma eficiente a sua capacidade de ligação à cromatina. Em mamíferos, foram relatadas 35 locais de modificações para HP1 α , 34 para HP1 β e 37 para HP1 γ . Por exemplo, a fosforilação da região ligante dos domínios está relacionada ao direcionamento de HP1 α para regiões centroméricas durante a mitose. A superexpressão desta isoforma resulta em defeitos de coesão, ao passo que, há um aumento na segregação incorreta dos cromossomos quando há um knockdown de HP1 α (Sales-Gil; Vagnarelli, 2020).

O estudo de Bosch-Presegué et al., (2017) mostrou que não há sobreposição de funções para as isoformas de HP1. HP1 α atua como organizador de regiões de heterocromatina constitutivas e sua perda aumenta o enriquecimento de H4K20me3 e H3K27me3 na heterocromatina, enquanto HP1 β media uma ligação funcional direta com H4K20me3 e Suv420h2 (Bosch-Presegué et al., 2017). H4K20me3 é encontrada na heterocromatina e parece estar associada a diferentes funções, como estrutura da heterocromatina, regulação do ciclo celular, dano do DNA, desenvolvimento e câncer (Agredo; Kasinski, 2023).

3.1.3. HP1 em leveduras

O rearranjo da cromatina resulta em silenciamento de regiões específicas do genoma e é um processo de regulação gênica universal em eucariotos. A estrutura da cromatina autopertuante e herdada foi sugerida como explicação ao silenciamento dos loci do tipo de acasalamento, que determinam o tipo de acasalamento que ocorre (Hanson; Wolfe, 2017), além de telômeros e centrômeros (Ivanova et al., 1998; Seman et al., 2023).

O gene *clr4* é crucial para o processo de silenciamento e codifica uma proteína com alta homologia ao produto de *Su(var)3-9*. Os domínios encontrados no produto deste gene são os mesmos encontrados em proteínas que participam da modificação da cromatina. Este gene possui o domínio cromo, responsável pela ligação à cauda da histona H3 e o domínio SET, que catalisa a metilação da lisina 9 (H3K9) (Ivanova et al., 1998; Nakamura; Nakayama, 2023). A levedura *Cryptococcus neoformans* não possui o domínio cromo de ligação a H3, assim, o papel deste domínio em outras metiltransferases da família *Su(var)3-9* pode ser relacionado a outros fatores de interação (Nakamura; Nakayama, 2023).

Clr4 tem capacidade de autometilar e os resíduos de lisina K455 e K472 são os alvos primários dessa autometilação. O local de ligação da histona H3K9 é inibido pela formação de um loop de autometilação dos resíduos de lisina, assim, a atividade catalítica de Clr4 é inibida e ocorre uma troca de conformação. Esse processo de mudança conformacional é importante na regulação do H3K9me para manter a estrutura da heterocromatina. No entanto, não há conservação da autometilação de K455 em *S. cryophilus*, *S. octosporus* e *S. japonicus*. A conservação ocorre apenas na autometilação de K472, sugerindo que seja a principal responsável pela troca conformacional (Iglesias et al., 2018). A formação desse loop de autometilação também foi descrito para EZH2, uma metiltransferase que possui papel importante catalítico para a metilação de H3K27, (Duan; Du; Guo, 2020) como sendo crucial para a catálise de H3K27me3 (Nakamura; Nakayama, 2023).

Em *S. pombe* são encontradas duas proteínas HP1, Swi6 e Chp2, além da enzima Clr4p. Para manter o estabelecimento da heterocromatina, Swi6 interage com uma histona desacetilase, Clr3, e promove a disseminação de H3K9me e regula a transcrição por meio de compactação da cromatina (Seman et al., 2023). Swi6 pode ser essencial para a herança epigenética, pois se liga à heterocromatina no locus do tipo acasalamento durante o ciclo celular (Nakayama, Klar e Grewal, 2000). Além disso, a formação da heterocromatina envolve o recrutamento específico de Clr4 por fatores de RNAi (Seman et al., 2023). Ers1 é uma proteína essencial para o

silenciamento dependente de RNAi e necessária para níveis adequados de metilação de H3K9. Essa proteína interage diretamente com Swi6 e organiza os complexos enzimáticos correspondentes à cromatina revestida de HP1 próximos ao substrato de RNA não codificante nascente (Rougemaille, et al., 2012).

O estudo Seman e colaboradores demonstrou que Clr4 é o determinante primário da disseminação da metilação de H3K9 e a exclusão de Swi6 interrompe seletivamente a herança epigenética. Assim, os resultados obtidos neste estudo sugerem que HP1 podem criar redes de cromatina enriquecidas com H3K9me que facilitam o re-recrutamento de Clr4 para propagar estados epigenéticos estáveis. Além disso, em leveduras HP1 recrutam várias proteínas modificadoras de histonas durante o estabelecimento da heterocromatina. Em adição às funções de HP1 em leveduras, foi sugerido atuação como ativadores transcricionais, através de interações proteína-proteína e papel estrutural durante a manutenção da heterocromatina (Seman et al., 2023)

3.1.4 HP1 em *Drosophila*

A família HP1 em *D. melanogaster* é composta por cinco parálogos, HP1A-HP1E, *Su(var)205* (codifica a proteína HP1A), *HP1b*, *HP1c*, *rhino* (codifica HP1D) e *HP1e* (Vermaak e Malik, 2009). Os genes se localizam em diferentes regiões, sendo *Su(var)205*, *HP1b* e *HP1c* expressos ubiquamente, enquanto enquanto *rhino* e *HP1e* estão presentes principalmente em células germinativas femininas e masculinas, respectivamente (Schoelz; Feng; Riddle, 2021).

Foi demonstrado que a deficiência do gene *Su(var)205* produz fenótipos letais, enquanto a perda da função dos genes *HP1b* e *HP1c* não interfere na viabilidade dos fenótipos, indicando que HP1A exerce função essencial, além de possivelmente HP1B e HP1C terem redundância funcional. HP1A é encontrada na heterocromatina pericêntrica, telômeros, cromossomo quatro e alguns loci eucromáticos. Enquanto HP1B está presente em domínios heterocromáticos e eucromáticos em cromossomos politênicos, e HP1C na eucromatina (Schoelz, Feng, e Riddle, 2021). HP1D está localizada na heterocromatina, mas não foi visualizada sobreposição em testes com anticorpo H3K9me, diferentemente de HP1A. Em oposição, HP1E não está localizada na cromatina e sua localização depende de fator encontrado em machos. Assim, HP1A-C são

expressos em diversos tecidos de moscas adultos, ao passo que HP1D e HP1E parecem ser específicos de fêmeas e machos, respectivamente (Vermaak; Malik, 2009).

HP1C tem função de ativação da transcrição, pois está co-localizada com marcas PTMs associadas à atividade transcricional permissiva, H3K4me3 e RNA pol II (Font-Burgada et al., 2008). Ensaio com HP1C mostraram que a proteína interage através do domínio CDS com dois fatores de transcrição, WOC e ROW. Essa interação direciona HP1C para locais específicos na cromatina (Font-Burgada et al., 2008) e favorecem tanto a regulação positiva quanto a repressão de genes eucromáticos (Font-Burgada et al., 2008; Vermaak; Malik, 2009).

Foram descritas três metiltransferases H3K9 em *Drosophila*, Su(var)3-9, SetDB1 e G9a (Toland et al., 2009; Aagaard et al., 1999). Su(var)3-9 é a principal metiltransferase e possui homologia com SUV39H1 de mamíferos e Cl4p de leveduras (Schotta et al., 2002). A ação de SU(VAR)3-9 ocorre dentro da heterocromatina do cromocentro e controla o silenciamento gênico. SU(VAR)3-9 interage diretamente com HP1a e, então, se associa à cromatina. Na ausência de HP1, a metiltransferase se liga à heterocromatina e dispersa por regiões eucromáticas e metila H3K9 (Schotta et al., 2002). SetDB1 ajuda a metilar H3K9 presente na heterocromatina pericentromérica, além de algumas regiões H3K9 ao longo dos braços cromossômicos eucromáticos e heterocromático. SetDB1 tem participação fundamental no estabelecimento da metilação H3K9 no início da embriogênese. G9a metila H3K9 *in vitro*, no entanto, seu papel *in vivo* ainda necessita de maiores estudos (Stutzman et al., 2024).

3.1.5. HP1 em parasitas

O ciclo do parasita *P. falciparum* é bem complexo e envolve a invasão a diferentes tipos de células em diferentes ambientes. Estes ambientes influenciam nas mudanças morfológicas e na expressão gênica do parasita. No entanto, a quantidade de fatores de transcrição codificados é baixa. Assim, faz sentido que mecanismos epigenéticos tenham papel expressivo no controle da expressão gênica neste parasita. Embora a estrutura da cromatina seja organizada igualmente aos organismos eucarióticos, não foi relatado nenhum gene que codifica a histona H1 em *P. falciparum*, mas já foram descritos PTMs para este parasita. Por exemplo, acetilação da histona H3 nos resíduos K9, K14, K18 e K27 e da histona H4 em K5, K8, K12 e K16, metilação da histona H3 em K4, K9 e K36 e da histona H4 em K20 (Hernandez-Rivas et al., 2010).

Desacetilases (PfHDAC1-Rpn3, PfHDAC2 e PfSIR2), acetiltransferase (PfGcn5), além de nove genes que codificam metiltransferases. Uma metiltransferase pertencente à família SET3 provavelmente metila H3K9 (Hernandez-Rivas et al., 2010).

O trabalho de Pérez-Toledo (2009) identificou uma proteína HP1 ortóloga em *P. falciparum* (PfHP1). Este parasita possui um ciclo de vida complexo e mecanismos epigenéticos estão no controle da expressão genética. O domínio CD de PfHP1 se liga a H3K9me2/3, no entanto possui maior afinidade com a lisina 9 trimetilada. Este domínio possui a capacidade de formar dímeros e formação da heterocromatina. PfHP1 forma focos nucleares durante todo o ciclo do parasita, inicialmente está localizada no espaço perinuclear, enquanto nos estágios de trofozoíto e esquizontes o número de focos aumenta e são redistribuídos no nucleoplasma. Em adição, PfHP1 está ligado à repressão de genes subteloméricos, mas também de genes centrais *var* (Pérez-Toledo et al., 2009) que também estão associados a H3K9me3 (Brancucci et al., 2014).

PfHP1 se liga a H3K9me3, mas não se liga em outras marcas metiladas relacionadas à repressão gênica. PfHP1 se associa com conjuntos de genes de virulência, incluindo genes *var* e a maioria de genes que codificam proteínas envolvidas nas interações parasita-hospedeiro. O estudo demonstrou que há vários genes que não foram enriquecidos em H3K9me3, no entanto, se ligam a PfHP1. Esses genes codificam proteínas expressas durante a invasão ou em diferentes estágios do ciclo de vida (Fluek et al., 2009).

Brancucci et al., (2014) obtiveram resultados interessantes ao estudar a dependência de PfHP1, por silenciamento, para a proliferação dos parasitas. A depleção de PfHP1 resultou em níveis reduzidos de H3K9me3 em regiões heterocromáticas, além de provocar uma desaceleração na progressão do transcriptoma. Todos os genes *var* foram ativados simultaneamente e os trofozoítos assexuados entraram em um estado reversível de parada do ciclo celular, sugerindo defeitos na progressão da fase S. Outro resultado curioso deste estudo demonstrou que PfHP1 controla a diferenciação sexual por meio da regulação do locus que codifica o fator de transcrição ApiAP2 (Brancucci et al., 2014), embora um estudo mais recente tenha classificado este fator de transcrição como dispensável no ciclo de *P. berghei* (Nirdosh; Shukla; Mishra, 2024).

Dois estudos demonstraram a presença de uma cópia de HP1 em *S. mansoni* (Geyer et al., 2018; Trindade et al., 2021). Geyer et al (2018) mostrou que SmHP1 interage com SmMBD2/3,

uma proteína de ligação ao domínio metil-CpG (Geyer et al., 2018). Anteriormente, foi mostrado que SmMBD possui um domínio terminal de ligação de N-metil, assim, tanto SmMBD quanto SmDnmt2, uma metiltransferase, são co-regulados transcricionalmente durante o desenvolvimento do esquistossomo (Geyer et al., 2011). Em *S. mansoni* o complexo proteico SmMBD2/3-SmHP1 foi capaz de interferir na proliferação de neoblastos e no processo de oviposição (Geyer et al., 2018). Trindade et al., (2021) elucidaram através de IP-MS que SmHP1 interage com importantes proteínas, como repressor transcricional, remodeladores de cromatina, reguladores da transcrição, metiltransferase da família SETB1, e fator de transcrição com ligação ao motivo CCAAT. Outro imunoprecipitado interesse descrito neste estudo é a helicase com domínio SWI-SNF (Da Trindade et al., 2021). HP1 pode se ligar a H3 por meio do CSD em uma região de entrada e saída do nucleossomo. Essa região também é requerida pelas subunidades catalíticas de SWI-SNF, assim, a ligação de HP1 e SWI-SNF ao domínio globular e H3 é necessária a formação de heterocromatina mediada por HP1 (Lavigne et al., 2009). A característica de formação de dímeros estudada em outros organismos também foi evidenciada em *S. mansoni* (Trindade et al., 2021).

3.2. Métodos *knockdown* e *knockout*

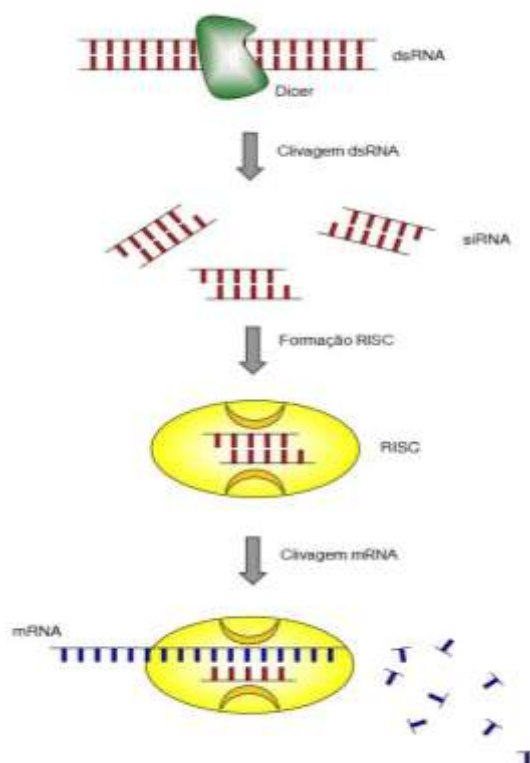
O interesse por estudos funcionais é resultado das informações obtidas com sequenciamento de genomas, como sequências e expressão de genes desconhecidos, assim, surgiram métodos eficientes para testar as hipóteses (Achenbach; Brunner; Heermeier, 2003). Abordagens com os métodos knockdown e knockout têm trazido resultados promissores quanto à função dos genes. Knockdown trata-se de uma redução da quantidade de proteína funcional, com possibilidade de interferir a nível de DNA, RNA ou proteína. Enquanto no knockout a função do gene é completamente removida (Zimmer et al., 2019). Os principais métodos serão descritos a seguir.

3.2.1. Técnica *Knockdown* - RNA de interferência

O uso de RNAi como técnica de interferência genética foi postulada em 1998 por Fire e colaboradores e é uma via bem conservada entre os organismos. A supressão da expressão

gênica é o resultado da ativação desta via, no entanto, dados sugerem que o RNAi também pode atuar na regulação gênica através da metilação de citosinas e sequências CpG. O silenciamento transcricional via metilação pode ocorrer quando a sequência alvo compartilhar homologia com um promotor. Contudo, a metilação pode ser direcionada para sítios silenciadores quando há interação do RNA com domínios da cromatina (Fire et al., 1998; Mocellin e Provenzano, 2004). O mecanismo de ação do RNAi atua no mRNA a fim de provocar o silenciamento gênico pós-transcricional, assim, o dsRNA juntamente a um complexo enzimático se liga ao mRNA por meio de uma sequência complementar de nucleotídeos. Essa ligação ocasiona inibição da tradução e/ou degradação do mRNA (Figura 7) (França et al., 2010).

Figura 7 - Mecanismo de ação RNAi. Os eventos moleculares iniciam quando ocorre ligação do dsRNA com a enzima Dicer e há clivagem em fragmentos curtos de aproximadamente 20 pares de nucleotídeos (siRNA). Esses siRNAs se ligam ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), que usa uma fita do siRNA para se ligar a moléculas de RNA fita simples (ou seja, mRNA) de sequência complementar. A atividade nuclease do RISC degrada o mRNA, silenciando assim a expressão do gene (Mocellin; Provenzano, 2004).



Fonte: Mocellin e Provenzano (2004).

O efeito desta maquinaria nos organismos pode resultar em diferentes fenótipos, por exemplo, em fungos, pode ocorrer desestruturação da heterocromatina quando há deleção de genes relacionados à via (França et al., 2010). Em insetos, o RNAi tem sido implementado como recurso ao controle de vetores de pragas e doenças (Palli, 2023). Outra abordagem com resultados promissores é o uso do RNAi para terapia direcionada ao tumor (Kara, Calin e Bulent, 2022). Além disso, o emprego do RNAi em tripanossomas africanos trouxe *insights* importantes como mecanismos que sustentam a resistência a medicamentos e seu transporte, metabolismo de pró-fármacos, replicação do genoma e o controle da expressão gênica (Horn, 2022).

Um estudo com *S. mansoni* obteve êxito ao realizar o silenciamento do gene da catepsina B, uma enzima proteolítica envolvida na digestão da hemoglobina do hospedeiro (Skelly, Da'dara e Harn, 2003). Os parasitas foram cultivados por 6 dias na presença de dsRNA e quando comparados ao grupo controle, houve uma redução da expressão gênica (Skelly, Da'dara e Harn, 2003). Stefanic et al (2010) realizaram um estudo em larga escala utilizando RNAi para 11 genes de *S. mansoni*. Nesta pesquisa, foram definidos parâmetros operacionais para o uso de RNAi em *S. mansoni*, como melhor meio de cultura e toxicidade do dsRNA. Não foram encontradas diferenças na efetividade do silenciamento gênico nos esquistossômulos incubados com dsRNA e esquistossômulos eletroporadas com dsRNA, pois os parasitas são capazes de absorverem o dsRNA pelo intestino. Além disso, quando o RNAi é seletivo quando direcionado para mais de um transcrito (Stefanic et al., 2010). A maioria dos estudos com RNAi concentraram-se nos estágios de vermes adultos, esquistossômulos e miracídios com diferentes alvos (Lalawmpuiie; Lalrinkima, 2023).

3.3 Métodos de análise de interação DNA-proteína

Para o entendimento da regulação transcricional, é preciso compreender como ocorrem as interações DNA-proteína e a importância das marcas epigenéticas, assim, para estudar a regulação transcricional é preciso mapear essas interações, além do mapeamento das marcas epigenéticas. Os estados da cromatina influenciam diretamente na acessibilidade das proteínas ao DNA e são capazes de modificar a superfície do nucleossomo para aumentar ou impedir o recrutamento de complexos de proteínas efetoras (Park, 2009). A principal técnica que avalia as interações DNA-proteína e os mecanismos de regulação transcricional por modificação da

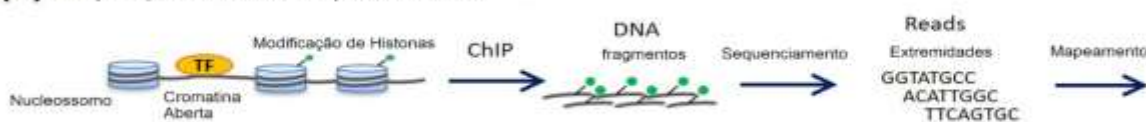
cromatina é o ChIP-seq. Este método combina a imunoprecipitação da cromatina seguida de sequenciamento (Park, 2009). Em contrapartida, com intuito de reduzir o tempo e tornar o processo mais robusto, foi apresentado a técnica ChIPmentation. Este método introduz adaptadores compatíveis com sequenciamento em uma reação de etapa única diretamente na cromatina ligada a esferas (Schmidl et al., 2015)

3.3.1 ChIP-seq

Para o experimento ChIP, é necessário que os fragmentos de DNA associados a uma proteína específica sejam enriquecidos, assim, a proteína de ligação ao DNA é tratada com formaldeído e a cromatina é fragmentada, gerando fragmentos de 200 a 600 pares de bases. Para imunoprecipitar o complexo DNA-proteína, é usado um anticorpo específico para a proteína de interesse (Park, 2009). A partir de análises computacionais, é possível obter diversos resultados partindo da distribuição de leitura normalizada (Nakato; Sakata, 2021) (Figura 8).

Figura 8 – Resumo protocolo de sequenciamento ChIP-seq - (A) As proteínas são ligadas covalentemente ao DNA, em seguida a cromatina é fragmentada e os complexos DNA-proteína são isolados por imunoprecipitação na presença do anticorpo de interesse. Os fragmentos de DNA são sequenciados. (B) Os dados obtidos do sequenciamento passam por diversas etapas que incluem análise da qualidade das sequências, visualização dos picos de enriquecimento (Peak calling) e análises dos estados da cromatina.

(A) Preparação amostra e sequenciamento



(B) Análises Computacionais



Fonte: Imagem traduzida de (Nakato; Sakata, 2021).

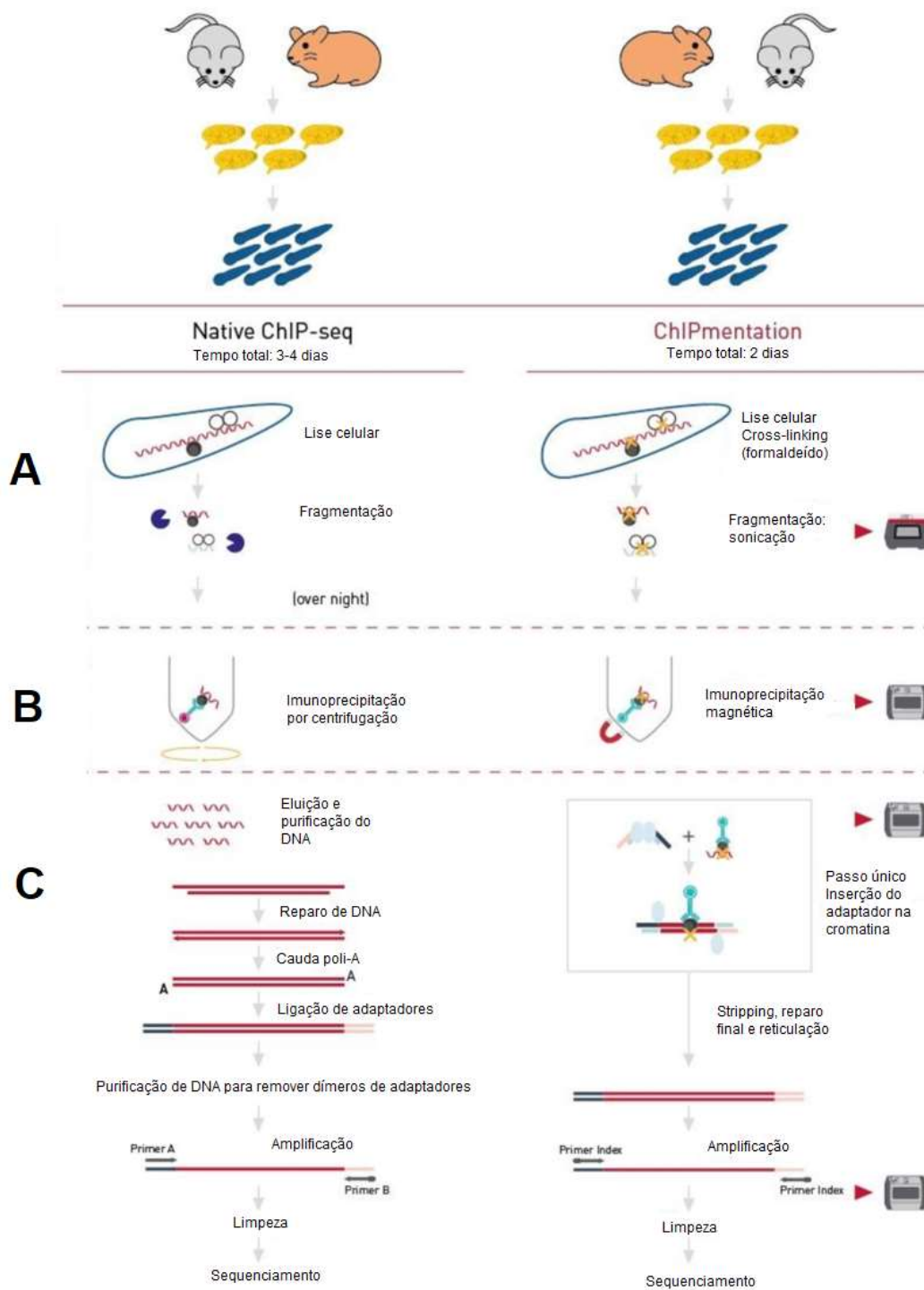
As informações obtidas por experimentos ChIP-seq, são necessárias para a montagem de epigenomas e predição da expressão gênica. Além de predizer as interações que ocorrem na cromatina (Nakato; Sakata, 2021). Um estudo com *Drosophila* mostrou a funcionalidade de fatores de transcrição com múltiplas proteínas de ligação ao RNA, a fim de conduzir o *splicing* alternativo. Essas proteínas que compõem os complexos de splicing regulam tanto a transcrição quanto o splicing. Assim, com ChIP-seq conseguiram demonstrar que um fator materno controla o *splicing* específico do sexo durante o desenvolvimento embrionário (Mukulika et al., 2023).

Em *S. mansoni*, o uso do método ChIP-seq trouxe importantes avanços. Roquis et al (2015) mostrou que a estrutura da cromatina pode controlar a expressão genética e definir estados de transcrição específicos, como no estágio cercária, na qual é visualizado uma combinação específica de marcas epigenéticas nos TSS (Roquis et al., 2015). Outro estudo importante demonstrou que há uma compensação de dose em esquistossômulos devido a remodelação da cromatina na região específica do cromossomo Z, além disso, neste cromossomo a cromatina encontra-se no estado permissivo em ambos os sexos (Picard et al., 2019). Os avanços científicos pelo método de ChIP-seq são inúmeros, entretanto, este método possui algumas limitações como o número elevado de células necessárias e o tempo prolongado dos protocolos, assim, para contornar esses desafios tem-se aplicado o método ChIPmentation.

3.3.2 Chipmentation

A transposase Tn5 permite fragmentação simultânea de DNA e marcação de adaptadores (tagmentação) como uma alternativa para obter bibliotecas mais rápidas e sensíveis a partir de DNA purificado (Figura 9). O protocolo ChIPmentation é rápido e conveniente, não dá origem a dímeros adaptadores de sequenciamento e requer apenas uma única etapa de purificação de DNA antes da amplificação da biblioteca (Schmidl et al., 2015). Os adaptadores de sequenciamento são adicionados pela transposase Tn5 e a PCR para obter a biblioteca é realizada após a reticulação e purificação do DNA (Xu et al., 2020).

Figura 9 – Comparação técnicas ChIP-seq e ChIPmentation . A- preparação da cromatina. B- Imunoprecipitação da cromatina. C- Preparação da biblioteca e sequenciamento. A principal diferença entre os métodos consiste na preparação da biblioteca, sendo uma etapa no método ChIPmentation.



Fonte: Imagem traduzida e modificada de Lasica et al., (2022).

ChIPmentation utiliza 10^4 células para modificação de histonas e 10^5 células para fatores de transcrição, enquanto a quantidade de células utilizadas em ChIP-seq para os mesmos objetivos são 5×10^5 e 5×10^6 , respectivamente. Além da sensibilidade, outros fatores devem ser considerados como a abundância da proteína/modificação de interesse e a eficiência do anticorpo (Xu et al., 2020). Em *S. mansoni* ChIPmentation foi testado em esquistossômulos para automatização do processo executado por um robô de pipetagem e padronização da quantidade mínima de células necessárias para obter resultados robustos (Lasica et al., 2021). O estudo foi efetivo em mostrar que a automatização do protocolo reduziu tempo e o tornou mais simples, além de estabelecer o limite como ≥ 20.000 células *de Schistosoma* com 3×10^4 a 3×10^5 células como ideal (Lasica et al., 2022). Dados de ChIPmentation têm sido utilizados para validar resultados obtidos por ChIP-seq. Um estudo sobre células estruturais como reguladores-chave da imunidade procedeu RNA-seq para verificar o perfil da expressão gênica ChIPmentation para traçar o epigenoma com investigação da marca H3K4me2. Os resultados obtidos nos experimentos mostraram a expressão e a regulação de genes, além do potencial de ativação relacionada às modificações da cromatina (Rybkina; Farber, 2021). Assim, ChIPmentation tem contribuído para o avanço de análises por permitir uma abordagem mais dinâmica e simplificada.

4. JUSTIFICATIVA

A esquistossomose causada pelo parasita *S. mansoni* tem prevalência mundial e está entre as 20 doenças negligenciadas nas Américas. Para que o ciclo do parasita seja completo, são necessários dois hospedeiros, intermediário e definitivo, assim, são necessárias mudanças morfológicas durante o ciclo de vida. Essas modificações estão relacionadas às alterações reversíveis no epigenoma do parasita. Os mecanismos epigenéticos envolvem modificações de histonas e estão diretamente conectados aos estados da cromatina transcricionalmente ativas ou repressivas, controlando a expressão gênica. Em outros organismos, já foi descrito que esses estados são mantidos pelos co-reguladores transcricionais. HP1 é descrito como um co-regulador conservado durante a evolução com função importante de manter estruturas silenciadas ou heterocromáticas. Além disso, HP1 pode regular a expressão gênica a partir da formação de complexos protéicos capazes de interferir na transcrição. Todas as funções imputadas à proteína HP1 já foram descritas em mamíferos, leveduras e protozoários, como o *Plasmodium falciparum*. Essa proteína está no banco de dados de *S. mansoni* e já foi descrita em diferentes estágios do ciclo de vida do parasita.

As diferenças morfológicas entre os estágios do ciclo de vida são reguladas por modificações de histonas, estas estão associadas a estruturas de cromatina transcricionalmente ativas ou repressivas. Em cercárias a transcrição é inativa e há marcas epigenéticas relacionadas tanto à inativação quanto a ativação da transcrição. Quando ocorre a transformação para esquistossômulo o epigenoma se modifica e a transcrição é ativada. Em outros organismos HP1 se liga às marcas epigenéticas relacionadas à heterocromatina, principalmente H3K9me3 e H3K27me3. Dados revelaram a presença de mRNA nos estágios de cercária, esquistossômulo e vermes adultos, com expressão sustentada da proteína nestes estágios. Assim, a hipótese é que HP1 desempenha papel na inativação da transcrição no estágio de cercária e possui papel importante para a progressão do desenvolvimento do parasita. Dessa forma, a avaliação do papel de SmHP1 na regulação gênica no desenvolvimento será por meio de experimentos de epigenômica e transcriptômica. O papel na infecção será avaliado através do silenciamento do gene e posterior infecção de camundongos para averiguar a importância dessa proteína no desenvolvimento do parasita, além da progressão e estabelecimento da doença.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Verificar o papel de *Smp*_HP1 na regulação transcricional nas fases de esporocisto e cercárias em *Schistosoma mansoni*, o estabelecimento da metodologia de RNA interferente para o gene *Sm*HP1 e a influência do silenciamento transiente na oviposição do parasita.

5.1.2. Objetivos Específicos

1. Avaliação do papel de *Sm*HP1 na regulação gênica no desenvolvimento do parasita;
2. Investigar qual o papel de *Sm*HP1 durante a infecção;
3. Avaliação das interações proteína-proteína que ocorrem com *Sm*HP1 no estágio cercaria;
4. Avaliação da interação de *Sm*HP1 com o DNA.

6. METODOLOGIA

6.1 Desenho de oligonucleotídeos

Os primers foram desenhados com o programa online Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>). O tamanho ótimo dos primers e a Temperatura de *melting* foram ajustados, 20 pb e 58,7°C, respectivamente. O desenho dos primers iniciou pela busca da sequência de cDNA (Smp_179650.1) no banco de dados *WormBase ParaSite – Schistosoma mansoni* (https://parasite.wormbase.org/Schistosoma_mansoni_prjea36577/Info/Index). Em seguida, foi utilizada a ferramenta online BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) para análise da identidade da sequência e verificar a região do DNA a qual os oligonucleotídeos amplificam. A tabela 1 mostra as sequências dos oligonucleotídeos. O *amplicon* obtido com os primers é de 309 pb.

Tabela 1 – Oligonucleotídeos utilizados para amplificação por PCR.

Primer	Sequência oligonucleotídeos
Forward	TGTGGAAGAGTCAGCTGGT
Reverse	AGGGTCGATTTTCAGGTGTG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
Forward+T7	TAATACGACTCACTATAGGGTGTGGAAGAGTCAGCTGGT
Reverse+T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGGGTCGATTTTCAGGTGTG
Forward (qRT-PCR)	CGTCACTCAGTTCAGACAGC
Reverse (qRT-PCR)	CTCTTCCACACTCACGGGTA

Fonte: Organizado pela autora.

6.2. Amplificação do gene *SmHP1* (Smp_179650) por Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

O kit utilizado foi da empresa Cellco, seguindo as concentrações determinadas no protocolo do fabricante. Cada amostra foi realizada em duplicata, seguido do seu respectivo controle negativo (amostras sem DNA), volume final 20 µL. Após, as amplificações foram visualizadas em gel de agarose 1% e as frações do gel correspondentes aos amplicons esperados foram cortados.

6.3. Purificação do produto de PCR do gel

O kit utilizado para digestão e purificação do gel foi da Promega Wizard® SV Gel and PCR *Clean-Up* e o protocolo seguido foi de acordo com o fabricante. Resumidamente, a solução *Binding Solution* foi adicionada até cobrir o gel, em seguida a mistura foi agitada em vórtex rapidamente e incubada a 56°C por 10 minutos. Centrifugamos por 1 minuto à temperatura de 25°C a 12000 rpm. A etapa de purificação consistiu em passar o gel dissolvido pela minicoluna, em seguida, incubou a temperatura ambiente por 1 minuto, centrifugou a 14000 rpm por 1 minuto e descartou a solução do tubo coletor. Foram utilizados 700µL da solução de lavagem com etanol para cada minicoluna. Centrifugou-se a 14000 rpm por 1 minuto e foi descartado o volume contido no tubo coletor. A etapa de lavagem foi repetida com 500 µL de solução de lavagem com etanol por 5 minutos. A minicoluna foi transferida para um tubo eppendorf, adicionou-se 50 µL de água nuclease-free à minicoluna e incubou à temperatura ambiente por 1 minuto. O DNA foi recuperado através da centrifugação a 14000 rpm por 1 minuto. As amostras foram mantidas a -20°C e quantificadas, para uso posterior.

6.4. Síntese do dsRNA

Protocolo seguido de acordo com o fabricante do do kit da Promega *T7 RiboMAX™ Express RNAi System*. Para todas as amostras de purificados de produtos de PCR do gene de interesse foram necessários 10 µL, 10µL do *RiboMAX 2x buffer* e 2µL *Enzyme Mix*, . Posteriormente, homogeneizou e incubou a 37°C por 30 minutos. Esse procedimento foi realizado para os produtos de PCR contendo a sequência T7 na fita direta (forward) e na fita reversa. As reações diretas e reversas, foram misturadas para que ocorra a formação das fitas de dsRNAs. Após a formação do dsRNA a amostra foi incubada a 70°C por 10 minutos e depois foi adicionada *RNase Solution* 1:200 e adicionou 1 µL da *RNase Solution* e 1 µL *RQ1 RNase free DNase* a cada 20µL de volume da reação total e incubou a 37°C por 30 minutos para a remoção de resquícios de RNA e DNA. Em seguida, o dsRNA foi precipitado através da adição de 4 µL de 3M acetato de sódio (pH 5,2) e 40 µL de isopropanol, homogeneizou e deixou no gelo por 5 minutos. O precipitado foi centrifugado à velocidade de 16000 rpm por 10 minutos e lavado com

500 μ L de etanol 70% gelado e centrifugou por mais 5 minutos. O pellet foi seco a temperatura ambiente por 15 minutos, diluído em água *Nuclease-Free* e estocado a -80°C .

6.5. Infecção de caramujo com linhagem BH

Foram selecionados os camundongos infectados com *S. mansoni* há mais de 45 dias. Os mesmos foram dispostos em gaiolas sem maravalha, forradas com papel. Após 2 horas, as fezes foram coletadas e armazenadas em recipiente para o procedimento de Hoffman, Pons e Janer (1934) que consiste na maceração das fezes com água decolorada gelada. Em seguida, o macerado foi passado por peneiras com poro *mesh* de 0,150mm e 0,038mm. O líquido contendo os ovos foi transferido para placas de petri com exposição à luz até a observação de miracídios na solução. Foram selecionados de 8 a 10 miracídios por caramujo, seguido de exposição à luz por 2 horas. Após, os caramujos foram alocados em aquários com água decolorada e alface. A água e a alimentação são cuidadas constantes, e estarão aptos a liberarem cercárias após 40 dias.

6.6. Cultura de parasitas esquistossômulos

A linhagem BH (Belo Horizonte) do ciclo biológico do *S. mansoni* é rotineiramente mantida no Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, por meio da passagem em camundongos fêmeas da linhagem *Swiss* (Smithers; Terry, 1965) e moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata*. A liberação de cercárias foi por exposição dos caramujos à luz artificial, que produz calor. As cercárias foram retiradas e transferidas para tubos falcon e mantidos em gelo por 1 hora. Em seguida, foram centrifugados a 2000rpm, 4°C por 2 minutos. Descartou-se o sobrenadante e homogeneizou o pellet com meio RPMI + Penicilina-streptomicina. Em seguida, o material foi agitado por um minuto e meio para a quebra das caudas (Ramalho-Pinto et al., 1974). Todas as etapas de lavagens foram realizadas no Fluxo Laminar (Pa40ECO Pachane). As caudas foram retiradas do meio através de lavagens com meio de cultura RPMI + *Penicilina Streptomicina*, transferidos para uma garrafa de cultura e mantidos na estufa a 37°C por 3 horas. Após, os esquistossômulos foram retirados e transferidos para tubo falcon de 15 ml. Esperou-se 10 minutos para decantar, em seguida, foram realizadas 3 lavagens de 6 minutos, 3 lavagens de 5 minutos e 2 lavagens de 4 minutos. Ao final, 200

esquistossômulos foram contados e distribuídos igualmente em placas de cultura com 2ml de Meio 169 (Atená, Biotecnologia), descrito por Basch (1981), suplementado com hormônios e soro fetal bovino, 30 µg de dsRNA e mantidos em estufa a 37°C por 3 dias.

6.7. Extração de RNA e PCR em tempo real

Cercárias e esquistossômulos foram centrifugados por 15 minutos a 12000 rpm. Ao pellet, foi adicionado 750 µL de Trizol (Sigma) e homogeneizado com homogeneizador portátil para fragmentação de tecidos (Tissue-Tearor Modelo 985370). Em seguida, adicionou 200 µL de clorofórmio (Sigma) e agitou por 15 segundos. A incubação ocorreu em temperatura ambiente por 15 minutos, seguida de centrifugação a 4°C a 12000 rpm por 15 minutos (Centrífuga Heal Force Neofuge 15R). Após, em um tubo limpo contendo a fase aquosa, foram adicionados 500 µL de 2-propanol (Sigma). Incubou a temperatura ambiente por 30 minutos, em seguida, centrifugou por 45 minutos a 12000 rpm a 4°C e descartar sobrenadante. O precipitado foi lavado com 1ml de etanol 75% e centrifugado por 5 minutos a 12000 rpm a 4°C. O pellet foi seco naturalmente por 2 minutos, dissolvido em 20 µL água *RNAse free* (Sigma) e incubado por 15 minutos a 56°C para a completa dissolução. O kit utilizado para a síntese de cDNA foi da *Bio-Rad* e o protocolo foi de acordo com o fabricante. Resumidamente, utilizou-se 2µg de RNA e água ultrapura para completar 8µL. Em seguida, foram adicionados 1 µL de 10x *Reaction Buffer* e 1 µL de DNase I, *Amplification Grade*. Homogeneizou e incubou 15 minutos a temperatura ambiente. Após, adicionou 1µL de *Stop Solution* e aqueceu a 70°C por 10 minutos. 4µL da amostra foi retirado para que fosse feito o RT- (sem transcriptase reversa). Para uma reação de 20µL foram adicionados 4 µL de 5x *iScript Reaction Mix* e 1 µL de *iScript Reverse Transcriptase* e incubados nas seguintes temperaturas: 5 minutos à 25°C, 20 minutos à 46°C, 1 minuto à 95°C, 4°C. A PCR em tempo real foi realizada no *Quantstudio 3* (Thermo Fisher) em três réplicas biológicas, usando os seguintes oligonucleotídeos: *SmHP1 forward*: CGTCACTCAGTTCAGACAGC e *SmHP1 reverse*: CTCTTCCACACTCACGGGTA. O tamanho do *amplicom* resultante é 98 pb. O kit utilizado foi o SYBR[®] Green da *Bio-Rad*, para um volume final de 10 µL. O controle endógeno foi o gene *SmEIF4E* (Putativo Fator de iniciação da tradução 4E Eucariótico-Smp_001500) (Pereira et al., 2015). Os valores de ΔC_t foram utilizados para os cálculos de $2^{-\Delta C_t}$ (Livak; Schmittgen, 2001) para calcular a expressão

gênica relativa dos genes em estudo e, posteriormente, analisados no software GraphPad Prism (<https://www.graphpad.com/features>).

6.8. Imunoprecipitação

O protocolo utilizado está disponível em www.abcam.com. Resumidamente, para o tampão de lise não desnaturante foram utilizados os seguintes reagentes com volume final de 15ml: 20mM Tris HCl pH 8, 137mM NaCl, 1% Triton X-100 e 2mM EDTA. O tampão de lavagem foi feito para volume final 15 ml com os reagentes: 10mM Tris pH 7,4, 1mM EDTA, 1mM EGTA pH 8, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, inibidor de proteases, conforme o protocolo da Abcam. Para as amostras foram utilizadas cercárias, estas foram obtidas de caramujos da linhagem BH e tratadas como descrito anteriormente neste relatório. Com as amostras sempre no gelo, foram adicionados 300µl do tampão de lise e homogeneizadas com o auxílio do politron. Em seguida, as amostras foram mantidas sob agitação por 2 horas a 4°C. Após, centrifugadas por 20 minutos a 12000 rpm a 4°C, foram retirados os sobrenadantes e descartados os pellets. Adicionou 100µl de resina proteína A sepharose (Sigma) (beads) e incubou por 20 minutos a 4°C sob agitação. Em seguida, centrifugou a 14000x g 4°C por 10 minutos descartou o pellet. Incubou as amostras com 6µl de anticorpo anti-HP1 na proporção 1:50 por 12 horas a 4°C sob agitação. Para proceder com a lavagem, centrifugou-se os tubos a 2000x g por 2 minutos a 4°C, descartou o sobrenadante. As beads foram lavadas com tampão de lavagem três vezes e centrifugadas para descartar o sobrenadante. A eluição foi realizada com o tampão de corrida SDS (2x). Adicionou-se 50µl de *SDS loading buffer 2x* sem DTT por 10 minutos a 50°C. Após, centrifugou e transferiu o sobrenadante para eppendorf novo e adicionou 50µl de *SDS loading buffer 2x* com DTT. Após, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-page 12% sob a voltagem de 100V.

6.9. Western Blot

Após a eletroforese a 100V, o cassete contendo esponjas, papel, gel e membrana foram montados e dispostos na cuba com tampão de transferência, sob voltagem de 90V por 3 horas. Em seguida, a membrana foi incubada por 1 hora sob agitação com o tampão de bloqueio (5% leite desnatado + PBS 1x + *Tween* 20 0,1%). Em seguida, o tampão foi desprezado e os

anticorpos primários Anti-H3K9me3 (EPR16601) e H3K27me3 (Ab6002) foi adicionado na proporção 1:500, esta etapa ocorreu *overnight* sob agitação na geladeira à 4°C. A etapa seguinte, consistiu na incubação à temperatura ambiente por 3 horas, após, foram realizadas 3 lavagens de 5 minutos com PBS-*Tween* 0,1%. Em seguida, o anticorpo secundário recombinante *anti-rabbit* na proporção 1:1000 e foi incubado por 1 hora e meia seguido de 3 lavagens com PBS-*Tween* 0,1%.

6.10. *Stripping* das membranas de *western blot*

O tampão utilizado para realizar o *stripping* das membranas foi para volume total de um litro com pH 2,2. Foram 15g de glicina, 1g de SDS e 10 ml de *Tween* 20. Completar água até a marca de 1 litro. O tampão foi aquecido por 15 segundos no microondas. As membranas foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente sob agitação. Após, o tampão foi substituído e repetiu o passo anterior por 10 minutos. Em seguida, as membranas foram agitadas por 2 vezes em PBS 1x em temperatura ambiente por 10 minutos. Após, retirar o PBS 1x e adicionar PBS 1x *Tween* 20 0,1% e agitar por 5 minutos, repetir essa etapa 2 vezes. Bloquear as membranas novamente com solução 5% leite + PBS 1x + *Tween* 20 0,1% por 1 hora sob agitação. Em seguida, colocar o anticorpo primário e deixar *overnight* sob agitação a 4°C. Repetir os passos para o protocolo de incubação de *western blot*.

6.11. Digestão do Gel – Espectrometria de massas

As bandas dos géis resultantes da eletroforese SDS-page 12% foram cortadas e descoradas com 500 µl da solução descorante (metanol 50% em água purificada) e incubadas por 2 horas a temperatura ambiente, conforme protocolo cedido pelo Laboratório de Espectrometria de Massas, Laboratório Nacional de Biociências - CNPEM. Em seguida, retirou a solução e adicionou mais 500 µl de descorante e incubou por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida houve a desidratação do gel com 200 µl de acetonitrila pelo período de 5 minutos. Esta etapa foi repetida. Foi permitida a evaporação da acetonitrila por 3 minutos e adicionou 30 µl de DTT 10mM para a redução das pontes dissulfeto da amostra. Centrifugou rapidamente e removeu a solução de DTT. Após a redução, para a etapa de alquilação adicionou 30 µl de iodoacetamida

50mM e incubou por 30 minutos a temperatura ambiente. Centrifugou rapidamente e removeu a solução. 100 µl de bicarbonato de amônio 100mM foi utilizado para lavar o gel por 10 minutos. Após remover a solução, desidratou o gel com 200 µl de acetonitrila e deixou em solução por 5 minutos. A reidratação ocorreu por 10 minutos com 200 µl de bicarbonato de amônio 100mM. Centrifugou rapidamente e removeu a solução. Após, o gel foi desidratado com 200 µl de acetonitrila por 5 minutos, repetiu essa etapa. Adicionou 50µl de tripsina 20ng/µl e incubou em gelo por 30 minutos. Centrifugou rapidamente, retirou a tripsina, adicionou 20µl de bicarbonato de amônio 50mM e deixou overnight a 37°C. Na manhã seguinte foi realizada a etapa de extração dos peptídeos digeridos em gel. Para isso, sem remover a solução de bicarbonato de amônio, adicionou-se 30µl da solução de extração (ácido fórmico 5%), foi incubado por 10 minutos a temperatura ambiente, centrifugou e transferimos o sobrenadante para outro tubo. Em seguida, adicionou 12µl de ácido fórmico 5% + acetonitrila 50%, incubou por 10 minutos a temperatura ambiente. Centrifugou e o sobrenadante foi coletado no tubo separado anteriormente. Repetiu esse processo. Evaporou a amostra por 40 minutos e armazenou a -20°C.

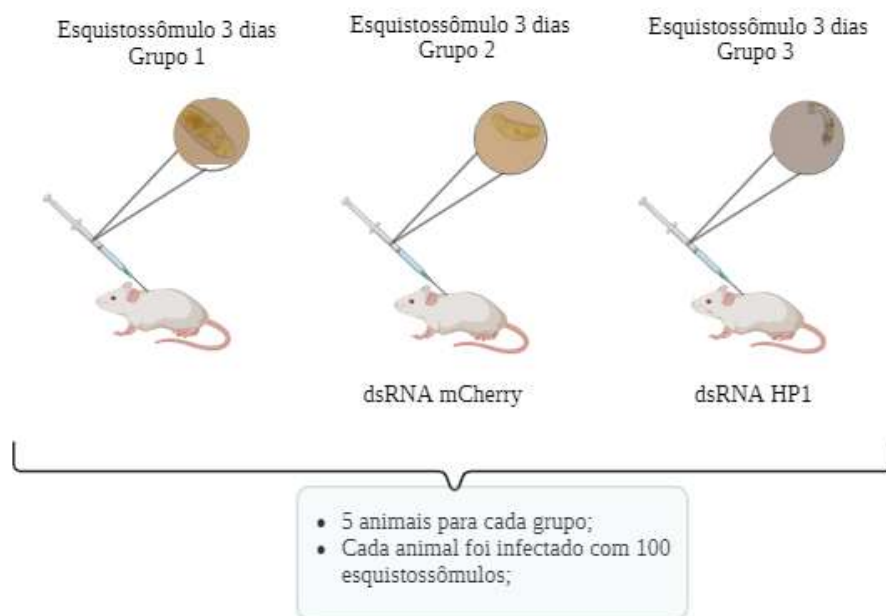
6.12. Espectrometria de massas e análise de dados

Protocolo seguido de acordo com Trindade et al., (2021). As amostras secas foram dissolvidas em 10 µL de solução de acetonitrila a 1% e cada uma foi cromatografada três vezes na classe *Waters Acquity UPLC I* com gradiente de 2–90% de acetonitrila em 45 min usando ácido fórmico a 0,1% como modificador. Os dados brutos foram adquiridos no espectrômetro de massa *Waters Xevo TQ-S* em modo de pesquisa com massas para picos variando de 200 a 1800 e para picos filhos de 200 a 1600 com tensão de cone de 50V e energia de colisão de 20eV. Os arquivos foram convertidos para o formato Mzxml utilizando o software masswolf e a análise foi realizada na plataforma do servidor LabKey com o mecanismo de busca de peptídeos Comet, onde a sequência proteica do arquivo FASTA ([www.uniprot.org/schistosoma.](http://www.uniprot.org/schistosoma)) e a digestão com tripsina foram escolhidas para análise. A carbamidometil foi inserida como modificação fixa e a oxidação da metionina e do triptofano foram inseridas como modificações variáveis.

6.13. Infecção de camundongos

O desenho do experimento foi submetido anteriormente ao Comitê de Ética e aprovado, protocolo 6064-1/2022. O estudo *in vivo* foi realizado com 15 camundongos fêmeas Balb divididos em 3 grupos. O experimento foi realizado de acordo com a figura 10. Cada grupo continha 5 animais, e cada animal foi infectado com 100 esquistossômulos de 3 dias. O grupo 1 é composto por animais infectados com esquistossômulos selvagens, e os grupos 2 e 3 com esquistossômulos incubados com dsRNA mCherry e *SmHP1*, respectivamente. A quantidade de esquistossômulos por animal foi determinada segundo o estudo de Vilar e colaboradores (Vilar; Pinto, 2005). A infecção os grupos 1-3 foi subcutânea.

Figura 10 - Experimento *in vivo* com infecção de esquistossômulos de 3 dias. Grupo 1 - infecção via subcutânea com esquistossômulos de 3 dias sem adição de dsRNA; Grupos 2 e 3 - infecção via subcutânea com esquistossômulos de 3 dias incubados com dsRNA mCherry e dsRNA HP1, respectivamente.



Fonte: Imagem criada pela autora com BioRender.com.

Os animais infectados com o tipo selvagem e dsRNA foram pesados e Kato Katz foram feitos uma semana antes da perfusão. A perfusão foi feita conforme descrito por Smithers e Terry (1965). Para histologia, os tecidos do fígado foram fixados em formaldeído a 10% e fixados em bloco de parafina e fatias de tecido foram cortadas e coloridas pelo tricrômico de Masson. Todos os granulomas presentes em 10 campos aleatórios da seção histológica de cada animal foram

quantificados. As imagens foram capturadas usando um fotomicroscópio usando o software Leica® LAS EZ4 HD. A área total do granuloma foi medida usando o software ImageJ 1.53t.

6.14. Método Kato-Katz

As fezes foram coletadas de todos os animais infectados dos grupos 1-3 tiveram suas fezes coletadas. Após, as fezes foram comprimidas com a tela de metal que possui uma malha, esta malha permite apenas a passagem dos ovos. As fezes que passaram pela tela foram retiradas e transferidas para um cartão retangular que possui um orifício de 6mm de diâmetro que se encontrava em cima da lâmina comum de microscopia. As fezes foram depositadas no orifício de modo a preenchê-lo completamente. Após, as fezes são cobertas com papel celofane imerso em verde malaquita, pressionando a lâmina e invertida em papel toalha absorvente. Após 1 hora as lâminas foram examinadas no microscópio e o número de ovos contados foram multiplicados por 24, assim, obtemos o número de ovos por grama de fezes (Katz, Chaves, Pellegrino, 1972).

6.15. Extração de esporocistos e cercárias

Os esporocistos foram obtidos da cepa *Bg GUA de Biomphalaria glabrata*, 6 meses infectada com a cepa *Sm DFO de S. mansoni*. A dissecação foi realizada em temperatura ambiente. Os caracóis foram colocados individualmente em grandes placas de Petri e água foi adicionada. Com a ajuda de placas de vidro menores, os caracóis foram esmagados e os fragmentos e tecidos foram removidos. Os esporocistos foram transferidos para novas placas de Petri e a membrana que os envolvia foi removida. Em seguida, o pâncreas hepático foi removido e duas amostras foram obtidas para cada caracol, esporocistos livres de tecidos *de Biomphalaria* e esporocistos que podem estar contaminados com tecidos *de Biomphalaria*. As amostras de esporocistos foram armazenadas a -20°C. A cepa Cercária *Sm VEN* foi obtida de caramujos *B. glabrata*. Os caramujos foram colocados em vasos com água e expostos à luz artificial por 2 horas. Em seguida, as Cercárias foram contadas e divididas em alíquotas com 1000 Cercárias cada. Elas foram então armazenadas a -20°C.

Os experimentos foram feitos de acordo com os padrões nacionais de ética. O centro de animais do IHPE possui o número de acordo F6613601 e tem autorização APAFIS #39910-2022121915564694 v2 para a produção de rotina e uso compartilhado de larvas de *S. mansoni*.

6.16. ChIPmentation *Schistosoma mansoni* (cercárias e esporocistos) e *Drosophila melanogaster*

Os parâmetros utilizados foram previamente determinados por testes e o protocolo completo está descrito em Diagenode (2021), disponível em <https://www.diagenode.com/en/categories/chromatin-ip-chipmentation>. Os ajustes no protocolo e o desenvolvimento do mesmo foram realizados na Universidade de Perpignan - França sob a orientação do Dr. Christoph Grunau. O protocolo foi realizado com *D. melanogaster* com o objetivo de comparação, pois estudos da proteína HP1 já estão bem estabelecidos neste organismo. Resumidamente, foram utilizados 4 µL de anticorpo HP1 AbCam (ab109028) e a enzima Tn5 foram utilizados na proporção de 1/10 Essa proporção foi determinada avaliando os resultados dos fragmentos gerados pelo sonicador. Aproximadamente 10⁶ células de esporocistos, cercárias e *Drosophila* foram utilizadas para o protocolo. As amostras foram descongeladas, ressuspensas em 500 µL de HBSS, trituradas por 1 minuto com pilão estéril e depois deixadas em temperatura ambiente por 3 minutos. Em seguida, foram adicionados 13,5 µL de formaldeído a 37% e homogeneizados suavemente por 10 minutos em temperatura ambiente. Para interromper a fixação foram adicionados 57 µL de glicina e deixados sob agitação por 5 minutos. Centrifugou a 500 xg durante 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado. Os pellets foram ressuspensos em 1 ml de tampão de lise iL1 gelado e transferidos para um Dounce. Cada amostra foi homogeneizada por 5 minutos e deixada em repouso por 5 minutos. Centrifugação a 500 xg durante 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado. O sedimento foi ressuspense em 1 ml de tampão de lise iL2 gelado e incubado a 4°C durante 10 minutos sob agitação. Centrifugação a 500 xg durante 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado. 100 µL de tampão de cisalhamento iS1 completo foram adicionados a cada tubo e transferidos para tubos de sonicação. A cromatina foi interrompida por sonicação usando o Bioruptor Pico®: 5 ciclos 30s ON e 30s OFF. Os parâmetros de ChIPmentation foram definidos de acordo com o protocolo pré-estabelecido (Diagenode, 2021) com modificação do tempo de lavagem para 20

minutos. Em seguida, os primers foram retirados das bibliotecas e a qualidade das amostras foi verificada com o bioanalisador.

6.17. Análises de Bioinformáticas

As análises foram realizadas em uma instância local do Galaxy (<http://bioinfo.univ-perp.fr>). Primeiro, a qualidade das sequências foi verificada pelo FastQC/MultiQC, as sequências adaptadoras foram removidas com o Trim Galore! e as leituras foram alinhadas à versão 9 do genoma do *S. mansoni* (*schistosoma_mansoni* . PRJEA36577 . WBPS17 . genomic . fa) com permissão de <https://parasite.wormbase.org/>) ²⁷ usando Bowtie2 evocando ponta a ponta sensível. Leituras alinhadas exclusivamente foram retidas usando a tag Bowtie”: “XS:”. Duplicatas de PCR foram removidas com SamTools RmDup. O número de leituras exclusivas alinhadas foi reduzido para 4,7 milhões de leituras por biblioteca usando Picard Tools (Tabela 2 do Suplemento). A análise diferencial foi feita com ChromstaR ²⁸, com tamanho de bin de 1000 pb e tamanho de passo de 500 pb. As anotações vieram de *schistosoma_mansoni* . PRJEA36577 . WBPS17 . genes . gff3 . Para análises de metagene, a característica do gene foi retida e 4898 genes da fita direta foram usados. Estados diferenciais de cromatina foram detectados com parâmetros padrão do ChromstaR. Peakcalling foi realizado também com MACS2 e parâmetros padrão, seguido por MACS2 bdgbroadcall, com 2 e 5 como valor de corte. Enriquecimento diferencial de HP1 foi detectado por DiffBind. ²⁹ IGV foi usado para inspeção visual. Os mesmos procedimentos foram aplicados aos dados de *D. melanogaster* com base em *dmel_r6* . 06_FB2015_03_gtf_dmel-all-r6 . 06. gff3 e o arquivo fasta do genoma correspondente.

7. RESULTADOS

7.1. Utilização do Anticorpo Abcam ab109028 e testagem para ChIP-seq

Para os experimentos de testagem do anticorpo, foram utilizados os estágios de esporocisto e cercária de *S. mansoni* e embriões de *D. melanogaster* como controle positivo. Embora o estabelecimento da técnica ChIPmentation para *S. mansoni* tenha sido descrita por Lasica et al., (2022) foi necessário testar se o anticorpo Abcam ab109028, pois é necessário que o anticorpo seja capaz de gerar dados de ChIP-seq de alta qualidade, assim, a testagem seguiu o protocolo descrito por Cosseau e Grunau (2011). A pesquisa para o anticorpo ab109028 retornou 32 resultados (Tabela 2), no qual apenas 1 utilizou este anticorpo para ChIP-seq, no entanto, não foi relatado informações sobre a qualidade do anticorpo para esta técnica.

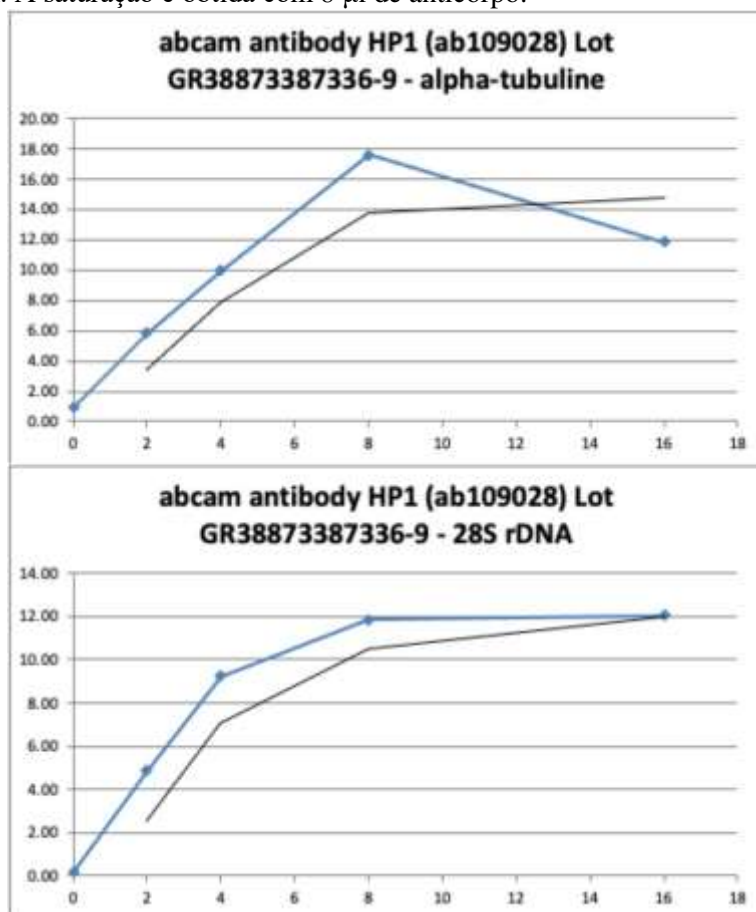
Tabela 2 - Busca para uso anterior do anticorpo Abcam ab109028

Nome	Referência	Técnica	Cat# (Abcam)
CBX5	https://doi.org/10.1186/s12935-020-1157-7	Western Blot	ab109028
HP1	https://doi.org/10.1007/s43032-021-00500-x	Western Blot	ab109028
HP1	https://doi.org/10.1093/nar/gkab249	Western Blot	ab109028
HP1 α	https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.01.003	Coloração imunofluorescência	ab109028
HP1 α	https://doi.org/10.1038/s41556-022-01008-5	eCLIP-seq	ab109028
HP1 α	https://doi.org/10.3390/cancers12102833	Immunohistochemistry	Ab109028
CBX5	https://doi.org/10.1186/s12885-023-11108-6	Western Blot	Ab109028
HP1 α	https://doi.org/10.7554/eLife.63972	Immunoblotting and immunostaining	Ab109028
HP1 α	https://doi.org/10.1101/2024.02.07.579285	Cell Tension	Ab109028
HP1	https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.04.001	Immunofluorescence	Ab109028
HP1 α	https://doi.org/10.1038/s41467-023-38118-z	immunofluorescence	Ab109028
HP1 α	https://doi.org/10.1186/s13059-021-02455-3	immunofluorescence	Ab109028
HP1 α	DOI: 10.1126/sciadv.abq4831	immunofluorescence	Ab109028
HP1 α	https://doi.org/10.1096/fj.201700753R	immunofluorescence and Western Blot	Ab109028

HP1 α	https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2023.103592	immunofluorescence	Ab109028
HP1 α	https://doi.org/10.1080/15384101.2018.1471313	Immunocytochemistry	Ab109028
HP1 α	https://doi.org/10.1007/s10529-005-0014-z	identification of Lactobacillus acidophilus	Ab109028
CBX5	https://doi.org/10.1021/acsomega.1c05381	Chemiprecipitation	Ab109028
HP1 α	https://doi.org/10.15252/embr.202051041	immunoblotting, immunofluorescence, flow cytometry	Ab109028
HP1 α	https://doi.org/10.1111/cpr.13566	immunofluorescence	Ab109028
HP1 α	https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109694	Western Blot and immunoprecipitation	Ab109028
HP1	10.18632/genesandcancer.84	Western Blot	Ab109028
HP1 α	https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.08.006	Immunoblots	Ab109028
HP1 α	https://doi.org/10.1091/mbc.E18-04-0256	immunofluorescence	Ab109028
HP1 α	https://doi.org/10.18632/genesandcancer.84	Western Blot	Ab109028
HP1 α	https://doi.org/10.1101/2023.07.17.549271	Immunofluorescence	Ab109028
HP1 α	https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.12.016	immunofluorescence and Western Blot	Ab109028
HP1 α	https://doi.org/10.1101/2023.12.03.569804	Immunoprecipitation and Western Blot	Ab109028
HP1 α	https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112329	Immunofluorescence	Ab109028
HP1 α	https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.12.013	Immunofluorescence	Ab109028
HP1 α	https://doi.org/10.1101/2023.12.21.572889	Immunofluorescence	Ab109028
HP1 α	https://doi.org/10.1101/2023.11.09.566494	ChIP-seq	Ab109028
HP1 α	https://doi.org/10.17615/p7cp-z032	Co-Immunoprecipitation	Ab109028

Dada a falta de dados acerca da qualidade do anticorpo para o uso em experimentos ChIP-seq, procedemos ao protocolo segundo Cosseau e Grunau (2011). Uma quantidade constante de cromatina correspondente a 160.000 células foi incubada com 0, 2, 4, 8 e 16 μ l de ab109028 durante o procedimento ChIPmentation e a recuperação de entrada foi medida usando qRT-PCR em 2 loci escolhidos arbitrariamente: *Sm*-alfa-tubulina e *Sm*-28S-rDNA. Os resultados mostraram saturação do anticorpo com o uso 8 μ l do anticorpo (Figura 11).

Figura 11 - Titulação do anticorpo ab109028 (anti-HP1). O eixo X indica a quantidade de anticorpo em μl , o eixo Y indica a recuperação de entrada em %. Painel superior para Sm-alfa-tubulina, painel inferior para Sm-28S-rDNA. A saturação é obtida com 8 μl de anticorpo.

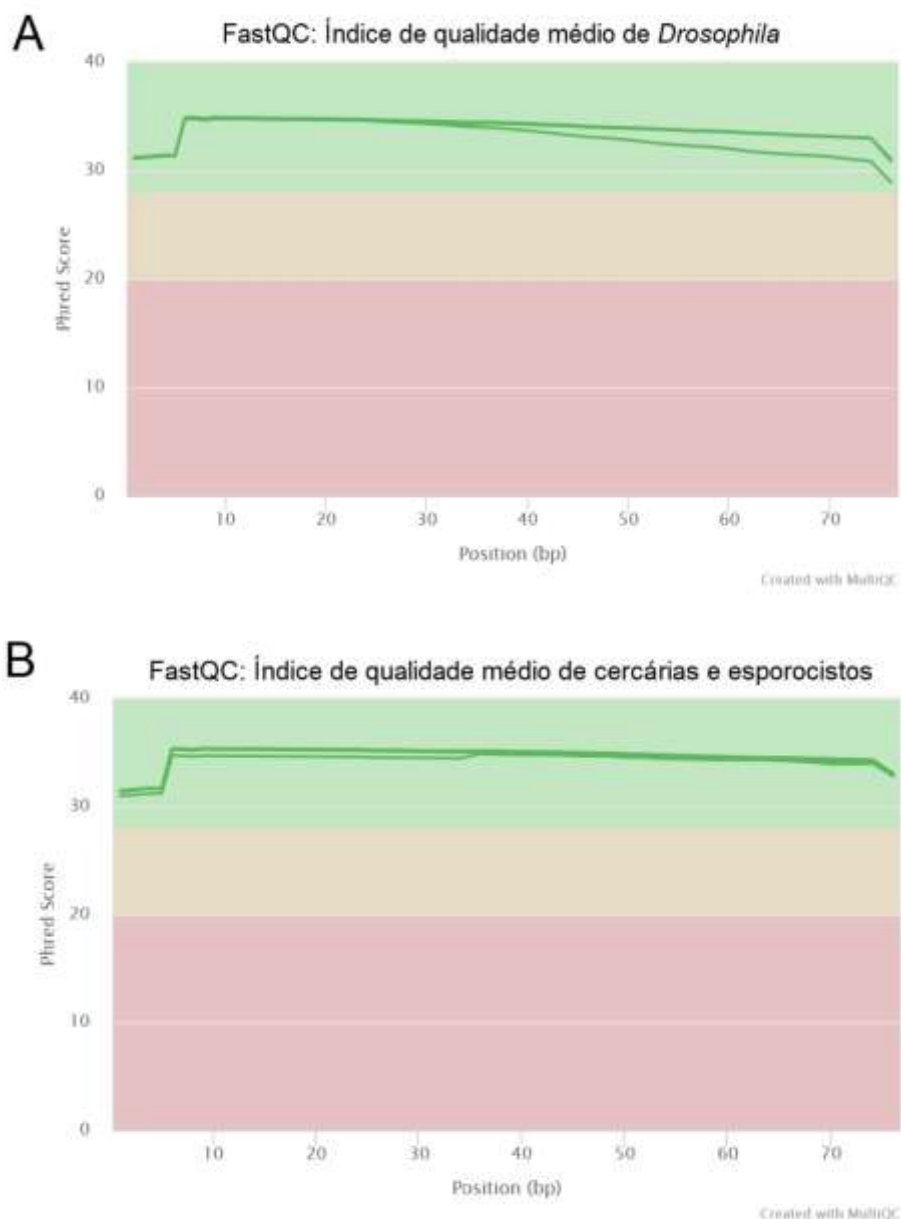


Fonte: Organizado pela autora.

7.2 O controle de qualidade do alinhamento mostra uma porcentagem muito boa de alinhamento esperado de mapeamento exclusivo

O controle de qualidade das leituras de sequenciamento é o primeiro passo para prosseguir com as análises, pois garantem que os dados sejam de alta qualidade (Nakato; Sakata, 2023). Utilizamos a ferramenta FastQC para analisar a qualidade das amostras de esporocistos, cercárias e *Drosophila* (Figura 12). O controle de qualidade após o sequenciamento mostra excelente qualidade.

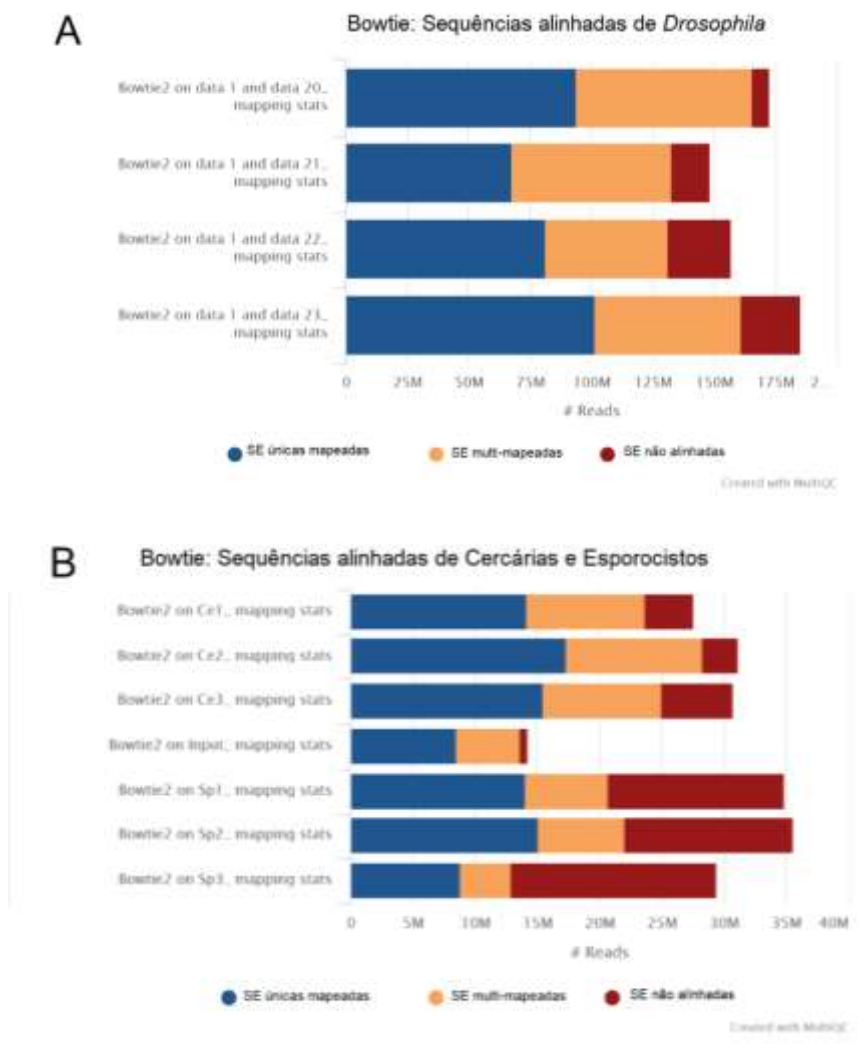
Figura 12 - Controle de qualidade após o sequenciamento utilizando a ferramenta FastQC. Qualidade média das sequências de *Drosophila* (A), cercárias e esporocistos (B) baseadas na escala Phred.



Fonte: Organizado pela autora.

A qualidade das sequências alinhada exclusivamente mostrou alta qualidade (Figura 13) com alinhamentos exclusivos acima de 45,7% para *Drosophila*, 51,1% para cercárias e 29,9% para esporocistos. Os dados de esporocistos mostram um alinhamento com o hospedeiro *B. glabrata*, devido ao método de obtenção dos esporocistos.

Figura 13 - Alinhamento das sequências de cercárias (Ce1, Ce2 e Ce3), esporocistos (Sp1, Sp2 e Sp3) e *input* sequenciadas com a ferramenta Bowtie2. Representados em azul estão as sequências alinhadas exclusivamente com o genoma de *S. mansoni*. Em vermelho estão as sequências que não foram alinhadas. Em esporocistos, o aumento de sequências não alinhadas é resultado da presença de material de *B. glabrata*.



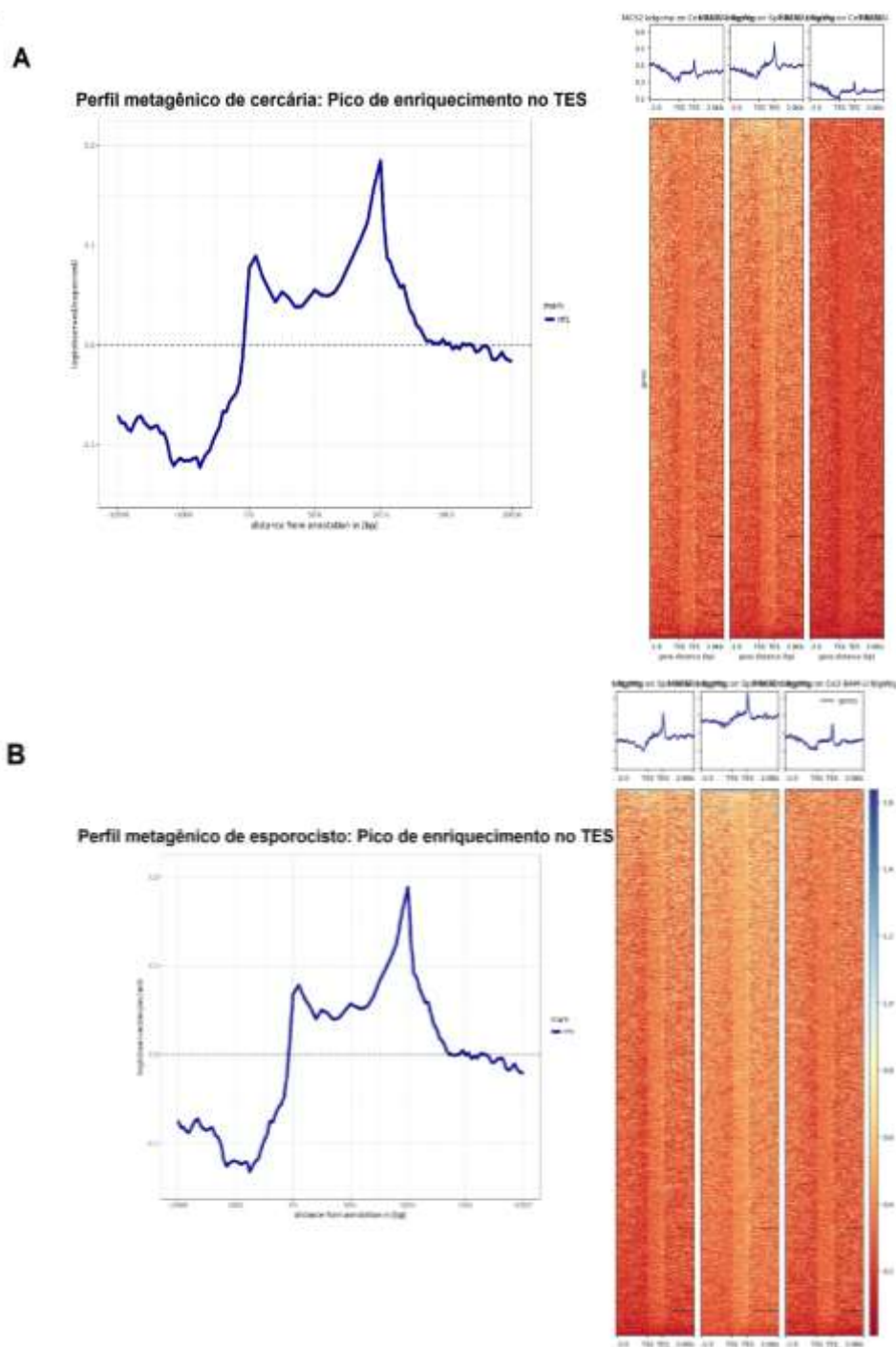
Fonte: Organizado pela autora.

7.3. Enriquecimentos encontrados em torno do TES em *S. mansoni*

Não foram encontradas diferenças nos perfis metagênicos de cercárias e esporocistos. O enriquecimento dos picos em ambos os estágios ocorre em torno do TES (Figura 14). Os perfis metagênicos foram produzidos em torno de genes codificadores de proteínas. Dois genes tiveram diferenças de enriquecimento, Smp_330520 e Smp_344610. Smp_330520 foi encontrado em

tanto em esporocistos quanto em cercárias, no entanto, possui maior enriquecimento de *SmHP1* em esporocistos. Smp_344610 foi encontrado com maior enriquecimento de *SmHP1* em cercárias com baixa expressão em ambos os estágios. O mRNA de Smp_330520 estava presente em cercárias. Ambas as proteínas não possuem funções descritas disponíveis no *WormBase* (<https://parasite.wormbase.org/index.html>) e UniProt (<https://www.uniprot.org/>), mas são partes de redes de interações proteína-proteína no banco de dados STRING (<https://string-db.org/>). Embora a maioria das proteínas presentes nessas redes de interações não sejam caracterizadas, Smp_330520 interage com proteínas tirosina-quinases e Smp_344610 interage com Citocromo c oxidase. As proteínas tirosina-quinases são responsáveis pela transdução de sinal extracelular para o citoplasma através da fosforilação de resíduos de tirosina (Hubbard; Till, 2000). Citocromo c oxidase é o complexo terminal da fosforilação oxidativa eucariótica (Watson; McStay, 2020). Tanto Smp_330520 quanto Smp_344610 parecem estar relacionadas ao processo de fosforilação.

Figura 14 - Perfil metagênico e *heatmap* de *SmHP1* em torno dos locais finais da transcrição dos estágios de desenvolvimento do ciclo de vida do *S. mansoni*, cercaria (A) e esporocisto (B).



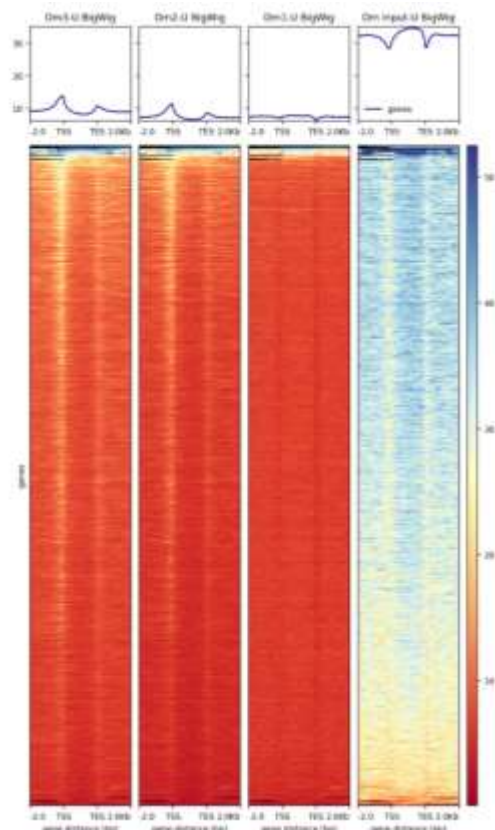
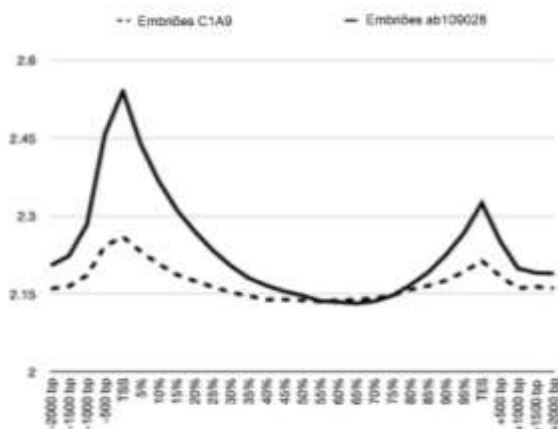
Fonte: Organizado pela autora.

Os resultados encontrados para *SmHP1* foram comparados com os resultados obtidos no controle positivo *Drosophila*, utilizando o mesmo anticorpo e submetido ao mesmo protocolo. Como esta abordagem nunca havia sido realizada para *S. mansoni*, foi necessário a confirmação

do perfil não canônico obtido para este parasita. Assim, houve a necessidade de comparação com outro organismo, no qual o perfil da cromatina relacionada à proteína HP1 estivesse melhor caracterizada. O organismo de escolha foi a *Drosophila*, pois o estudo de HP1 neste organismo é aprofundado e, portanto, um excelente organismo modelo para estudos comparativos. Os resultados encontrados por Zenk e colaboradores (2021) foram determinantes para compararmos os perfis de cromatina gerados por HP1 nos dois organismos. O perfil canônico encontrado em *Drosophila* por Zenk et al (2021) foi obtido a partir do anticorpo específico C1A9, diferindo do anticorpo utilizado para *S. mansoni*. Para que o anticorpo ab109028 pudesse ser validado, era necessário que os resultados encontrados para este anticorpo em *Drosophila* corroborassem com o perfil encontrado para este organismo utilizando outro anticorpo. Assim, procedemos às análises para *Drosophila* utilizando o anticorpo ab109028 e comparamos o perfil gerado com os resultados encontrados por Zenk et al (2021). O enriquecimento para *Drosophila* foi visualizado em torno dos sítios iniciais da transcrição (TSS) (Figura 15) e o perfil metagênico de HP1 encontrado em *Drosophila* em nosso estudo corrobora com resultados encontrados anteriormente por Zenk et al (2021). Os resultados mostraram que o perfil metagênico obtido com o anticorpo ab109028 não difere de resultados encontrados por outro grupo de pesquisa independente.

Figura 15 - Perfis metagênicos e *Heatmap* de *Drosophila*. O perfil metagênico do presente estudo utilizando o anticorpo ab109028 (linha contínua) e perfil metagênico obtido em estudo anterior (Zenk et al., 2021) com anticorpo C1A9 (linha pontilhada). Os picos de enriquecimento mostrados para *Drosophila* estão em torno do TSS. *Heatmap* de *Drosophila* mostrando a distribuição dos genes e pico de enriquecimento em torno do TSS utilizando o anticorpo ab109028 comparados com os dados do *input*.

Perfis metagênicos de embriões de *D. melanogaster*

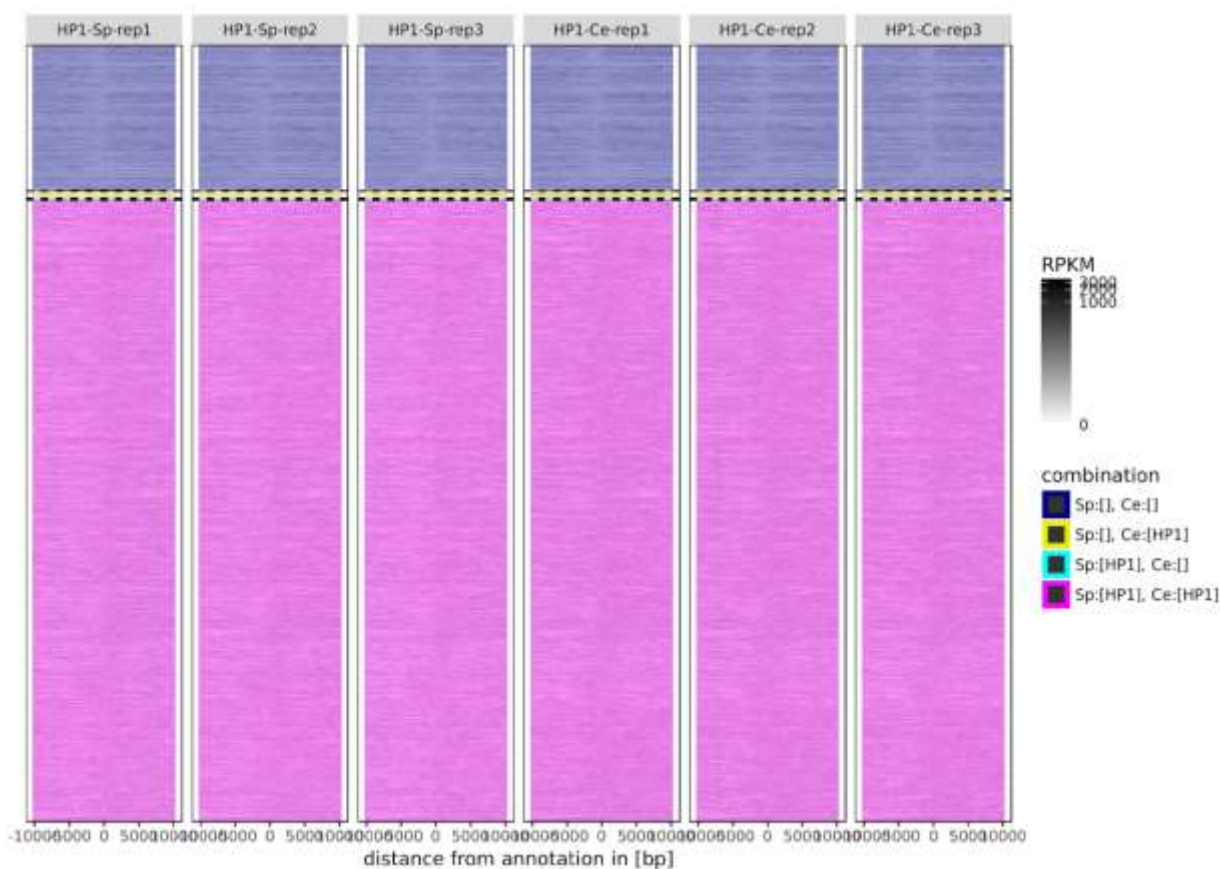


Fonte: Organizado pela autora.

7.4. *SmHP1* está em quase todo o genoma e há diferenças entre esporocistos e cercárias

SmHP1 foi encontrado praticamente em todo genoma de ambos os estágios de desenvolvimento de *S. mansoni*. Entretanto, apesar da maioria dos genes que se ligam a *SmHP1* serem encontrados em ambos os estágios, foram verificados genes diferencialmente expressos exclusivos de cada estágios (Figura 16).

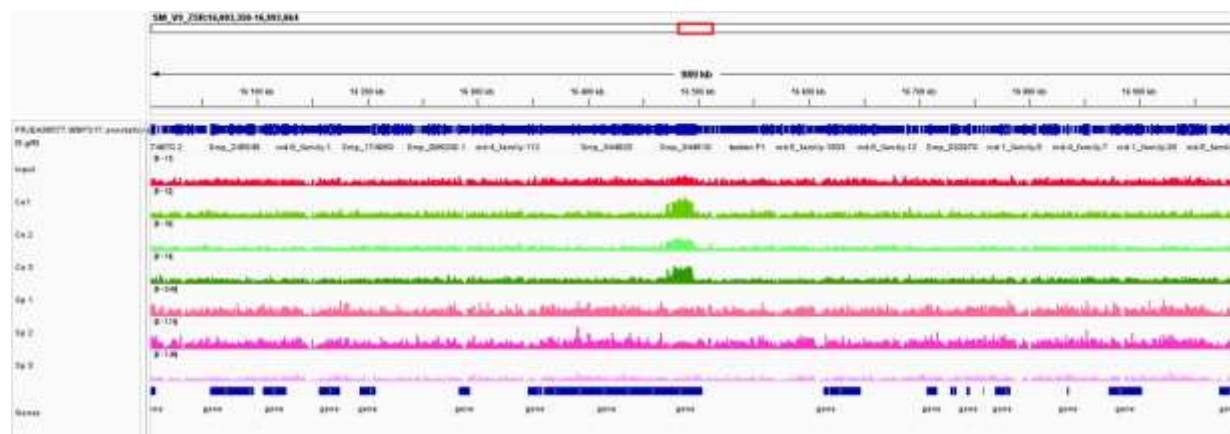
Figura 16 - *Heatmap* do enriquecimento de genes nos estágios de desenvolvimento de *S. mansoni*, esporocistos (Sp1, Sp2 e Sp3) e cercárias (Ce1, Ce2 e Ce3) nas três replicatas. Cada linha no *heatmap* representa um gene. Em rosa estão representados os genes que estão presentes em ambos os estágios. Em azul escuro são os genes que não estão presentes em nenhum dos estágios investigados. Em amarelo estão representados os genes que estão presentes apenas em cercárias e em azul claro os genes presentes apenas em esporocistos.



Fonte: Organizado pela autora.

A distribuição do enriquecimento de *SmHP1* é homogênea e reproduzível nas três replicatas. Não foram encontradas fortes diferenças na distribuição dos picos de enriquecimento ao longo dos cromossomos dos estágios de desenvolvimento estudados de *S. mansoni*. No entanto, a principal diferença encontrada no enriquecimento dos picos foi no cromossomo Z com maiores picos em cercárias (Figura 17). O gene enriquecido em cercárias no cromossomo Z foi Smp_344610.

Figura 17 - Visualização da distribuição dos picos de enriquecimento no cromossomo Z com o programa IGV. Em verde estão as réplicas de cercárias (Ce1, Ce2 e Ce3), em rosa as réplicas de esporocistos (Sp1, Sp2 e Sp3) e em vermelho está o *input*.

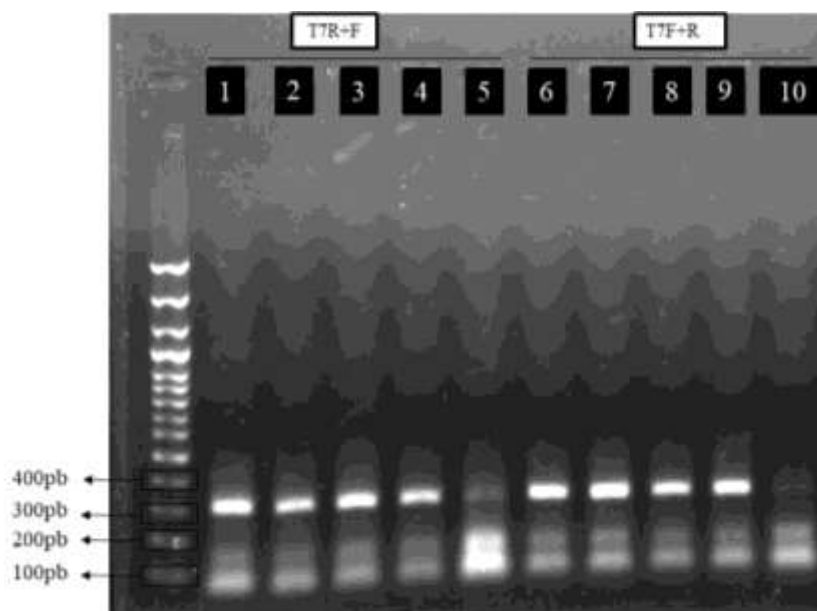


Fonte: Organizado pela autora.

7.5. Padronização do ciclo de PCR para amplificação dos primers para o experimento de RNA de interferência

Os *primers* contendo a sequência T7 apresentaram diferença na temperatura de *annealing*, 10°C acima dos *primers* que não continham essa sequência. Devido a essa diferença nas temperaturas dos *primers* foi necessário padronizar o ciclo de PCR. Assim, padronizamos a temperatura de *annealing* de 58°C para a amplificação de HP1. As sequências dos primers utilizados para síntese do dsRNA estão descritas na Tabela 1. O *amplicon* esperado foi de 309 pb, assim, procedemos a testagem dos primers utilizando cDNA de cercaria. Foi realizada PCR seguida de eletroforese em gel de agarose 1%, o gel resultante foi visualizado por fotodocumentador (Molecular Imager® Gel Doc™ XR+Cystem Biorad). Após verificarmos o correto funcionamento dos *primers*, procedemos às novas amplificações com o intuito de purificar o DNA do gel, no entanto, com volume de 25µl (Figura 18). As bandas correspondentes ao *amplicon* foram cortadas e submetidas aos protocolos descritos de purificação e síntese do dsRNA. Os mesmos passos foram seguidos para o controle mCherry.

Figura 18 – Gel agarose 1% corado com brometo de etídeo. Os amplificadores de HP1 de 309 pb foram excisados e purificados. Os poços 5 e 10 correspondem aos controles negativos (sem adição de cDNA). Etapas: desnaturação: 30 segundos à 95°C, *annealing*: 90 segundos à 58°C e extensão: 60 segundos à 72°C, por 35 ciclos. (T7R+F - *primer* T7 reverse e *primer* forward SmHP1; T7F+R - *primer* T7 forward e *primer* reverse SmHP1).



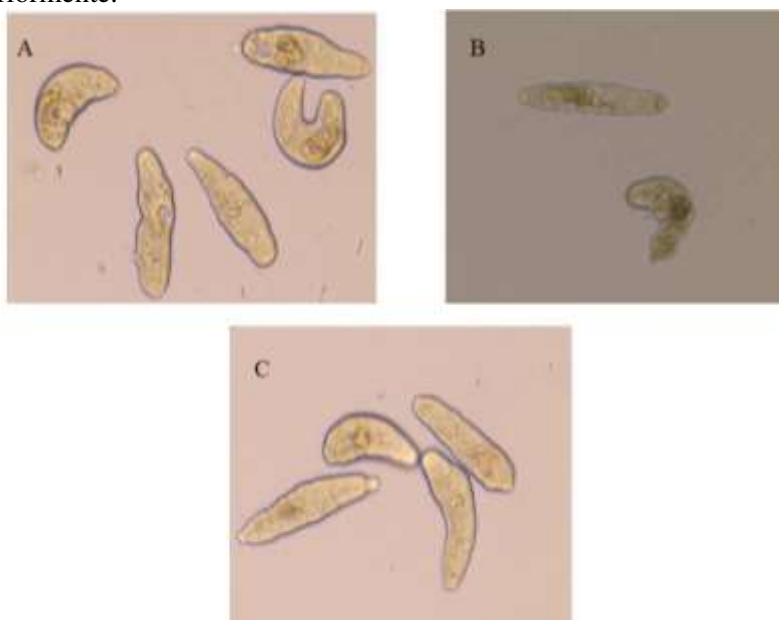
Fonte: Organizado pela autora.

7.6. Cultura de Parasitas

Após obtermos o *amplicon* esperado, cortamos as bandas correspondentes e procedemos ao protocolo de purificação de DNA presente no gel de agarose 1%, seguido do protocolo para síntese de dsRNA. O dsRNA foi incubado em culturas de esquistossômulos pelo período de 3 dias. As culturas foram analisadas visualmente, a fim de verificar mudanças morfológicas no corpo dos esquistossômulos incubados com dsRNA (Figura 19). Comparando as culturas incubadas com dsRNA-HP1 (Recorte A) e dsRNA-mCH (Recorte B) com o controle não tratado (Recorte C), não foram observadas mudanças morfológicas. De acordo com o estudo de Stefanic et al., (2010), a quantidade de esquistossômulos e a concentração de dsRNA podem alterar a efetividade da resposta ao dsRNA. Inicialmente, foram 50 esquistossômulos e 7,5 µg de dsRNA, entretanto, essas variáveis foram modificadas seguindo o protocolo de Stefanic 2010 (Stefanic et al., 2010). Sabe-se que uma maior variabilidade das amostras reduz erros, dessa forma, a quantidade de esquistossômulos e a concentração de dsRNA foi padronizada em 200 e 30 µg, respectivamente.

Figura 19 - Culturas de esquistossômulos de 3 dias. Esquistossômulos incubados com (A) dsRNA-HP1 e (B) dsRNA-mCH. (C) Cultura controle sem adição de dsRNA. Os esquistossômulos foram mantidos em

estufa à 37°C, com meio M-169, suplementado com hormônios, antibiótico e antimicótico suplementado como descrito anteriormente.



Fonte: Organizado pela autora.

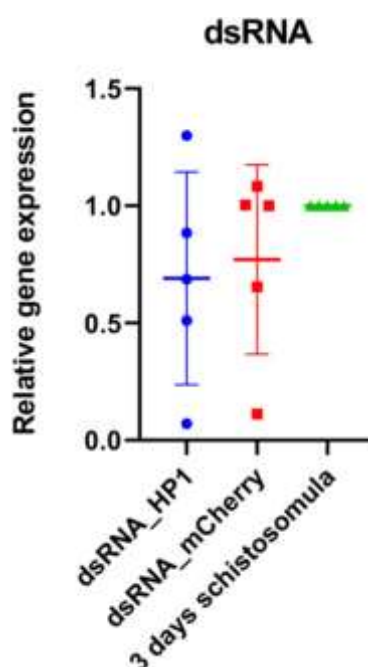
Ao final dos três dias, todas as culturas tiveram o RNA total isolado pelo método do Trizol e o cDNA sintetizado a partir de 1 µg de RNA pelo protocolo descrito anteriormente. Em seguida, o silenciamento gênico foi medido por qPCR.

7.7. Silenciamento gênico por dsRNA

Estudos anteriores com RNAi em *S. mansoni* (Coelho et al., 2023; Moescheid et al., 2023; Wang et al., 2020; Mourão et al., 2009; Rinaldi et al., 2009; Skelly, Da'dara, Harn, 2003) não postularam uma taxa ideal para o silenciamento ser considerado efetivo e apresentaram diferentes taxas de silenciamento para *S. mansoni*. Assim, não podemos concluir que nosso estudo não apresentou taxa de silenciamento efetiva, pois apesar de baixa, foram notadas diferenças entre as culturas incubadas. As culturas de esquistossômulos de 3 dias incubadas com dsRNA HP1 quando comparadas ao controle dsRNA mCherry sugerem silenciamento gênico com redução de 26% da expressão gênica (Gráfico 1). Todas as culturas foram analisadas por qPCR para verificar se houve redução da expressão gênica. No total, foram 5 replicatas

biológicas, cada uma contendo triplicatas técnicas, assim, cada ponto no gráfico está representando a média das triplicatas.

Gráfico 1 - Expressão gênica relativa de culturas de dsRNA de esquistossômulos comparada à expressão de esquistossômulos sem tratamento. A expressão gênica foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, usando esquistossômulos não tratados como calibrador de expressão gênica e o gene endógeno foi SmEIF4E (Smp_001500).



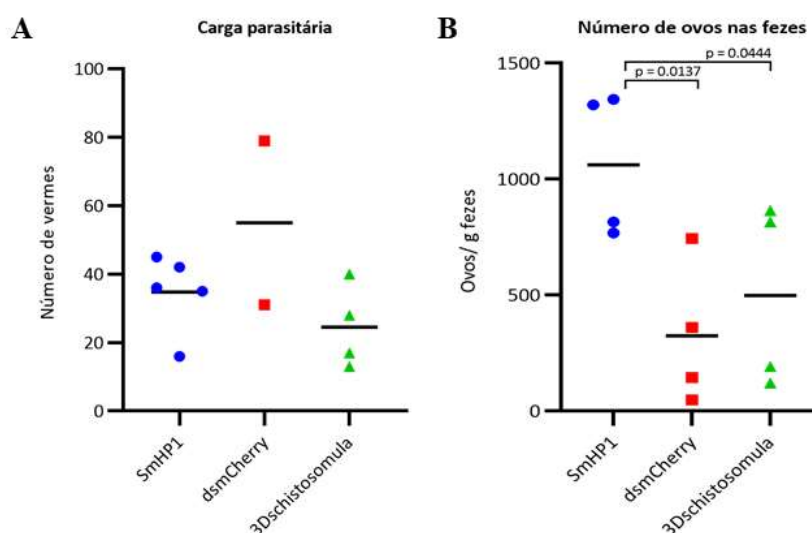
Fonte: Organizado pela autora.

7.8. Oviposição duas vezes maior em parasitas *knockdown* para SmHP1

O questionamento se SmHP1 desempenha algum papel no parasita *in vivo* ganhou força após os resultados do ChIP-seq mostrarem uma distribuição inesperada de SmHP1 ao longo do genoma e a ausência de diferenças importantes entre esporocistos e cercárias. Assim, o estudo *in vivo* foi desenvolvido com 15 camundongos divididos em 3 grupos (grupo 1 – esquistossômulos de 3 dias não incubados com dsRNA; grupo 2 - esquistossômulos de 3 dias incubados com dsRNA-mCherry e grupo 3 - esquistossômulos de 3 dias incubados com dsRNA-SmHP1). Os esquistossômulos foram inoculados subcutâneamente nos camundongos e os animais foram acompanhados por 49 dias. Após, cada gupo foi analisado quanto às cargas parasitárias e à

resposta imunológica granulomatosa. Os grupos 2 e 3 tiveram maiores cargas parasitárias quando comparados ao grupo 1 (Gráfico 2A). Os animais do grupo 2 apresentaram maior debilidade com perda de 3 animais, enquanto 1 animal morreu no grupo 1. O grupo 3 não teve perda de animais e a quantidade de ovos encontrados nas fezes neste grupo foi maior (Gráfico 2B).

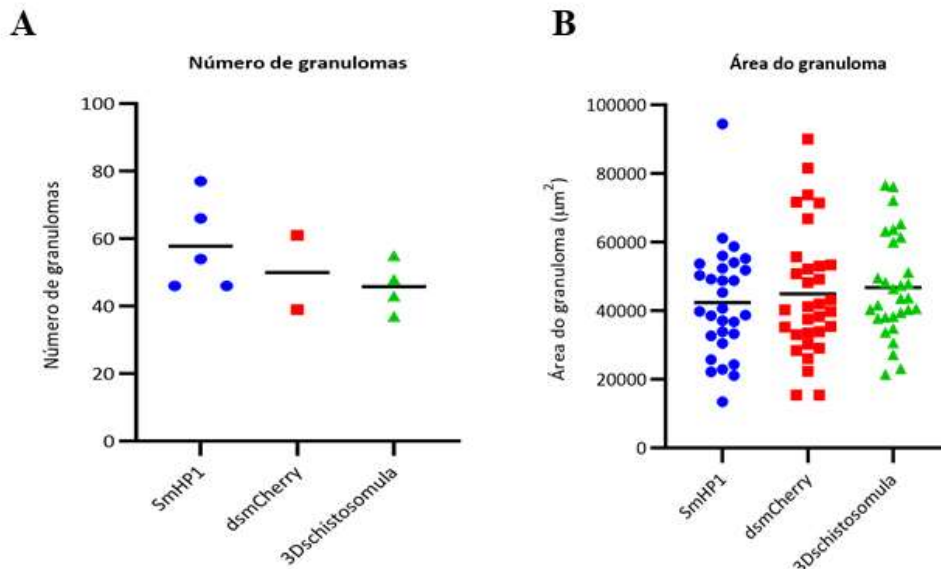
Gráfico 2 - Análise estatística dos grupos 1-3 para (A) carga parasitária e (B) quantidade de ovos nas fezes. Os dados foram analisados estatisticamente usando GraphPad Prism 8 (versão 8.4.3) para Windows. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar a normalidade dos dados. As diferenças estatísticas entre os grupos foram analisadas por meio de ANOVA unidirecional, teste *post hoc* LSD de Fisher, onde $p < 0,05$ foi considerado significativo.



Fonte: Organizado pela autora.

A resposta inflamatória foi avaliada por contagem e medição das áreas dos granulomas formados nos grupos 1-3. Apesar de não encontrarmos diferenças estatísticas entre os grupos, o grupo 3 apresentou maior número de granulomas (Gráfico 3A), mas sem alterar as áreas dos granulomas (Gráfico 3B e Figura 20). Embora o grupo 2 tenha número reduzido de camundongos, a quantidade de granulomas encontrados estava bem elevada.

Gráfico 3 - Análises estatísticas do (A) número de granulomas por animal e a (B) área de cada granuloma. A área foi obtida pela medição dos granulomas através do software ImageJ e os valores obtidos foram analisados estatisticamente no GraphPad Prism 8 (versão 8.4.3). O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar a normalidade dos dados. As diferenças estatísticas entre os grupos foram analisadas por meio de ANOVA unidirecional, teste *post hoc* LSD de Fisher, onde $p < 0,05$ foi considerado significativo.



Fonte: Organizado pela autora.

Os granulomas em *S. mansoni* provocam uma reação de hipersensibilidade tardia mediada por células e a composição celular do granuloma varia de acordo com o tempo de infecção. No entanto, as células recrutadas para o granuloma incluem principalmente, neutrófilos, eosinófilos, monócitos, linfócitos e células epitelioides (Llanwarne, Helmby, 2020). A maioria das células encontradas nos granulomas de *S. mansoni* são os eosinófilos e em menor proporção estão os neutrófilos (Llanwarne, Helmby, 2020). Nossos resultados histológicos dos fígados dos animais contidos nos grupos 1-3 revelam uma diferença de células presentes nas respostas imunológicas dos grupos (Figura 20). No grupo 3, a coloração das células presentes ao redor dos granulomas sugere uma diferença na resposta imune do hospedeiro. Entretanto, estudos com objetivo de investigar as diferenças na resposta imune dos grupos não foi o foco deste trabalho.

Figura 20 - Histologia do fígado de camundongos infectados com esquistossômulos de 3 dias (Grupos 1-3). Da esquerda para direita estão os granulomas obtidos por histologia dos grupos 1, 2 e 3, respectivamente.

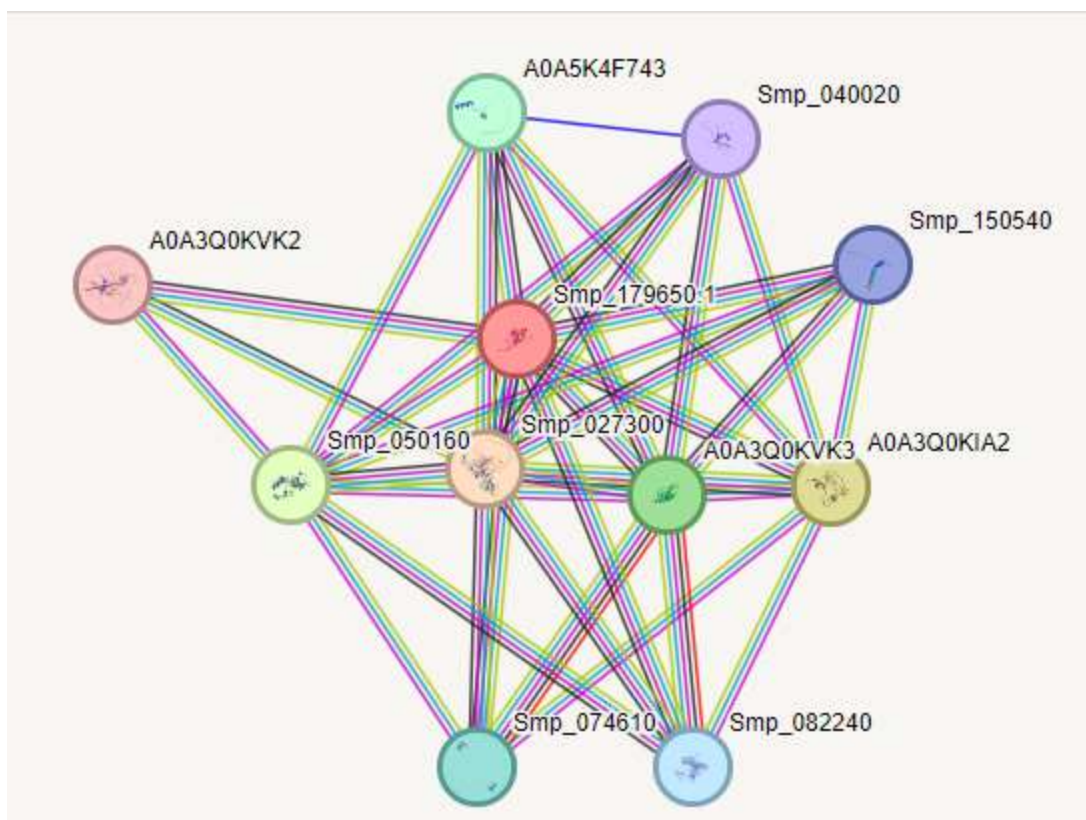


Fonte: Organizado pela autora.

7.9. *SmHP1* interage com proteínas importantes para a regulação da transcrição

Os experimentos Chip-seq e *in vivo* mostraram que *SmHP1* parece exercer funções importantes, no entanto, sem seguir um padrão canônico, quando comparado com o modelo de *Drosophila*. Para agregar na busca pelo conhecimento de *SmHP1* decidimos realizar imunoprecipitação seguida de espectrometria de massas (IP-MS) do estágio cercariano. Esta análise teve como objetivo compreender se *SmHP1* faz interações de modo a contribuir com o estado transcricionalmente silenciado de cercarias. Entretanto, antes de procedermos a IP-MS fizemos uma busca no banco de dados STRING utilizando a proteína *SmHP1* como entrada única para conhecermos as possíveis interações desta proteína. A análise resultou em proteínas importantes que provavelmente interagem com *SmHP1* (Smp_179650) (Figura 21). Nesta análise, podem-se destacar as proteínas histona H3 (Smp_150540, Smp_074610 e Smp_082240), metiltransferase (Smp_027300) e proteína putativa de ligação ao DNA da helicase do cromodomínio (A0A3Q0KIA2). De fato, essas interações são de suma importância para a regulação da transcrição e estão envolvidas em processos como metilação de histonas. Diante destes resultados decidimos que a IP-MS poderia ser importante para compor as análises e entendimento acerca do papel de *SmHP1*.

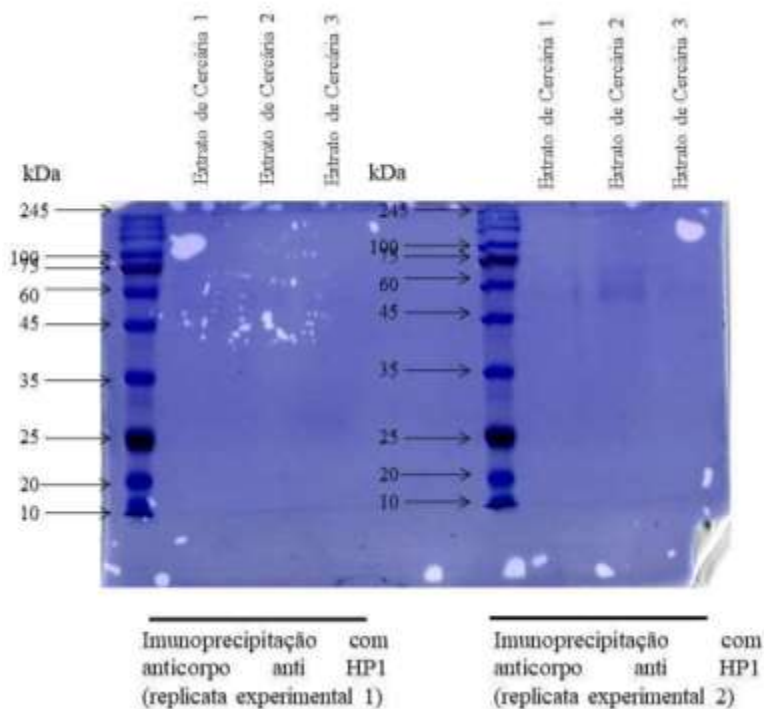
Figura 21 - Rede de interações proteína-proteína gerada a partir do banco de dados STRING. A rede possui 11 nós e cada nó representa uma proteína. As arestas representam interações proteína-proteína, não necessariamente físicas, mas são interações que contribuem conjuntamente para a função da proteína. Arestas azul claro são interações de bancos de dados selecionados, roxa foram determinadas experimentalmente, vermelha representa fusão genética, azul escuro significa co-ocorrência genética e preto são proteínas co-expressas.



Fonte: Organizado pela autora.

Em outros organismos a proteína HP1 é conhecida por manter estados silenciados da cromatina através de ligações às marcas epigenéticas H3K9me3 e H3K27me3 e visto que um silenciamento transcricional em cercárias, supomos que *SmHP1* interagisse com estas marcas. Para confirmar ou excluir essa hipótese, foi realizada a imunoprecipitação com extratos de cercárias (Figura 22) e foram cortados os fragmentos do gel SDS-PAGE entre 45 e 60 kDa, onde aparece uma banda fraca após a imunoprecipitação e, posteriormente seguido da digestão do gel para análise por espectrometria de massas.

Figura 22 - Gel de poliacrilamida SDS-page resultante da eletroforese com extratos de cercárias imunoprecipitados com anticorpo humano monoclonal anti-HP1, em triplicata técnica e duplicata experimental. As porções entre 45 e 60 kDa foram analisadas por espectrometria de massas.



Fonte: Organizado pela autora.

A espectrometria de massas resultou em 33 proteínas (Tabela 3) que provavelmente interagem com *SmHP1*. Na tabela 3 estão as proteínas que apareceram em pelo menos duas injeções, no entanto, é possível notar proteínas com *score* abaixo do esperado, por isso, somente as proteínas com *score* acima de 0,8 foram selecionadas (Tabela 4). Notamos que há possíveis interações com *SmHP1* relacionadas às funções canônicas já descritas para outros organismos como: quinases (A0A3Q0KEX1), fator de transcrição (A0A5K4EGG5), DNA polimerase (A0A5K4EL72), e metiltransferase (A0A3Q0KBN9). Estas proteínas podem ser vistas nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Proteínas encontradas em pelo menos 2 injeções (Total de 33 proteínas).

Uniprot	Score	Nome
A0A3Q0KBN9	0.7292	Methyltransferase type 11 domain-containing protein OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=4 SV=1
A0A3Q0KBN9	0.9193	Methyltransferase type 11 domain-containing protein OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=4 SV=1
A0A3Q0KBR6	0.7635	DEP domain-containing protein OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=4 SV=1
A0A3Q0KBR6	0.8932	DEP domain-containing protein OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=4 SV=1

A0A3Q0KEX1	0.9986	Serine/threonine kinase OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=4 SV=1
A0A3Q0KEX1	0.998	Serine/threonine kinase OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=4 SV=1
A0A3Q0KF45	0.9607	UDP-n-acetylglucosamine pyrophosphorylase OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=4 SV=1
A0A3Q0KF45	0.8606	UDP-n-acetylglucosamine pyrophosphorylase OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=4 SV=1
A0A3Q0KI58	0.9986	Putative cullin-2 (Cul-2) OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=3 SV=1
A0A3Q0KI58	0.9982	Putative cullin-2 (Cul-2) OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=3 SV=1
A0A3Q0KQ63	0.7971	Ciliary outer arm dynein beta heavy chain-related OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=3 SV=1
A0A3Q0KQ63	0.844	Ciliary outer arm dynein beta heavy chain-related OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=3 SV=1
A0A3Q0KSG9	0.7404	Integrator complex subunit 3 N-terminal domain-containing protein OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=3 SV=1
A0A3Q0KSG9	0.998	Integrator complex subunit 3 N-terminal domain-containing protein OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=3 SV=1
A0A3Q0KT98	0.6874	FSA_C domain-containing protein OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=4 SV=1
A0A3Q0KT98	0.9468	FSA_C domain-containing protein OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=4 SV=1
A0A5K4EGG5	0.744	Transcription initiation factor IIB OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=3 SV=1
A0A5K4EGG5	0.998	Transcription initiation factor IIB OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=3 SV=1
A0A5K4EL72	0.8177	DNA polymerase II subunit 2 OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=3 SV=1
A0A5K4EL72	0.9982	DNA polymerase II subunit 2 OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=3 SV=1
A0A5K4F0A5	0.6537	choline-phosphate cytidyltransferase OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=3 SV=1
A0A5K4F0A5	0.6582	choline-phosphate cytidyltransferase OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=3 SV=1
A0A5K4F239	0.787	Integrin OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=3 SV=1
A0A5K4F239	0.7178	Integrin OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=3 SV=1
A0A5K4F610	0.716	SERPIN domain-containing protein OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=3 SV=1
A0A5K4F610	0.998	SERPIN domain-containing protein OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=3 SV=1
G4V620	0.963	Putative proline-serine-threonine phosphatase interacting protein OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=3 SV=1
G4V620	0.9982	Putative proline-serine-threonine phosphatase interacting protein OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=3 SV=1
G4VC21	0.9982	PPM-type phosphatase domain-containing protein OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=3 SV=1
G4VC21	0.998	PPM-type phosphatase domain-containing protein OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=3 SV=1
G4VS90	0.8346	C2H2-type domain-containing protein OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=4 SV=1
G4VS90	0.6005	C2H2-type domain-containing protein OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=4

		SV=1
--	--	------

Fonte: Organizado pela autora.

Tabela 4 - Proteínas filtradas com score acima de 0.8 (Total de 20 proteínas).

Uniprot	Score	Nome
A0A3Q0KBN9	0.9193	Methyltransferase type 11 domain-containing protein OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=4 SV=1
A0A3Q0KBR6	0.8932	DEP domain-containing protein OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=4 SV=1
A0A3Q0KEX1	0.9986	Serine/threonine kinase OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=4 SV=1
A0A3Q0KEX1	0.998	Serine/threonine kinase OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=4 SV=1
A0A3Q0KF45	0.9607	UDP-n-acetylglucosamine pyrophosphorylase OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=4 SV=1
A0A3Q0KF45	0.8606	UDP-n-acetylglucosamine pyrophosphorylase OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=4 SV=1
A0A3Q0KI58	0.9986	Putative cullin-2 (Cul-2) OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=3 SV=1
A0A3Q0KI58	0.9982	Putative cullin-2 (Cul-2) OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=3 SV=1
A0A3Q0KQ63	0.844	Ciliary outer arm dynein beta heavy chain-related OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=3 SV=1
A0A3Q0KSG9	0.998	Integrator complex subunit 3 N-terminal domain-containing protein OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=3 SV=1
A0A3Q0KT98	0.9468	FSA_C domain-containing protein OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=4 SV=1
A0A5K4EGG5	0.998	Transcription initiation factor IIB OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=3 SV=1
A0A5K4EL72	0.8177	DNA polymerase II subunit 2 OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=3 SV=1
A0A5K4EL72	0.9982	DNA polymerase II subunit 2 OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=3 SV=1
A0A5K4F610	0.998	SERPIN domain-containing protein OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=3 SV=1
G4V620	0.963	Putative proline-serine-threonine phosphatase interacting protein OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=3 SV=1
G4V620	0.9982	Putative proline-serine-threonine phosphatase interacting protein OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=3 SV=1
G4VC21	0.9982	PPM-type phosphatase domain-containing protein OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=3 SV=1
G4VC21	0.998	PPM-type phosphatase domain-containing protein OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=3 SV=1
G4VS90	0.8346	C2H2-type domain-containing protein OS=Schistosoma mansoni OX=6183 PE=4 SV=1

Fonte: Organizado pela autora.

Proteínas importantes foram encontradas após a imunoprecipitação de *SmHP1* de extratos de cercárias (Tabela 5), como A0A3Q0KBN9 (metiltransferase), A0A3Q0KBR6 (regulação

transcricional), A0A3Q0KEX1 (fosforilação), A0A3Q0KSG9 (reparo de DNA), polimerase II (ligação de DNA) e G4VS90 (regulação da transcrição). Particularmente interessante, a proteína A0A3Q0KBR6 está descrita como remodeladora da cromatina, trazendo *insights* importantes a despeito da função de *SmHP1*. O fato de termos encontrado proteína metiltransferase co-imunoprecipitada com *SmHP1* corrobora com a hipótese de ligação de *SmHP1* com metiltransferases para remodelação da cromatina com o objetivo de suprimir a transcrição. Os resultados obtidos são de fato, parte essencial para a compreensão da importância e magnitude de *SmHP1*, portanto, IP-MS nos trouxe o questionamento se esta proteína interage fisicamente com as marcas epigenéticas H3K9me3 e H3K27me3. Assim, para aceitar ou refutar esta hipótese realizamos western blot para estas marcas.

Tabela 5 - Funções das proteínas encontradas por IP-MS

Código Proteína	Proteína Imunoprecipitada	Função	Referência
A0A3Q0KBN9	Proteína contendo domínio metiltransf_11	Metilação	Copeland, 2018
A0A3Q0KBR6	Proteína contendo domínio ARID	Regulação transcricional, controle do ciclo celular e remodelação da cromatina	Korn e Schlundt, 2022
A0A3Q0KEX1	proteína quinase serina/treonina não específica	Ligação de ATP, fosforilação, regulação do processamento de mRNA	Manning e Hunter, 2010
A0A3Q0KF45	UDP-N-acetilglucosamina difosforilase	Atividade da UDP-N-acetilglucosamina difosforilase	Hultsch, Reutter e Decker, 1972
A0A3Q0KI58	Cullin-2 putativo (Cul-2)	Ubiquitinação de proteínas	Cai e Yang, 2016
A0A3Q0KQ63	Braço externo ciliar relacionado à cadeia pesada beta da dineína	Ligação de ATP, hidrólise de ATP	Inaba, 2019
A0A3Q0KSG9	Proteína contendo domínio Ints3_N	Reparo de DNA	Li et al., 2021
A0A3Q0KT98	Proteína contendo domínio FSA_C	Não encontrada	
A0A5K4EGG5	Fator de iniciação da transcrição IIB	Atividade do fator de iniciação da transcrição geral da RNA polimerase II	Ha, Lane e Reinberg, 1991
A0A5K4EL72	Subunidade 2 da DNA polimerase II	Ligação de DNA	Wang e Yang, 2009
A0A5K4F610	Proteína contendo domínio SERPIN	Inibidores de serina protease	S. Filleur et al., 2009
G4V620	Proteína putativa que interage com a prolina-serina-treonina fosfatase	Não encontrada	

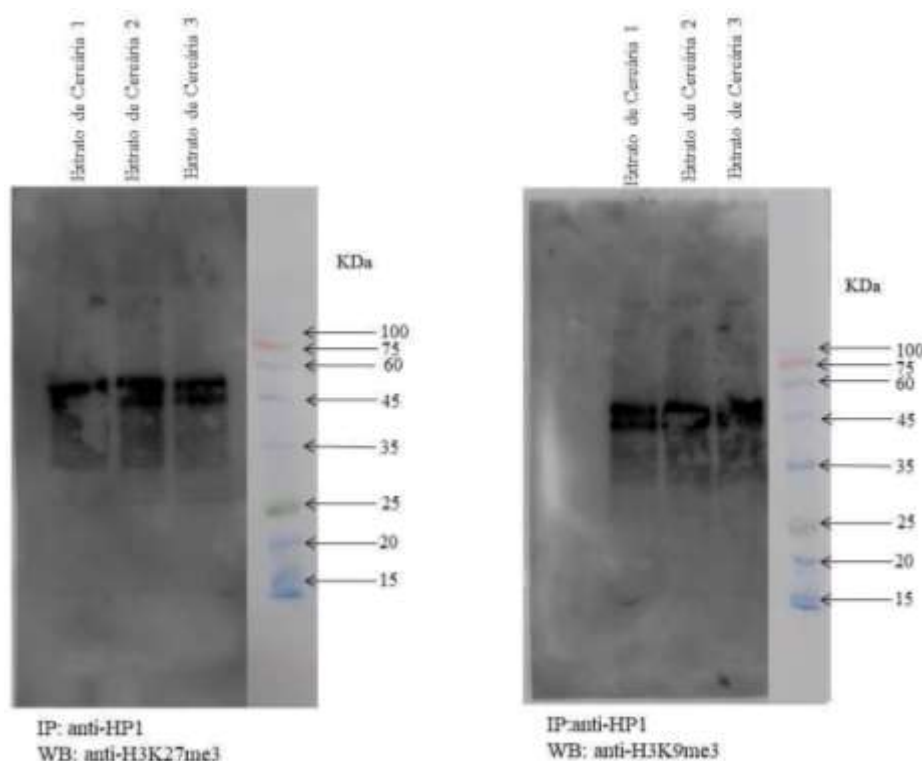
G4VC21	Proteína contendo domínio de fosfatase do tipo PPM	Atividades de serina/treonina fosfatase	Wilkes e Doerig, 2008
G4VS90	Proteína de dedo de zinco	Regulação da transcrição	Tan et al., 2003

Fonte: Organizado pela autora.

7.10. *SmHP1* parece interagir inespecificamente com H3K9me3 e H3K27me3

Para a comparação dos resultados de espectrometria e para o estabelecimento da correlação das modificações pós-traducionais de histonas com as bandas entre 45 e 60 kDa o mesmo imunoprecipitado foi transferido para membrana de PVDF e submetido ao western blot utilizando como anticorpo primário os anticorpos anti-H3K9me3 e anti-H3K27me3 (Figura 23). Em ambas as incubações, foram visualizadas marcações entre 45 e 60 kDa.

Figura 23 - *Western Blot* da imunoprecipitação. As réplicas dos géis foram transferidas para membrana de PVDF, incubados com anticorpo anti H3K9me3 e H3K27me3 e apresentaram uma banda de 45 kDa.



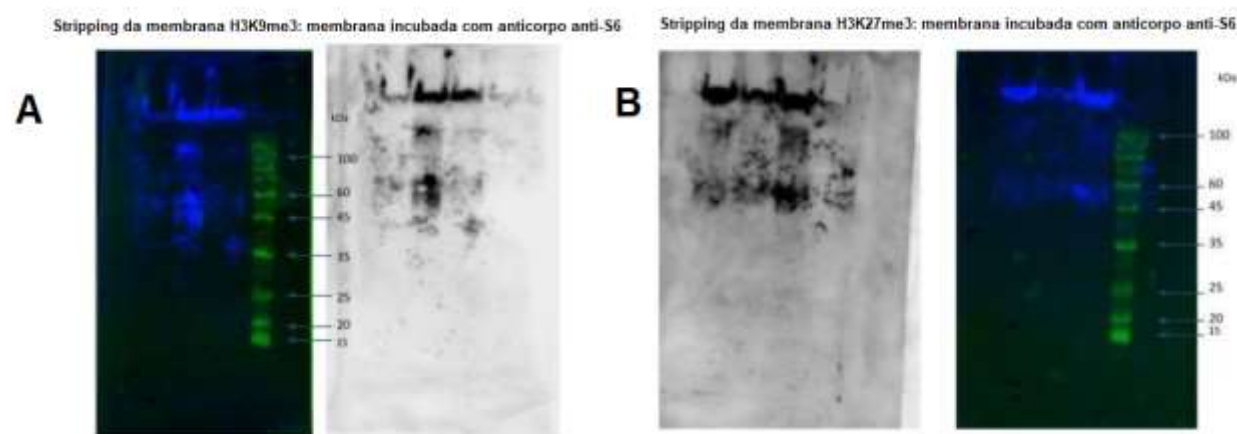
Fonte: Organizado pela autora.

Os resultados do *western blot*, sugerem que há uma interação entre as modificações pós-

traducionais de histonas e *SmHP1*. Para realizar uma prova de conceito no sentido de provar se essas interações de fato são específicas e não um artefato da interação antígeno-anticorpo, escolhemos um anticorpo não-relacionado à cromatina e às modificações pós-traducionais de histonas. Portanto, para isso foi realizado o *stripping* das membranas de *western blot*, que foram usadas anteriormente e, então, foi seguida de incubação com anticorpo primário S6 (Proteína Ribossomal - 32kDa), não relacionado à cromatina (Figura 24).

O resultado da Figura 24 mostrou que, após o *stripping* das membranas e incubação com o anticorpo primário anti-S6, as marcas visualizadas anteriormente foram removidas, mostrando que a incubação com o anticorpo não relacionado à cromatina não resultou em novas marcações com os imunoprecipitados de *SmHP1* de cercarias. Entretanto, ainda é possível notar algumas marcações nas membranas, que podem ser devido ao protocolo de *stripping* não ter sido totalmente eficiente ou a ligações inespecíficas do anticorpo.

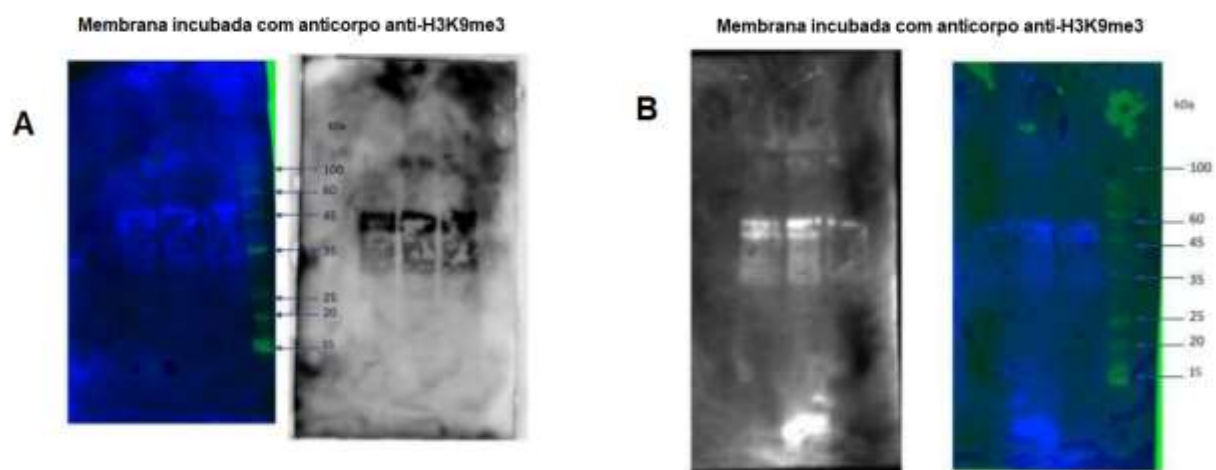
Figura 24 - Resultado do *stripping* das membranas incubadas anteriormente com (A) H3K9me3 e (B) H3K27me3 seguida de incubação com o anticorpo primário anti-S6.



Fonte: Organizado pela autora.

Em seguida, o anticorpo anti-S6 foi retirado por um novo *stripping* e as membranas foram incubadas novamente com os anticorpos anti-H3K9me3 e anti-H3K27me3 (Figura 25). A Figura 25, mostrou que o anticorpo reconhece novamente a banda de 45 kDa. Embora, provavelmente, haja interações entre *SmHP1* e complexos de histonas, não é possível afirmar quais interações ocorreram, pois não foi possível demonstrar com as metodologias empregadas que estas ligações são específicas.

Figura 25 - Membranas incubadas com os anticorpos primários (A) anti-H3K9me3 e (B) H3K27me3 após o segundo *stripping* para retirada do anticorpo anti-S6.



Fonte: Organizado pela autora.

8. DISCUSSÃO

A qualidade dos conjuntos de dados ChIP-seq pode variar quanto a qualidade, assim, é imprescindível o controle de qualidade, além de verificar quais fatores podem contribuir para a variação dos resultados no ChIP-seq (Keller et al., 2021). Verificar a especificidade e a qualidade do anticorpo é essencial para a continuidade do experimento. Nesta etapa, o anticorpo ab109028 demonstrou ser adequado para ChIP-seq. Em estudo anterior, Trindade et al., (2021) demonstraram o uso deste anticorpo para análises de western blot para amostras de *S. mansoni* (Trindade et al., 2021). Da mesma forma, a qualidade das sequências sequenciadas foi excelente e correspondeu aos padrões de qualidade esperados para o prosseguimento das análises. Em esporocistos, foram identificadas sequências do hospedeiro *B. glabrata* devido ao método de extração, entretanto, sem interferir na qualidade das sequências exclusivas.

Surpreendentemente dados do ChIP-seq mostraram uma distribuição não canônica de *SmHP1* para *S. mansoni*. A escolha de *Drosophila* como controle positivo se deve ao fato dos estudos já serem bem estabelecidos e suas funções bem definidas. Assim, nossos dados mostraram que o perfil metagênico de HP1 em *Drosophila* segue um padrão canônico com distribuição dos genes em torno do TSS, enquanto para *S. mansoni* o perfil metagênico está em torno do TES. O perfil canônico encontrado em *Drosophila* neste estudo com o anticorpo ab109028 corrobora com os resultados obtidos em estudo anterior com o anticorpo C1A9 (Zenk et al., 2021). Ambos os estudos encontraram os mesmos perfis metagênicos para *Drosophila* excluindo a possibilidade do anticorpo ab109028 não ter especificidade suficiente para a técnica de ChIP-seq. Tanto em *Drosophila* quanto em mamíferos a marca epigenética H3K9me3 está localizada em torno do TSS e coincide com o perfil metagênico de HP1 (Zenk et al., 2021; Burton et al., 2020).

É de conhecimento que as interações entre modificações pós-traducionais de histonas e co-reguladores transcricionais são moldados por interações regulatórias entre PTMs (Kumar; Wang; Barnes, 2004). Os complexos de remodelação da cromatina são influenciados pelo código de histonas, pois este cria sítios específicos de reconhecimento a motivos em proteínas modificadoras de cromatina, assim a sinalização de proteínas histonas e não histonas são dependentes de enzimas de adição e remoção de PTMs (Kumar; Wang; Barnes, 2004). Neste contexto, partindo do princípio de que a proteína HP1 é um co-regulador transcricional e exerce sua função mediante recrutamento de co-ativadores e co-repressores transcricionais, faz sentido que as proteínas de ligação a *SmHP1* atuem nestes processos. Assim, as proteínas co-

imunoprecipitadas com *SmHP1* como metiltransferase, reguladores da transcrição e processamento de mRNA, além de remodeladores de cromatina corroboram com a hipótese de que esta proteína atue como co-reguladora transcricional em *S. mansoni*. Dados de trabalho anterior de IP-MS para *S. mansoni* utilizando o anticorpo Ab109028 (Trindade et al., 2021) mostrou resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho. No estudo anterior, Trindade e colaboradores (2021) mostraram possíveis interatores para *SmHP1* como proteína dedo de zinco (A0A3Q0KR71), histona lisina metiltransferase com domínio SETB1 (A0A3Q0KPQ6), fator de transcrição de ligação ao CCAAT (A0A3Q0KTK8) e helicase que está relacionada a remodelação da cromatina dependente de ATP. As enzimas metiltransferases são importantes, pois direcionam a metilação na histona H3 e já foi descrito como fundamentais para o recrutamento de HP1 (Schotta et al., 2004). Embora estas enzimas já tenham sido descritas em *S. mansoni* e nossos resultados de IP-MS sugeriram que *SmHP1* participe de processos relacionados a metilação de histonas e controle transcricional, no entanto, não há evidências que suportem a participação de *SmHP1* na supressão da transcrição em cercárias.

A conservação dos domínios de HP1 entre os organismos é um forte indício de conservação da função e, apesar de *SmHP1* ser conservada e possuir similaridade com outras proteínas HP1, é fatídico que em *S. mansoni* esta proteína exerce funções diferentes. Em outros parasitas como *Plasmodium*, PfHP1 se liga a H3K9me3 e está relacionada à heterocromatina, além de ser encontrada em todos os cromossomos deste parasita (Fluek et al., 2009). Em *S. mansoni* *SmHP1* pode ser encontrada em quase todo genoma exibindo alguns genes diferencialmente expressos nos estágios estudados. Além de HP1 se ligar a H3K9me3 em muitos organismos, esta proteína também se liga à marca epigenética H3K27me3 para produzir efeitos repressores na transcrição gênica. Assim, o estudo de *SmHP1* foi baseado na teoria de que *SmHP1* tivesse participação no silenciamento da transcrição em cercárias e, para efeitos de conservação evolutiva da função da proteína, sugerimos que *SmHP1* tivesse o mesmo mecanismo de ação já estudada em outros organismos.

Os dados obtidos por Zenk et al (2021) mostram que HP1 de *Drosophila* se liga a H3K9me3 e participa de processos regulatórios através da modificação da cromatina para inativar a transcrição gênica. No entanto, nossos dados para esporocistos e cercárias mostraram o oposto, *SmHP1* não se liga a H3K9me3. Roquis et al (2015) demonstrou que tanto a metilação de H3K27 e H3K9 ocorre a montante do TSS, entretanto, os autores discutem que alterações

específicas de H3 são evolutivamente conservadas e de fato, estão presentes em *S. mansoni*. O perfil não canônico de *SmHP1* pode ter explicação nas marcas bivalentes em *S. mansoni*. Roquis et al (2018) mostraram que marcas bivalentes são encontradas em cercárias com o objetivo de paralisar a transcrição e quando há remoção de H3K27me3, a transcrição é ativada. Neste estágio a marca bivalente H3K4me3-H3K27me3 possui certa especificidade em TSS, então, a presença da bivalência pode ser estímulo suficiente para manter o estado inativo em cercárias sem a necessidade de *SmHP1* se ligar a H3K9me3. Brasher (2000) suporta a teoria de que na ausência de H3K9me3 o domínio CSD seja responsável pelo direcionamento contínuo de HP1 à heterocromatina (Brasher, 2000).

Nossos resultados de western blot de imunoprecipitados de extratos de cercárias mostram marcações entre 45 e 60 kDa para as marcas H3K9me3 e H3K27me3. Mesmo considerando o *stripping* das membranas como indicador de possíveis interações, não podemos afirmar, baseado neste resultado, que *SmHP1* se liga a estas marcas. Baseando a pesquisa nos resultados de ChIP-seq, podemos dizer que os resultados obtidos pelo western blot são ligações inespecíficas.

Diferenças interessantes em cercárias foram vistas no cromossomo Z com picos de enriquecimento para *SmHP1*. Picard et al (2019) mostraram que durante o ciclo de vida de *S. mansoni* há uma superexpressão robusta neste cromossomo com mudanças na compensação de dose em parasitas fêmeas, alternando de global para compensação parcial após a penetração do hospedeiro e o início da diferenciação sexual (Picard et al., 2019). Nossos dados do estudo *in vivo* trazem *insights* interessantes a respeito da oviposição em esquistossômulos *knockdown*. As fezes de camundongos infectados com esquistossômulos de 3 dias *knockdown* para *SmHP1* apresentaram duas vezes mais ovos quando comparados aos controles. Esse resultado difere do resultado encontrado por Geyer et al (2018). Neste estudo, os autores silenciaram *SmHP1* em vermes adultos fêmeas e analisaram a taxa de oposição *in vitro*, concluindo que o silenciamento de *SmHP1* diminuiu a taxa de oviposição (Geyer et al., 2018). Os resultados divergentes podem ser devido aos métodos utilizados. Todavia, os dois estudos sugerem que *SmHP1* tem participação na oviposição e na diferenciação sexual. As cargas parasitárias se mostraram altas, no entanto, as quantidades de ovos estavam baixas, assim, é possível que os ovos tenham permanecido retidos no fígado e intestino, provocando a reação inflamatória. Os granulomas não apresentaram diferenças de tamanhos e não vimos uma relação direta com a gravidade da doença nos animais.

A eficiência de silenciamento de *SmHP1* foi de 26%, um pouco abaixo de resultados encontrados em outros estudos com RNAi para *S. mansoni* (Mourão et al., 2009; Stefanic et al., 2010). Nosso estudo não se concentrou em análises fenotípicas para investigar diferenças morfológicas nos parasitas, nosso foco foi determinar se *SmHP1* tinha algum papel na infectividade e progressão da doença. Assim, o estudo *in vivo* demonstrou um papel interessante para *SmHP1* capaz de influenciar na oviposição, mas não foi capaz de alterar ou impedir a evolução do parasita. Dados do nosso grupo mostraram um aumento da expressão dos genes que codificam enzimas modificadoras de histonas em esquistossômulos de 3 dias (Galdini-Costa, 2024 não publicado), corroborando com a mudança da expressão gênica no parasita e suportando o controle epigenético de *S. mansoni*. Essas enzimas são importantes durante o ciclo de vida deste parasita e estão diretamente relacionadas ao recrutamento de HP1 em outros organismos, assim, o silenciamento de *SmHP1* poderia, em tese, interferir no desenvolvimento do parasita durante o ciclo no hospedeiro vertebrado. No entanto, os resultados encontrados sugerem que *SmHP1* não possui função vital para progressão do ciclo de vida em *S. mansoni*.

9. CONCLUSÃO

- O presente estudo demonstrou que *SmHP1* pode atuar como um co-regulador da expressão gênica em *S. mansoni*. Além disso, é necessário enfatizar que *SmHP1* parece possuir um papel no desenvolvimento do parasita e estabelecimento da doença, sem impedir, no entanto, a evolução do ciclo dentro do hospedeiro vertebrado.
- O silenciamento de *SmHP1* está relacionado a um aumento da taxa de oviposição, além de dados de ChIP-seq apresentarem forte enriquecimento no cromossomo Z em cercarias.
- *SmHP1* segue uma distribuição totalmente inesperada e diferente de outros organismos. O enriquecimento de *SmHP1* para os estágios de cercaria e esporocisto ocorre em torno do TES, enquanto a distribuição das marcas epigenéticas H3K9me3 e H3K27me3 ocorre em torno do TSS.
- Apesar de *SmHP1* não se ligar às marcas epigenéticas H3K9me3 e H3K27me3, *SmHP1* parece atuar como co-regulador transcricional em *S. mansoni* devido as interações vistas por espectrometria de massas que corrobora para a participação no processo de remodelação da cromatina.
- O domínio CDS pode ser responsável por direcionar *SmHP1* à heterocromatina na ausência de ligação a H3K9me3, possibilitando a esta proteína se ligar a outras proteínas reguladoras.
- *SmHP1* parece não ter participação no estado transcionalmente silenciado em cercarias, apesar de interagir com enzimas modificadoras de histonas neste estágio.
- O padrão de distribuição não canônico encontrado para *SmHP1* é um indicativo de que esta proteína pode ser um excelente alvo de estudos epigenéticos, no entanto, é necessário que mais estudos sejam realizados a fim de investigar essas diferenças apresentadas e elucidar o papel de *SmHP1* em *S. mansoni*.

REFERÊNCIAS

AAGAARD, Louise et al. Functional mammalian homologues of the Drosophila PEV-modifier Su (var) 3-9 encode centromere-associated proteins which complex with the heterochromatin component M31. **The EMBO journal**, 1999. Disponível em: <https://www.embopress.org/doi/full/10.1093/emboj/18.7.1923> Acesso em: 15 abr. 2024.

ACHENBACH, Tatjana; BRUNNER, Bodo; HEERMEIER, Kathrin. Oligonucleotide-based knockdown technologies: antisense versus RNA interference. **Chembiochem**, v. 4, n. 10, p. 928-935, 2003. Disponível em: <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cbic.200300708> Acesso em: 15 abr. 2024.

AGIRREZABALA, Xabier; FRANK, Joachim. From DNA to proteins via the ribosome: structural insights into the workings of the translation machinery. **Human genomics**, v. 4, p. 1-12, 2010. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/1479-7364-4-4-226> Acesso em: 15 abr. 2024.

AGREDO, Alejandra; KASINSKI, Andrea L. Histone 4 lysine 20 tri-methylation: a key epigenetic regulator in chromatin structure and disease. **Frontiers in Genetics**, v. 14, p. 1243395, 2023. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/genetics/articles/10.3389/fgene.2023.1243395/full> Acesso em: 15 abr. 2024.

AL ABOUD, Nora; TUPPER, Connor; JIALAL, Ishwarlal. Genetics, epigenetic mechanism. 2018. Disponível em: <https://europepmc.org/article/nbk/nbk532999> Acesso em: 15 abr. 2024.

ANDRÉS, Marta et al. Histone H1 post-translational modifications: update and future perspectives. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 16, p. 5941, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21165941> Acesso em: 15 abr. 2024.

APTE, M. S. & MELLER, V. H. Sex differences in Drosophila melanogaster heterochromatin are regulated by non-sex specific factors. **PLoS One** **10**, (2015). [Google Scholar](#)

AZZI, A.; COSSEAU, Celine; GRUNAU, Christoph. *Schistosoma mansoni*: developmental arrest of miracidia treated with histone deacetylase inhibitors. **Experimental parasitology**, v. 121, n. 3, p. 288-291, 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489408002968> Acesso em: 15 abr. 2024.

BASCH, P. F. Cultivation of *Schistosoma Mansoni* In Vitro. I. Establishment of Cultures from Cercariae and Development until Pairing. Source: The Journal of Parasitology vol. **67** <https://about.jstor.org/terms> (1981). [Google Scholar](#)

BANERJEE, Taraswi; CHAKRAVARTI, Debabrata. A peek into the complex realm of histone phosphorylation. **Molecular and cellular biology**, v. 31, n. 24, p. 4858-4873, 2011. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1128/MCB.05631-11> Acesso em: 15 abr. 2024.

BASCH, Paul. Cultivation of *Schistosoma mansoni* in vitro. II. Production of infertile eggs by worm pairs cultured from cercariae. **The Journal of parasitology**, p. 186-190, 1981. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/3280633> Acesso em: 15 abr. 2024.

BERGER, Shelley. The complex language of chromatin regulation during transcription. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 407-412, 2007. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature05915> Acesso em: 15 abr. 2024.

BERNSTEIN, Bradley. et al. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. **Cell**, v. 125, n. 2, p. 315-326, 2006. Disponível em: [https://www.cell.com/fulltext/S0092-8674\(06\)00380-1](https://www.cell.com/fulltext/S0092-8674(06)00380-1) Acesso em: 15 abr. 2024.

BLACK, Joshua; VAN RECHEM, Capucine; WHETSTINE, Johnathan R. Histone lysine methylation dynamics: establishment, regulation, and biological impact. **Molecular cell**, v. 48, n. 4, p. 491-507, 2012. Disponível em: [https://www.cell.com/molecular-cell/fulltext/S1097-2765\(12\)00937-9](https://www.cell.com/molecular-cell/fulltext/S1097-2765(12)00937-9) Acesso em: 15 abr. 2024.

Boletim Epidemiológico 43. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Volume 53 | Nov. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2022/boletim-epidemiologico-vol-53-no43/view>. Acesso em: 15 jul. 2023.

BOSCH-PRESEGUE, Laia et al. Mammalian HP1 isoforms have specific roles in heterochromatin structure and organization. **Cell reports**, v. 21, n. 8, p. 2048-2057, 2017. Disponível em: [https://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S2211-1247\(17\)31572-3?platform=hootsuite](https://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S2211-1247(17)31572-3?platform=hootsuite) Acesso em: 15 abr. 2024.

BRANCUCCI, Nicolas MB et al. Heterochromatin protein 1 secures survival and transmission of malaria parasites. **Cell host & microbe**, v. 16, n. 2, p. 165-176, 2014. Disponível

em: [https://www.cell.com/cell-host-microbe/fulltext/S1931-3128\(14\)00258-3](https://www.cell.com/cell-host-microbe/fulltext/S1931-3128(14)00258-3) Acesso em: 15 abr. 2024.

BRASHER, Sally. et al. The structure of mouse HP1 suggests a unique mode of single peptide recognition by the shadow chromo domain dimer. **The EMBO journal**, 2000. Disponível em: <https://www.embopress.org/doi/full/10.1093/emboj/19.7.1587> Acesso em: 15 abr. 2024.

BROWER-TOLAND, Brent et al. Multiple SET methyltransferases are required to maintain normal heterochromatin domains in the genome of *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 181, n. 4, p. 1303-1319, 2009. Disponível em: <https://academic.oup.com/genetics/article/181/4/1303/6081331?login=false> Acesso em: 15 abr. 2024.

BUI, Hai et al. Investigation of heterochromatin protein 1 function in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* using a conditional domain deletion and swapping approach. **Msphere**, v. 6, n. 1, p. 10.1128/msphere.01220-20, 2021. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/msphere.01220-20> Acesso em: 15 abr. 2024.

BURTON, Adam et al. Heterochromatin establishment during early mammalian development is regulated by pericentromeric RNA and characterized by non-repressive H3K9me3. **Nature cell biology**, v. 22, n. 7, p. 767-778, 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41556-020-0536-6> Acesso em: 15 abr. 2024.

CAI, W., YANG, H. The structure and regulation of Cullin 2 based E3 ubiquitin ligases and their biological functions. **Cell Div** 11, 7 (2016). Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13008-016-0020-7>

CAMPOS, Eric; REINBERG, Danny. Histones: annotating chromatin. **Annual review of genetics**, v. 43, n. 1, p. 559-599, 2009. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev.genet.032608.103928> Acesso em: 15 abr. 2024.

CANDIDO, Raíssa Gabrieli. **Avaliação dos efeitos do meio condicionado de monócitos sobre a atividade de células tumorais in vitro**. 2021. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/25/25149/tde-09122021-101930/en.php> Acesso em: 15 abr. 2024.

CAPKOVA FRYDRYCHOVA, R., BIESSMANN, H. & MASON, J. M. Regulation of telomere length in *Drosophila*. *Cytogenetic and Genome Research* vol. 122 356–364 Preprint at doi:10.1159/000167823 (2009). [CrossRefGoogle Scholar](#)

CARVALHO, Omar dos Santos; COELHO, Paulo Marcos; LENZI, Henrique Leonel. **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2008. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=pt->

[BR&lr=&id=q4q9BgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA3&dq=Carvalho,+O.S.,+Coelho,+PMZ,+Lenzi,+HL.+Schistosoma+mansoni+e+esquistossomose:+uma+vis%C3%A3o+multidisciplinar&ots=tehmMffqz3U&sig=ftFZhqKFIKhbKls3C55PLCdLsBM#v=onepage&q=Carvalho%2C%20O.S.%2C%20Coelho%2C%20PMZ%2C%20Lenzi%2C%20HL.%20Schistosoma%20mansoni%20e%20esquistossomose%3A%20uma%20vis%C3%A3o%20multidisciplinar&f=false](https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=q4q9BgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA3&dq=Carvalho,+O.S.,+Coelho,+PMZ,+Lenzi,+HL.+Schistosoma+mansoni+e+esquistossomose:+uma+vis%C3%A3o+multidisciplinar&ots=tehmMffqz3U&sig=ftFZhqKFIKhbKls3C55PLCdLsBM#v=onepage&q=Carvalho%2C%20O.S.%2C%20Coelho%2C%20PMZ%2C%20Lenzi%2C%20HL.%20Schistosoma%20mansoni%20e%20esquistossomose%3A%20uma%20vis%C3%A3o%20multidisciplinar&f=false). Acesso em: 15 jul. 2023.

CHAGIN, Vadim; STEAR, Jeffrey; CARDOSO, Cristina. Organization of DNA replication. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 4, p. a000737, 2010. Disponível em: <https://cshperspectives.cshlp.org/content/2/4/a000737.short> Acesso em: 15 abr. 2024.

CHOI, Jennifer; HOWE, LeAnn. Histone acetylation: truth of consequences?. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 87, n. 1, p. 139-150, 2009. Disponível em: <https://cdnsiencepub.com/doi/abs/10.1139/O08-112> Acesso em: 15 abr. 2024.

CLAYTON, Christine; SHAPIRA, Michal. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 156, n. 2, p. 93-101, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166685107002101> Acesso em: 15 abr. 2024.

COELHO, Paulo Marcos et al. Evolução de *Schistosoma mansoni* no hospedeiro intermediário. In: CARVALHO, Omar dos Santos; COELHO, Paulo Marcos; LENZI, Henrique Leonel. **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2008, p. 147-160. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=q4q9BgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA3&dq=Carvalho,+O.S.,+Coelho,+PMZ,+Lenzi,+HL.+Schistosoma+mansoni+e+esquistossomose:+uma+vis%C3%A3o+multidisciplinar&ots=tehmMffqz3U&sig=ftFZhqKFIKhbKls3C55PLCdLsBM#v=onepage&q=Carvalho%2C%20O.S.%2C%20Coelho%2C%20PMZ%2C%20Lenzi%2C%20HL.%20Schistosoma%20mansoni%20e%20esquistossomose%3A%20uma%20vis%C3%A3o%20multidisciplinar&f=false>. Acesso em: 15 jul. 2023.

COELHO FS, et al. *Schistosoma mansoni* coactivator associated arginine methyltransferase 1 (SmCARM1) effect on parasite reproduction. **Front Microbiol**. 2023 Feb 24;14:1079855. doi: 10.3389/fmicb.2023.1079855. Erratum in: *Front Microbiol*. 2023 Mar 29;14:1190341. doi: 10.3389/fmicb.2023.1190341. PMID: 36910171; PMCID: PMC9998485. Disponível: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9998485/>

COPELAND RA. Protein methyltransferase inhibitors as precision cancer therapeutics: a decade of discovery. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**. 2018 Jun 5;373(1748):20170080. doi: 10.1098/rstb.2017.0080. PMID: 29685962; PMCID: PMC5915721. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5915721/>

CORTÉS, Alfred; DEITSCH, Kirk. Malaria epigenetics. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 7, p. a025528, 2017. Disponível em: <https://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/7/7/a025528.short> Acesso em: 15 abr. 2024.

COSSEAU, Céline et al. (Epi) genetic inheritance in *Schistosoma mansoni*: a systems approach. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 4, p. 285-294, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.12.002>. Acesso em: 15 jul. 2023.

COSSEAU, Céline; GRUNAU, Christoph. Native chromatin immunoprecipitation. **Epigenetics Protocols**, p. 195-212, 2011. Disponível em: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-61779-316-5_15 Acesso em: 15 abr. 2024.

COSTAIN, Alice; MACDONALD, Andrew S.; SMITS, Hermelijn H. Schistosome egg migration: mechanisms, pathogenesis and host immune responses. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 3042, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30619372/>. Acesso em: 15 jul. 2023.

CRAMER, Patrick. Organization and regulation of gene transcription. **Nature**, v. 573, n. 7772, p. 45-54, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1517-4>. Acesso em: 15 abr. 2024.

CUI, Liwang et al. Histone lysine methyltransferases and demethylases in *Plasmodium falciparum*. **International journal for parasitology**, v. 38, n. 10, p. 1083-1097, 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751908000210> Acesso em: 15 abr. 2024.

CUTTER, Amber; HAYES, Jeffrey. A brief review of nucleosome structure. **FEBS letters**, v. 589, n. 20, p. 2914-2922, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579315003920> Acesso em: 15 abr. 2024.

DA TRINDADE, Natália Silva et al. *Schistosoma mansoni* Heterochromatin Protein 1 (HP1) nuclear interactome in cercariae. **Journal of Proteomics**, v. 239, p. 104170, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391921000695> Acesso em: 15 abr. 2024.

DEWALICK, Saskia; TIELENS, Aloysius; VAN HELLEMOND, Jaap. *Schistosoma mansoni*: the egg, biosynthesis of the shell and interaction with the host. **Experimental parasitology**, v. 132, n. 1, p. 7-13, 2012. Disponível em: 10.1016/j.exppara.2011.07.018. Acesso em: 15 jul. 2023.

DIALYNAS, G. K., VITALINI, M. W. & WALLRATH, L. L. Linking Heterochromatin Protein 1 (HP1) to cancer progression. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* vol. **647** 13–20 Preprint at doi:10.1016/j.mrfmmm.2008.09.007 (2008).

[CrossRefPubMedWeb of ScienceGoogle Scholar](#)

DÍAZ, Adriana; WALKER, Martin; WEBSTER, Joanne. Reaching the World Health Organization elimination targets for schistosomiasis: the importance of a One Health perspective. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 378, n. 1887, p. 20220274, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rstb.2022.0274>. Acesso em: 15 jul. 2023.

DILLON, Gary et al. Microarray analysis identifies genes preferentially expressed in the lung schistosomulum of *Schistosoma mansoni*. **International journal for parasitology**, v. 36, n. 1, p. 1-8, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16359678/>. Acesso em: 15 jul. 2023.

DIXON, Stacy. et al. A decade of epigenetic research in *Toxoplasma gondii*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 173, n. 1, p. 1-9, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016668511000109X>. Acesso em: 15 abr. 2024.

DODD, Ian B. et al. Theoretical analysis of epigenetic cell memory by nucleosome modification. **Cell**, v. 129, n. 4, p. 813-822, 2007. Disponível em: [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(07\)00458-8](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(07)00458-8). Acesso em: 15 abr. 2024.

DUNCAN, Elizabeth; GLUCKMAN, Peter; DEARDEN, Peter. Epigenetics, plasticity, and evolution: How do we link epigenetic change to phenotype?. **Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution**, v. 322, n. 4, p. 208-220, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jez.b.22571>. Acesso em: 15 jul. 2023.

EGESA, Moses et al. Rethinking schistosomiasis vaccine development: synthetic vesicles. **Trends in parasitology**, v. 33, n. 12, p. 918-921, 2017. Disponível em: [https://www.cell.com/trends/parasitology/abstract/S1471-4922\(17\)30187-3](https://www.cell.com/trends/parasitology/abstract/S1471-4922(17)30187-3). Acesso em: 15 abr. 2024.

EXNER, V. et al. The chromodomain of like heterochromatin protein 1 is essential for H3K27me3 binding and function during arabidopsis development. **PLoS One** **4**, (2009).

[Google Scholar](#)

EISSENBERG, Joel C.; ELGIN, Sarah CR. The HP1 protein family: getting a grip on chromatin. **Current opinion in genetics & development**, v. 10, n. 2, p. 204-210, 2000. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959437X00000587>. Acesso em: 15 abr. 2024.

EWING, Rob. et al. Large-scale mapping of human protein–protein interactions by mass spectrometry. **Molecular systems biology**, v. 3, n. 1, p. 89, 2007. Disponível em: 10.1038/msb4100134. Acesso em: 15 jul. 2023.

FANTAPPÍE, Marcelo Rosado et al. Control of transcription in *Schistosoma mansoni*: Chromatin remodeling and other regulatory elements. **Acta tropica**, v. 108, n. 2-3, p. 186-193, 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X07002884>. Acesso em: 15 abr. 2024.

FANTAPPIÉ, Marcelo Rosado et al. Lack of DNA methylation in *Schistosoma mansoni*. **Experimental parasitology**, v. 98, n. 3, p. 162-166, 2001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489401946302> Acesso em: 15 abr. 2024.

FILLEUR S, NELIUS T, DE RIESE W, KENNEDY RC. Characterization of PEDF: a multi-functional serpin family protein. **J Cell Biochem**. 2009 Apr 1;106(5):769-75. doi: 10.1002/jcb.22072. PMID: 19180572. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcb.22072>

FIRE, Andrew et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **nature**, v. 391, n. 6669, p. 806-811, 1998. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/35888> Acesso em: 15 abr. 2024.

FLUECK, Christian et al. Plasmodium falciparum heterochromatin protein 1 marks genomic loci linked to phenotypic variation of exported virulence factors. **PLoS pathogens**, v. 5, n. 9, p. e1000569, 2009. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1000569> Acesso em: 15 abr. 2024.

FONT-BURGADA, Joan et al. Drosophila HP1c isoform interacts with the zinc-finger proteins WOC and Relative-of-WOC to regulate gene expression. **Genes & development**, v. 22, n. 21, p. 3007-3023, 2008. Disponível em: <https://genesdev.cshlp.org/content/22/21/3007.short> Acesso em: 15 abr. 2024.

FRANÇA, Natália Regine de et al. Interferência por RNA: Uma nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 50, p. 695-702, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbr/a/QMNDF9KH6tFqZhXfz6zjfGs/> Acesso em: 15 abr. 2024.

GERARD M, TONY H. Chapter 56 - Eukaryotic Kinomes: Genomics and Evolution of Protein Kinases. Editor(s): Ralph A. Bradshaw, Edward A. Dennis, **Handbook of Cell Signaling** (Second Edition), Academic Press, 2010, Pages 393-397, ISBN 9780123741455, Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374145-5.00056-5>.

GEYER, Kathrin et al. Methyl-CpG-binding (SmMBD2/3) and chromobox (SmCBX) proteins are required for neoblast proliferation and oviposition in the parasitic blood fluke *Schistosoma mansoni*. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 6, p. e1007107, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007107>. Acesso em: 15 jul. 2023.

GEYER, Kathrin K. et al. Cytosine methylation regulates oviposition in the pathogenic blood fluke *Schistosoma mansoni*. **Nature communications**, v. 2, n. 1, p. 424, 2011. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ncomms1433> Acesso em: 15 abr. 2024.

GOBERT, G. N., MOERTEL, L., BRINDLEY, P. J. & MCMANUS, D. P. Developmental gene expression profiles of the human pathogen *Schistosoma japonicum*. *BMC Genomics* **10**, (2009).

[Google Scholar](#)

GOMES, Elaine; DOMINGUES, Ana Lúcia; BARBOSA, Constança. Esquistossomose: manejo clínico e epidemiológico na atenção básica. In: **Esquistossomose: manejo clínico e epidemiológico na atenção básica**. 2017. p. 152-152. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/320615656_Esquistossomose_manejo_clinico_e_epidemiologico_na_atencao_basica. Acesso em: 15 jul. 2023.

GONG, Fade; MILLER, Kyle M. Histone methylation and the DNA damage response. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 780, p. 37-47, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383574217300418> Acesso em: 15 abr. 2024.

HA, I., LANE, W., REINBERG, D. Cloning of a human gene encoding the general transcription initiation factor IIB. *Nature* **352**, 689–695 (1991). Disponível em: <https://doi.org/10.1038/352689a0>

HAMS, Emily; AVIELLO, Gabriella; FALLON, Padraic G. The schistosoma granuloma: friend or foe?. **Frontiers in immunology**, v. 4, p. 89, 2013. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2013.00089/full> Acesso em: 15 jul. 2023.

HAGERTY, J. R. & JOLLY, E. R. Heads or tails? Differential translational regulation in cercarial heads and tails of schistosome worms. *PLoS One* **14**, (2019). [Google Scholar](#)

HANSON, Sara; WOLFE, Kenneth H. An evolutionary perspective on yeast mating-type switching. **Genetics**, v. 206, n. 1, p. 9-32, 2017. Disponível em: <https://academic.oup.com/genetics/article-abstract/206/1/9/6064191> Acesso em: 15 abr. 2024.

HERNANDEZ-RIVAS, Rosaura et al. Telomeric heterochromatin in *Plasmodium falciparum*. **BioMed Research International**, v. 2010, n. 1, p. 290501, 2010. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1155/2010/290501> Acesso em: 15 abr. 2024.

HIRAGAMI, K; FESTENSTEIN, R. Heterochromatin protein 1: a pervasive controlling influence. **Cellular and molecular life sciences CMLS**, v. 62, p. 2711-2726, 2005. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-005-5287-9> Acesso em: 15 abr. 2024.

HORN, David. Genome-scale RNAi screens in African trypanosomes. **Trends in Parasitology**, v. 38, n. 2, p. 160-173, 2022. Disponível em: [https://www.cell.com/trends/parasitology/abstract/S1471-4922\(21\)00226-9](https://www.cell.com/trends/parasitology/abstract/S1471-4922(21)00226-9) Acesso em: 15 abr. 2024.

HOWE, K. L., BOLT, B. J., SHAFIE, M., KERSEY, P. & BERRIMAN, M. WormBase ParaSite – a comprehensive resource for helminth genomics. *Mol Biochem Parasitol* **215**, 2–10 (2017).

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

HUBBARD SR, Till JH. Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem.* 2000;69:373-98. doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.373. PMID: 10966463. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10966463/>

HULTSCH E, REUTTER W., DECKER, K. Conversion of N-acetylglucosamine to CMP-N-acetylneuraminic acid in a cell-free system of rat liver, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* - General Subjects, Volume 273, Issue 1, 1972, Pages 132-140, ISSN 0304-4165, Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(72\)90200-0](https://doi.org/10.1016/0304-4165(72)90200-0).

IGLESIAS, Nahid et al. Automethylation-induced conformational switch in Ctr4 (Suv39h) maintains epigenetic stability. *Nature*, v. 560, n. 7719, p. 504-508, 2018. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41586-018-0398-2> Acesso em: 15 abr. 2024.

INABA, K. Regulatory Mechanism of Axonemal Dynein. Handbook of Dynein (Second Edition). Edited by Keiko Hirose. 2019 **Jenny Stanford Publishing Pte. Ltd.** ISBN 978-981-4800-01-3 (Hardcover), 978-0-429-02131-2 (eBook) Disponível em: www.jennystanford.com

IVANOVA, Alla. et al. The chromo and SET domains of the Ctr4 protein are essential for silencing in fission yeast. *Nature genetics*, v. 19, n. 2, p. 192-195, 1998. Disponível em: https://www.nature.com/articles/ng0698_192 Acesso em: 15 abr. 2024.

IYENGAR, Sushma; FARNHAM, Peggy J. KAP1 protein: an enigmatic master regulator of the genome. *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, n. 30, p. 26267-26276, 2011. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)48446-9/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)48446-9/fulltext) Acesso em: 15 abr. 2024.

JAMES, Tharappel; ELGIN, Sarah. Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in *Drosophila melanogaster* and its gene. *Molecular and cellular biology*, 1986. Disponível em: 10.1128/mcb.6.11.3862-3872.1986. Acesso em: 15 jul. 2023.

JONES, David; COWELL, Ian; SINGH, Prim. Mammalian chromodomain proteins: their role in genome organisation and expression. *Bioessays*, v. 22, n. 2, p. 124-137, 2000. Disponível em: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(200002\)22:2%3C124::AID-BIES4%3E3.0.CO;2-E](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/(SICI)1521-1878(200002)22:2%3C124::AID-BIES4%3E3.0.CO;2-E) Acesso em: 15 abr. 2024.

KAMRAN, Mohd et al. The paradigm of intracellular parasite survival and drug resistance in leishmanial parasite through genome plasticity and epigenetics: Perception and future perspective. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 13, p. 1001973, 2023.

Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/cellular-and-infection-microbiology/articles/10.3389/fcimb.2023.1001973/full> Acesso em: 15 abr. 2024.

KARA, Goknur; CALIN, George A.; OZPOLAT, Bulent. RNAi-based therapeutics and tumor targeted delivery in cancer. **Advanced drug delivery reviews**, v. 182, p. 114113, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X22000035> Acesso em: 15 abr. 2024.

KARLIĆ, Rosa et al. Histone modification levels are predictive for gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 7, p. 2926-2931, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0909344107>. Acesso em: 15 jul. 2023.

KATZ, N., CHAVES, A. & PELLEGRINO, J. A simple, device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* vol. **14** (1972). [Google Scholar](#)

KNIGHT, Matty et al. Epigenetic modulation, stress and plasticity in susceptibility of the snail host, *Biomphalaria glabrata*, to *Schistosoma mansoni* infection. **International Journal for Parasitology**, v. 46, n. 7, p. 389-394, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751916300182> Acesso em: 15 abr. 2024.

KNUDSEN, Giselle M. et al. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* cercarial secretions. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 4, n. 12, p. 1862-1875, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/mcp.M500097-MCP200>. Acesso em: 15 jul. 2023.

KORNBLIHTT, Alberto R. et al. Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 14, n. 3, p. 153-165, 2013. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrm3525> Acesso em: 15 abr. 2024.

KORN, S M; SCHLUNDT, A. "Structures and nucleic acid-binding preferences of the eukaryotic ARID domain" *Biological Chemistry*, vol. 403, no. 8-9, 2022, pp. 731-747. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/hsz-2021-0404>

KUMAR, Amarjeet; KONO, Hidetoshi. Heterochromatin protein 1 (HP1): interactions with itself and chromatin components. **Biophysical reviews**, v. 12, n. 2, p. 387-400, 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12551-020-00663-y> Acesso em: 15 abr. 2024.

KUMAR, Rakesh. et al. Signaling coupled epigenomic regulation of gene expression. **Oncogene**, v. 36, n. 43, p. 5917-5926, 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nc2017201> Acesso em: 15 abr. 2024.

KUMAR, Rakesh; WANG, Rui-An; BARNES, Christopher J. Coregulators and chromatin remodeling in transcriptional control. **Molecular Carcinogenesis**: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center, v. 41, n. 4, p. 221-230, 2004.

LALAWMPUII, K.; LALRINKIMA, H. Genetic manipulations in helminth parasites. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 47, n. 2, p. 203-214, 2023. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12639-023-01567-w> Acesso em: 15 abr. 2024.

LASICA, Chrystelle et al. Automated ChIPmentation procedure on limited biological material of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. **Wellcome Open Research**, v. 7, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10372461/> Acesso em: 15 abr. 2024.

LAVIGNE, Marc et al. Interaction of HP1 and Brg1/Brm with the globular domain of histone H3 is required for HP1-mediated repression. **PLoS genetics**, v. 5, n. 12, p. e1000769, 2009. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1000769> Acesso em: 15 abr. 2024.

LENNARTSSON, Andreas; EKWALL, Karl. Histone modification patterns and epigenetic codes. **Biochimica et biophysica acta (BBA)-general subjects**, v. 1790, n. 9, p. 863-868, 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416509000038> Acesso em: 15 abr. 2024.

LENZI, Henrique Leonel et al. Migração e desenvolvimento de *Schistosoma mansoni* no hospedeiro definitivo. **Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL., organizadores. Schistosoma mansoni & esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz**, p. 85-145, 2008. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=q4q9BgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA85&dq=LENZI,+Henrique+Leonel+et+al.+Migra%C3%A7%C3%A3o+e+desenvolvimento+de+Schistosoma+mansoni+no+hospedeiro+definitivo.+Carvalho+OS,+Coelho+PMZ,+Lenzi+HL.,+organizadores.+Schistosoma+mansoni+%26+esquistossomose:+uma+vis%C3%A3o+multidisciplinar.+Rio+de+Janeiro:+Editora+Fiocruz,+p.+85-145,+2008.&ots=tehMfgIzbZ&sig=DQ5Dg3gWRSjbgPHW3dLihqRuLcg#v=onepage&q&f=false> Acesso em: 15 jul. 2023.

LEE, S. K. et al. Topoisomerase 3 β interacts with RNAi machinery to promote heterochromatin formation and transcriptional silencing in *Drosophila*. *Nat Commun* **9**, p(2018). [Google Scholar](#)

LI J, et al. Structural basis for multifunctional roles of human Ints3 C-terminal domain. *J Biol Chem*. 2021 Jan-Jun;296:100112. doi: 10.1074/jbc.RA120.016393. Epub 2020 Dec 3. PMID: 33434574; PMCID: PMC7948952. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)00102-7/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)00102-7/fulltext)

LIU, Weiwei. Epigenetics in schistosomes: what we know and what we need know. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, p. 149, 2016. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/cellular-and-infection-microbiology/articles/10.3389/fcimb.2016.00149/full> Acesso em: 15 abr. 2024.

LIU, L. P., NI, J. Q., SHI, Y. D., OAKELEY, E. J. & SUN, F. L. Sex-specific role of *Drosophila melanogaster* HP1 in regulating chromatin structure and gene transcription. *Nat Genet* **37**, 1361–1366 (2005). [CrossRefPubMedWeb of ScienceGoogle Scholar](#)

LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **25**, 402–408 (2001). [CrossRefPubMedWeb of ScienceGoogle Scholar](#)

LO, N. C. et al. Review of 2022 WHO guidelines on the control and elimination of schistosomiasis. *The Lancet Infectious Diseases* vol. **22** e327–e335 Preprint at doi:10.1016/S1473-3099(22)00221-3 (2022). [CrossRefGoogle Scholar](#)

LLANWARNE, Felix; HELMBY, Helena. Granuloma formation and tissue pathology in *Schistosoma japonicum* versus *Schistosoma mansoni* infections. *Parasite immunology*, v. 43, n. 2, p. e12778, 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/pim.12778> Acesso em: 15 jul. 2023.

LOMBERK, Gwen; WALLRATH, Lori; URRUTIA, Raul. The heterochromatin protein 1 family. *Genome biology*, v. 7, p. 1-8, 2006. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/gb-2006-7-7-228> Acesso em: 15 abr. 2024.

MATSUYAMA, Hiroshi et al. The involvement of cyclic adenosine monophosphate in the control of schistosome miracidium cilia. *Journal of Parasitology*, v. 90, n. 1, p. 8-14, 2004. Disponível em: 10.1645/GE-52R1. Acesso em: 15 jul. 2023.

MENEZES, Ana Paula et al. Navigating the boundaries between metabolism and epigenetics in trypanosomes. *Trends in Parasitology*, v. 39, n. 8, p. 682-695, 2023. Disponível em: [https://www.cell.com/trends/parasitology/abstract/S1471-4922\(23\)00128-9](https://www.cell.com/trends/parasitology/abstract/S1471-4922(23)00128-9) Acesso em: 15 abr. 2024.

MOCELLIN, Simone; PROVENZANO, Maurizio. RNA interference: learning gene knock-down from cell physiology. *Journal of translational medicine*, v. 2, p. 1-6, 2004. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/1479-5876-2-39> Acesso em: 15 abr. 2024.

MOUAHID, Gabriel et al. Transplantation of schistosome sporocysts between host snails: A video guide. *Wellcome Open Research*, v. 3, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5806052/> Acesso em: 15 jul. 2023.

MOURÃO, Marina de Moraes et al. Phenotypic screen of early-developing larvae of the blood fluke, *Schistosoma mansoni*, using RNA interference. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 3, n. 8, p. e502, 2009. Disponível em:

<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000502> Acesso em: 15 abr. 2024.

Moescheid, M.F., *et al.* Defining an optimal control for RNAi experiments with adult *Schistosoma mansoni*. *Sci Rep* **13**, 9766 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-36826-6>

NAKAMURA, Rinko; NAKAYAMA, Jun-ichi. Regulation of the SUV39H Family Methyltransferases: Insights from Fission Yeast. **Biomolecules**, v. 13, n. 4, p. 593, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2218-273X/13/4/593> Acesso em: 15 abr. 2024.

NAKATO, Ryuichiro; SAKATA, Toyonori. Methods for ChIP-seq analysis: A practical workflow and advanced applications. **Methods**, v. 187, p. 44-53, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2020.03.005>. Acesso em: 15 jul. 2023.

NAKAYAMA, Jun-ichi; KLAR, Amar; GREWAL, Shiv. A chromodomain protein, Swi6, performs imprinting functions in fission yeast during mitosis and meiosis. **Cell**, v. 101, n. 3, p. 307-317, 2000. Disponível em: [https://www.cell.com/AJHG/fulltext/S0092-8674\(00\)80840-5](https://www.cell.com/AJHG/fulltext/S0092-8674(00)80840-5) Acesso em: 15 abr. 2024.

NATION, Catherine. *et al.* Schistosome migration in the definitive host. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 4, p. e0007951, 2020. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0007951> Acesso em: 15 jul. 2023.

NELWAN, Martin. Schistosomiasis: life cycle, diagnosis, and control. **Current Therapeutic Research**, v. 91, p. 5-9, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011393X19300098>. Acesso em: 15 jul. 2023.

NIELSEN, Peter *et al.* Structure of the HP1 chromodomain bound to histone H3 methylated at lysine 9. **Nature**, v. 416, n. 6876, p. 103-107, 2002. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature722> Acesso em: 15 abr. 2024.

O'MALLEY, Bert; QIN, Jun; LANZ, Rainer. Cracking the coregulator codes. **Current opinion in cell biology**, v. 20, n. 3, p. 310-315, 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955067408000756> Acesso em: 15 abr. 2024.

PALLI, Subba Reddy. RNAi turns 25: contributions and challenges in insect science. **Frontiers in Insect Science**, v. 3, p. 1209478, 2023. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/insect-science/articles/10.3389/finsc.2023.1209478/full> Acesso em: 15 abr. 2024.

PARKER-MANUEL, S. J., IVENS, A. C., DILLON, G. P. & WILSON, R. A. Gene expression patterns in larval *Schistosoma mansoni* associated with infection of the mammalian host. *PLoS Negl Trop Dis* **5**, (2011). [Google Scholar](#)

PARK, Peter. ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology. *Nature reviews genetics*, v. 10, n. 10, p. 669-680, 2009. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrg2641> Acesso em: 15 abr. 2024.

PEREZ-TOLEDO, Karla et al. Plasmodium falciparum heterochromatin protein 1 binds to tri-methylated histone 3 lysine 9 and is linked to mutually exclusive expression of var genes. *Nucleic acids research*, v. 37, n. 8, p. 2596-2606, 2009. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/37/8/2596/2410082?login=false> Acesso em: 15 abr. 2024.

PEREIRA, R. V. et al. Ubiquitin-specific proteases are differentially expressed throughout the *Schistosoma mansoni* life cycle. *Parasit Vectors* **8**, (2015). [Google Scholar](#)

PHILLIPS, Jarrett D.; GILLIS, Daniel J.; HANNER, Robert H. Incomplete estimates of genetic diversity within species: Implications for DNA barcoding. *Ecology and Evolution*, v. 9, n. 5, p. 2996-3010, 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ece3.4757> Acesso em: 15 abr. 2024.

PIACENTINI, Lucia et al. Heterochromatin protein 1 (HP1) is associated with induced gene expression in *Drosophila* euchromatin. *The Journal of cell biology*, v. 161, n. 4, p. 707-714, 2003. Disponível em: <https://rupress.org/jcb/article/161/4/707/44006/Heterochromatin-protein-1-HP1-is-associated-with> Acesso em: 15 abr. 2024.

PICARD, Marion AL et al. Sex-biased transcriptome of *Schistosoma mansoni*: host-parasite interaction, genetic determinants and epigenetic regulators are associated with sexual differentiation. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 10, n. 9, p. e0004930, 2016. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004930> Acesso em: 15 abr. 2024.

PICARD, Marion et al. Dosage compensation throughout the *Schistosoma mansoni* lifecycle: specific chromatin landscape of the Z chromosome. *Genome biology and evolution*, v. 11, n. 7, p. 1909-1922, 2019. Disponível em: <https://academic.oup.com/gbe/article-abstract/11/7/1909/5527757> Acesso em: 15 abr. 2024.

RAMALHO-PINTO, F. J. et al. *Schistosoma mansoni*: defined system for stepwise transformation of cercaria to schistosomule in vitro. *Experimental parasitology*, v. 36, n. 3, p. 360-372, 1974. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0014489474900769> Acesso em: 15 abr. 2024.

RAY, Mukulika et al. Sex-specific splicing occurs genome-wide during early *Drosophila* embryogenesis. *Elife*, v. 12, p. e87865, 2023. Disponível em: <https://elifesciences.org/articles/87865> Acesso em: 15 abr. 2024.

REA, Stephen et al. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. **Nature**, v. 406, n. 6796, p. 593-599, 2000. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/35020506> Acesso em: 15 abr. 2024.

RIBEIRO-PAES, João Tadeu.; RODRIGUES, Vanderlei. Sex determination and female reproductive development in the genus *Schistosoma*: a review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 39, p. 337-344, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0036-46651997000600006> Acesso em: 15 jul. 2023.

RINALDI G, et al. Tort JF, Brindley PJ. RNA interference targeting leucine aminopeptidase blocks hatching of *Schistosoma mansoni* eggs. **Mol Biochem Parasitol**. 2009 Oct;167(2):118-26. doi: 10.1016/j.molbiopara.2009.05.002. Epub 2009 May 20. PMID: 19463860; PMCID: PMC2705689. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2705689/>

ROGER, Emmanuel et al. Controlled chaos of polymorphic mucins in a metazoan parasite (*Schistosoma mansoni*) interacting with its invertebrate host (*Biomphalaria glabrata*). **PLoS neglected tropical diseases**, v. 2, n. 11, p. e330, 2008. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000330> Acesso em: 15 abr. 2024.

ROQUIS, David et al. Histone methylation changes are required for life cycle progression in the human parasite *Schistosoma mansoni*. **PLoS pathogens**, v. 14, n. 5, p. e1007066, 2018. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article/file?id=10.1371/journal.ppat.1007066&type=printable>. Acesso em: 15 jul. 2023.

ROQUIS, David et al. The epigenome of *Schistosoma mansoni* provides insight about how cercariae poise transcription until infection. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 8, p. e0003853, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003853>. Acesso em: 15 jul. 2023.

ROQUIS, D. et al. Exposure to hycanthone alters chromatin structure around specific gene functions and specific repeats in *Schistosoma mansoni*. *Front Genet* **5**, 1–12 (2014).

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

ROSS-INNES, C. S. et al. Differential oestrogen receptor binding is associated with clinical outcome in breast cancer. *Nature* **481**, 389–393 (2012). [CrossRefPubMedWeb of ScienceGoogle Scholar](#)

ROSSETTO, Dorine; AVVAKUMOV, Nikita; CÔTÉ, Jacques. Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events. **Epigenetics**, v. 7, n. 10, p. 1098-1108, 2012. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/epi.21975> Acesso em: 15 abr. 2024.

ROUGEMAILLE, Mathieu et al. Ers1 links HP1 to RNAi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 28, p. 11258-11263, 2012. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1204947109> Acesso em: 15 abr. 2024.

RYBKINA, Ksenia; FARBER, Donna L. Structural cells as key regulators of organ-specific immunity. **Transplantation**, v. 105, n. 6, p. 1137-1139, 2021. Disponível em: https://journals.lww.com/transplantjournal/fulltext/2021/06000/structural_cells_as_key_regulators_of.3.aspx Acesso em: 15 abr. 2024.

SALES-GIL, Raquel; VAGNARELLI, Paola. How HP1 post-translational modifications regulate heterochromatin formation and maintenance. **Cells**, v. 9, n. 6, p. 1460, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/6/1460> Acesso em: 15 abr. 2024.

SCHAEFER, Matthias; LYKO, Frank. Solving the Dnmt2 enigma. **Chromosoma**, v. 119, p. 35-40, 2010. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00412-009-0240-6> Acesso em: 15 abr. 2024.

SCHMIDL, Christian et al. ChIPmentation: fast, robust, low-input ChIP-seq for histones and transcription factors. **Nature methods**, v. 12, n. 10, p. 963-965, 2015. Disponível em: 10.1038/nmeth.3542. Acesso em: 15 jul. 2023.

SCHOELZ, John M.; RIDDLE, Nicole C. Functions of HP1 proteins in transcriptional regulation. **Epigenetics & Chromatin**, v. 15, n. 1, p. 14, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13072-022-00453-8> Acesso em: 15 jul. 2023.

SCHOTTA, Gunnar et al. Central role of Drosophila SU (VAR) 3–9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. **The EMBO journal**, 2002. Disponível em: <https://www.embopress.org/doi/full/10.1093/emboj/21.5.1121> Acesso em: 15 abr. 2024.

SEMAN, Melissa et al. Uncoupling the distinct functions of HP1 proteins during heterochromatin establishment and maintenance. **Cell reports**, v. 42, n. 11, 2023. Disponível em: [https://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S2211-1247\(23\)01440-7](https://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S2211-1247(23)01440-7) Acesso em: 15 abr. 2024.

SHAREEF, Mohammed Momin et al. Drosophila heterochromatin protein 1 (HP1)/origin recognition complex (ORC) protein is associated with HP1 and ORC and functions in heterochromatin-induced silencing. **Molecular biology of the cell**, v. 12, n. 6, p. 1671-1685, 2001. Disponível em: <https://www.molbiolcell.org/doi/full/10.1091/mbc.12.6.1671> Acesso em: 15 abr. 2024.

SHEN, Yuan; WEI, Wei; ZHOU, Dao-Xiu. Histone acetylation enzymes coordinate metabolism and gene expression. **Trends in plant science**, v. 20, n. 10, p. 614-621, 2015. Disponível em: [https://www.cell.com/trends/plant-science/abstract/S1360-1385\(15\)00196-X](https://www.cell.com/trends/plant-science/abstract/S1360-1385(15)00196-X) Acesso em: 15 abr. 2024.

SCHOTTA G, LACHNER M, PETERS AH, JENUWEIN T. The indexing potential of histone lysine methylation. **Novartis Found Symp.** 2004;259:22-37; discussion 37-47, 163-9. PMID: 15171245. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15171245/>

SHUKLA, Himadri et al. An ApiAp2 Transcription Factor with a Dispensable Role in Plasmodium berghei Life Cycle. **ACS Infectious Diseases**, 2024. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/38752809> Acesso em: 15 abr. 2024.

SHVEDUNOVA, Maria; AKHTAR, Asifa. Modulation of cellular processes by histone and non-histone protein acetylation. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 23, n. 5, p. 329-349, 2022. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41580-021-00441-y> Acesso em: 15 abr. 2024.

SILVA, José Roberto Machado; NEVES, Silvia Renata Heisller; GOMES, Delir Correa. Filogenia, Co-Evolução, Aspectos Morfológicos e Biológicos das Diferentes Fases de Desenvolvimento do Schistosoma mansoni. **Schistosoma mansoni & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**, p. 43, 2008. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=q4q9BgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA43&dq=Filogenia,+co-evolu%C3%A7%C3%A3o,+aspectos+morfol%C3%B3gicos+e+biol%C3%B3gicos+das+diferentes+fases+de+desenvolvimento+do+Schistosoma+mansoni&ots=tehMfgID5-&sig=dz9iwYeaELXC2667TtIyqaWEuDI#v=onepage&q=Filogenia%2C%20co-evolu%C3%A7%C3%A3o%2C%20aspectos%20morfol%C3%B3gicos%20e%20biol%C3%B3gicos%20das%20diferentes%20fases%20de%20desenvolvimento%20do%20Schistosoma%20mansoni&f=false> Acesso em: 15 jul. 2024.

SKELLY, Patrick J.; DA'DARA, Akram; HARN, Donald A. Suppression of cathepsin B expression in Schistosoma mansoni by RNA interference. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 4, p. 363-369, 2003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751903000304> Acesso em: 15 abr. 2024.

SMITHERS SR & TERRY RJ. The infection of laboratory hosts with cercariae of Schistosoma mansoni and the recovery of the adult worms.. *Parasitology* **55**, 695–700 (1965). [CrossRefPubMedWeb of ScienceGoogle Scholar](#)

ŠTEFANIĆ, Saša et al. RNA interference in Schistosoma mansoni schistosomula: selectivity, sensitivity and operation for larger-scale screening. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 10, p. e850, 2010. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000850> Acesso em: 15 abr. 2024.

STEPHENS, Kimberly E. et al. Epigenetic regulation and measurement of epigenetic changes. **Biological research for nursing**, v. 15, n. 4, p. 373-381, 2013. Disponível em: [10.1177/1099800412444785](https://doi.org/10.1177/1099800412444785). Acesso em: 15 jul. 2023.

STUTZMAN, Alexis V. et al. Heterochromatic 3D genome organization is directed by HP1a-and H3K9-dependent and independent mechanisms. **Molecular Cell**, v. 84, n. 11, p. 2017-2035. e6, 2024. Disponível em: [https://www.cell.com/molecular-cell/fulltext/S1097-2765\(24\)00395-2?dgcid=raven_jbs_etoc_email](https://www.cell.com/molecular-cell/fulltext/S1097-2765(24)00395-2?dgcid=raven_jbs_etoc_email) Acesso em: 15 abr. 2024.

SUMMERS, Shannan et al. A review of the genetic determinants of praziquantel resistance in *Schistosoma mansoni*: Is praziquantel and intestinal schistosomiasis a perfect match?. **Frontiers in Tropical Diseases**, v. 3, p. 933097, 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/tropical-diseases/articles/10.3389/fitd.2022.933097/full> Acesso em: 15 jul. 2023.

TAUDT, A., NGUYEN, M. A., HEINIG, M., §4, F. J. & Colomé-Tatché, M. chromstaR: Tracking combinatorial chromatin state dynamics in space and time. (2016) doi:10.1101/038612. [Abstract/FREE Full Text](#) [Google Scholar](#)

TAKAKI, Kevin. et al. *Schistosoma mansoni* eggs modulate the timing of granuloma formation to promote transmission. **Cell Host & Microbe**, v. 29, n. 1, p. 58-67. e5, 2021. Disponível em: [https://www.cell.com/cell-host-microbe/fulltext/S1931-3128\(20\)30560-6](https://www.cell.com/cell-host-microbe/fulltext/S1931-3128(20)30560-6) Acesso em: 15 jul. 2023.

TAN S, et al. Zinc-finger protein-targeted gene regulation: genomewide single-gene specificity. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2003 Oct 14;100(21):11997-2002. doi: 10.1073/pnas.2035056100. Epub 2003 Sep 26. PMID: 14514889; PMCID: PMC218702. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC218702/>

TESFIE, Addisu et al. Praziquantel is an effective drug for the treatment of *Schistosoma Mansoni* infection among school-aged children in Northwest Ethiopia. **Tropical medicine and health**, v. 48, p. 1-8, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s41182-020-00204-z>. Acesso em: 15 jul. 2023.

TRAVERS, Andrew; MUSKHELISHVILI, Georgi. DNA structure and function. **The FEBS journal**, v. 282, n. 12, p. 2279-2295, 2015. Disponível em: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/febs.13307> Acesso em: 15 abr. 2024.

TRINDADE, Natália Silva da et al. *Schistosoma mansoni* Heterochromatin Protein 1 (HP1) nuclear interactome in cercariae. **Journal of Proteomics**, v. 239, p. 104170, 2021. Disponível em: 10.1016/j.jprot.2021.104170. Acesso em: 15 jul. 2023.

TROJER, Patrick; REINBERG, Danny. Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature?. **Molecular cell**, v. 28, n. 1, p. 1-13, 2007. Disponível em: [https://www.cell.com/cell-stem-cell/fulltext/S1097-2765\(07\)00623-5](https://www.cell.com/cell-stem-cell/fulltext/S1097-2765(07)00623-5) Acesso em: 15 abr. 2024.

VALADÃO, Analina Furtado. et al. Y-box binding protein from *Schistosoma mansoni*: interaction with DNA and RNA. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 125, n. 1-2, p. 47-57, 2002., [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(02\)00210-4](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(02)00210-4). Acesso em: 15 jul. 2023.

VAN ATTIKUM, Haico; GASSER, Susan M. The histone code at DNA breaks: a guide to repair?. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 10, p. 757-765, 2005. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrm1737> Acesso em: 15 abr. 2024.

VAQUERO, Alejandro; LOYOLA, Alejandra; REINBERG, Danny. The constantly changing face of chromatin. **Science of aging knowledge environment**, v. 2003, n. 14, p. re4-re4, 2003. Disponível em: <https://www.science.org/doi/full/10.1126/sageke.2003.14.re4> Acesso em: 15 abr. 2024.

VASILESCU, Julian; GUO, Xuecui; KAST, Juergen. Identification of protein-protein interactions using in vivo cross-linking and mass spectrometry. **Proteomics**, v. 4, n. 12, p. 3845-3854, 2004. Disponível em: 10.1002/pmic.200400856. Acesso em: 15 jul. 2024.

VERMAAK, Danielle; MALIK, Harmit S. Multiple roles for heterochromatin protein 1 genes in Drosophila. **Annual review of genetics**, v. 43, n. 1, p. 467-492, 2009. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev-genet-102108-134802> Acesso em: 15 abr. 2024.

VIGILÂNCIA DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI - Diretrizes Técnicas. Ministério da Saúde. 4ª edição. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. 2014. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigilancia_esquistossome_mansonii_diretrizes_tecnicas.pdf. Acesso em: 15 jul. 2023.

VILAR, M. M. & PINTO, R. M. Reappraisal of experimental infections with cercariae and schistosomula of a brazilian strain of *Schistosoma Mansoni* IN MICE. *Braz. J. Biol* vol. **65** (2005).
[Google Scholar](#)

WATSON SA, MCSTAY GP. Functions of Cytochrome *c* oxidase Assembly Factors. **Int J Mol Sci**. 2020 Sep 30;21(19):7254. doi: 10.3390/ijms21197254. PMID: 33008142; PMCID: PMC7582755. Disponível: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7582755/>

WANG F, YANG W. Structural insight into translesion synthesis by DNA Pol II. **Cell**. 2009 Dec 24;139(7):1279-89. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.043. PMID: 20064374; PMCID: PMC3480344. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3480344/>

WANG J, et al. 3rd. Large-scale RNAi screening uncovers therapeutic targets in the parasite *Schistosoma mansoni*. **Science**. 2020 Sep 25;369(6511):1649-1653. doi: 10.1126/science.abb7699. PMID: 32973031; PMCID: PMC7877197. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7877197/>

WEIRICH, Sara; KHELLA, Mina S.; JELTSCH, Albert. Structure, activity and function of the Suv39h1 and Suv39h2 protein lysine methyltransferases. **Life**, v. 11, n. 7, p. 703, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2075-1729/11/7/703> Acesso em: 15 abr. 2024.

WILKES, J.M., DOERIG, C. The protein-phosphatome of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **BMC Genomics** 9, 412 (2008). Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-412>

WILSON, R. A. Schistosomiasis then and now: What has changed in the last 100 years? *Parasitology* vol. **147** 507–515 Preprint at doi:10.1017/S0031182020000049 (2020).

CrossRefGoogle Scholar

WOELLNER-SANTOS, Daisy et al. Schistosoma mansoni vaccine candidates identified by unbiased phage display screening in self-cured rhesus macaques. **npj Vaccines**, v. 9, n. 1, p. 5, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41541-023-00803-x>. Acesso em: 15 abr. 2024.

WU, Xiao-Jun et al. Proteomic analysis of Schistosoma mansoni proteins released during in vitro miracidium-to-sporocyst transformation. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 164, n. 1, p. 32-44, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2008.11.005>. Acesso em: 15 jul. 2023.

WYSE, Brandon. et al. Parasite epigenetics and immune evasion: lessons from budding yeast. **Epigenetics & Chromatin**, v. 6, p. 1-10, 2013. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/1756-8935-6-40> Acesso em: 15 abr. 2024.

XU, Wei et al. Genome-wide interrogation of protein-DNA interactions in mammalian cells using ChIPmentation. **STAR protocols**, v. 1, n. 3, p. 100187, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S266616672030174X> Acesso em: 15 abr. 2024.

ZENK, Fides et al. HP1 drives de novo 3D genome reorganization in early Drosophila embryos. **Nature**, v. 593, n. 7858, p. 289-293, 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41586-021-03460-z> Acesso em: 15 abr. 2024.

ZHANG, Yanjun et al. Overview of histone modification. **Histone Mutations and Cancer**, p. 1-16, 2021. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-15-8104-5_1 Acesso em: 15 abr. 2024.

ZIMMER, Alex M. et al. Loss-of-function approaches in comparative physiology: is there a future for knockdown experiments in the era of genome editing?. **Journal of Experimental Biology**, v. 222, n. 7, p. jeb175737, 2019. Disponível em: <https://journals.biologists.com/jeb/article-abstract/222/7/jeb175737/20597> Acesso em: 15 abr. 2024.

APÊNDICE I

ARTIGO CIENTÍFICO

Heterochromatin protein 1 (HP1) of *Schistosoma mansoni*: non-canonical chromatin landscape and fitness effects

Natália Silva da Trindade^a, Marilia Bergamini Valentini^a, Anne Rognon^b, Tiago Manuel Fernandes Mendes^a, Silmara Marques Allegretti^a, Christoph Grunau^{b1}, Fernanda Janku Cabral^{a1}

^a Department of Animal Biology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, Sao Paulo, Brazil.

^b IHPE – University of Perpignan Via Domitia, CNRS, Ifremer, University of Montpellier, F-66000 Perpignan, France

¹ Correspondence: email: fjanku@unicamp.br, address: Rua Monteiro Lobato 255, room 13, Department of Animal Biology Institute of Biology, University of Campinas, phone +551935210030 and christoph.grunau@univ-perp.fr ^b IHPE – University of Perpignan Via Domitia, CNRS, Ifremer, University of Montpellier, F-66000 Perpignan, France

Abstract

Heterochromatin protein 1 (HP1) is widespread in several organisms playing a role in control of gene expression by heterochromatin formation and maintenance of silent chromatin. *Schistosoma mansoni* is a human parasite that is responsible for Schistosomiasis, a tropical neglected disease in the tropical and subtropical areas in the world, where the intermediate host *Biomphalaria glabrata* is present. In this study we attempted to investigate if the *SmHP1* is enriched in *S. mansoni* chromatin in cercariae larvae stage, compared with another larvae stage sporocysts and it's importance for *S. mansoni* life cycle progression and parasite fitness. We used ChIPmentation with commercial antibody ab109028 that passed in-house quality control. Our data show that *S. mansoni* HP1 enrichment is non-canonical with a peak at the transcription end sites of protein coding genes. We did not find strong differences in *SmHP1* chromatin landscapes between sporocysts and cercariae. Knock-down of *SmHP1* in schistosomula and *in vivo* experiments in mice unexpectedly increased parasite fitness. Our results suggest that *SmHP1* may influence chromatin structure in a non-canonical way in *S. mansoni* stages and may play a role in regulation of parasite fitness.

Keywords: Heterochromatin protein 1, HP1, ChIPmentation, cercariae, sporocysts, *Schistosoma mansoni*.

Introduction

Schistosomes are trematode parasite responsible for causing schistosomiasis. It is estimated that in 2021, approximately 251.4 million people required treatment¹. Intestinal schistosomiasis is caused by *S.mansoni*. The parasite has a complex life cycle that includes two hosts, snails of the genus *Biomphalaria* and humans, which are intermediate and definitive hosts, respectively². During its life cycle, the parasite goes through significant stage changes, and it is known that histone post-translational modifications play important roles at each stage of the life cycle. The molecular complexity of *S. mansoni* life cycle has been revealed along years and efforts to elucidate the *S. mansoni* epigenome has given some insights about epigenetic regulation of the life cycle³⁻⁶. However, it is expected that coregulators will also be required for the maintenance of each stage. In several organisms, the heterochromatin protein 1 (HP1) acts as co-regulators and performs fundamental functions such as maintaining the silenced state of chromatin, DNA repair, among other diverse functions.

This protein is composed of the chromodomain (CD) and chromoshadow (CDS) domains and a linker region between them. CD recognizes and binds to methylated histone tails, while CDS is responsible for homo- and heterodimerization⁷. The region between the domains makes connections to nucleic acids and is quite variable between organisms. In contrast, the domains present well-conserved amino acid sequences among different species. HP1 is an important component essential for heterochromatin gene silencing. This function was described in model organisms such as cancer progression in *Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster*, *Plasmodium falciparum*, fission yeast and *Arabidopsis thaliana*⁸⁻¹². Histone modifications are associated with different chromatin states and play important roles in regulating gene expression. Particularly, it is described that in *P. falciparum* methylation of histone H3 at lysine 9 (H3K9) forms binding sites for the HP1 protein and is an important means of controlling gene expression^{10,13}.

In a previous study¹⁴ we showed that HP1 is co-immunoprecipitated with other important DNA associated proteins such as helicases, transcription factors and methyltransferases. These results suggest an important role for HP1 in regulating gene transcription in *S. mansoni*. Geyer and colleagues also described, through *in vitro* experiments with adult worms that *SmCBX* (*Smp_179650*, *SmHP1*, *Sm Chromobox protein homolog 5*) plays a role in the parasite biology regulating oviposition¹⁵. We hypothesized that HP1 homolog of *S.mansoni* is associated with DNA and play a role in chromatin structure biology in the parasite life cycle. To test this hypothesis about the involvement of HP1 in the chromatin formation and maintenance in larvae stages, cercaria and sporocyst, were performed the ChIPmentation using an antibody against HP1 homolog used previously¹⁴. In addition, for investigation of the role of HP1 in parasite development, migration, fitness, and inflammatory response, we generated *SmHP1 in vivo* Knock-outs. Our results suggested that *SmHP1* may have a function to regulate epigenetic plasticity in the parasite through the increasing of parasite's fitness without affect host inflammatory response.

Results

AntiHP1 antibody ab109028 can be used for ChIP in *S.mansoni*

Antibody quality is an important criterion for the success and reliability of ChIP-Seq. HP1 is a conserved protein and we had shown before that antiHP1 Abcam ab109028 can be used in Western Blots with *S.mansoni*. A literature search for the use of ab109028 resulted in 32 publications (Suppl. Table 1) but only in one case it was used for ChIP-seq, and the efficiency of the antibody was not tested there. Thus, initial experiments were necessary to evaluate if the antibody was suitable for ChIP-Seq. We used a previously developed pipeline to test whether ab109028 (lot numbers GR38873387336-6 and -9) can be used for ChIP-Seq¹⁶. Essentially, the method consists of (i) performing a Western blot to assure that only the band of the expected size can be observed and (ii) doing a chromatin IP titration experiment with a constant amount of input chromatin and increasing amounts of antibody to test if saturation of available epitopes can be achieved.

We performed Western Blots on *S.mansoni* cercariae and sporocysts and used *D.melanogaster* embryos as a positive control. Expected molecular weight of *D.melanogaster* HP1 is 23.194 kD (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/B6UVQ8/entry>). The dimer is therefore predicted to have a molecular weight of 46 kD¹⁴. Such a band is observed in all samples in the Western blot (Figure 1) but supplementary bands can be distinguished. Apparently, under our relatively gentle extraction conditions and without beta-mercaptoethanol the dimers remained intact. We noticed that this behavior is not without precedent (e.g. <https://www.antibodies.com/fr/hp1-alpha-antibody-a88817> ; <https://www.abcam.com/en-hu/products/primary-antibodies/hp1-alpha-antibody-epr5777-heterochromatin-marker-ab109028>) even for Knock-out validated antibodies

(<https://www.antibodies.com/fr/hp1-alpha-antibody-a88778>). The results shown in Figure 1 agree also with previous western blotting¹⁴ which had demonstrated that *Sm*HP1 can form dimers in solution, showing a band of approximately 56 kD.

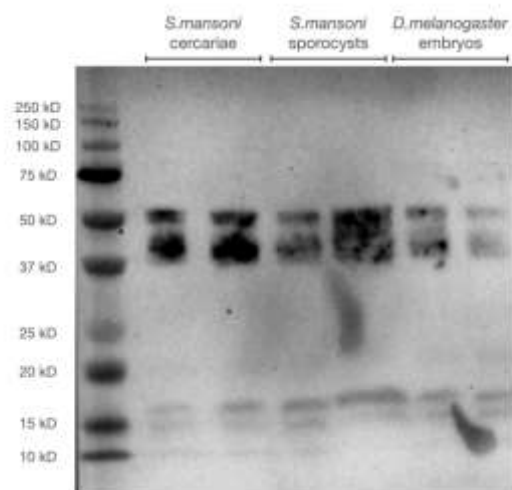
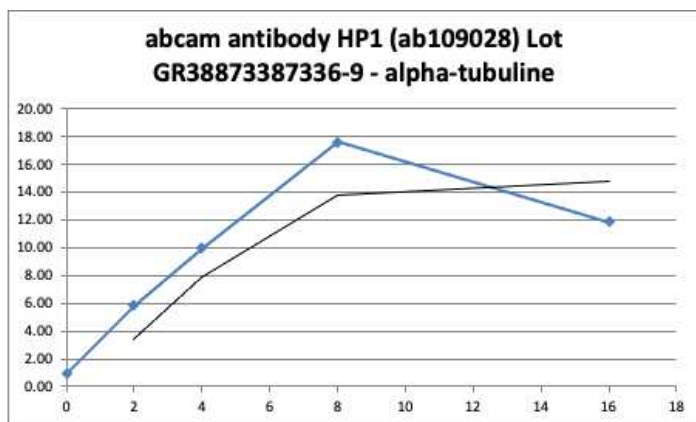


Figure 1: Western blot on crude protein extracts of *S. mansoni* cercariae and sporocysts (left and middle), and *D. melanogaster* embryos (right). All lanes in duplicates. Left lane molecular weight marker.

We then proceeded to ChIPmentation titration of the antibody using chromatin from *S. mansoni* cercariae. ChIPmentation is a streamlined method of crosslink Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) that uses Tn5 for integration of adaptor for library amplification (Tagmentation). A constant amount of chromatin corresponding to 160,000 cells was incubated with 0, 2, 4, 8 and 16 μ l of ab109028 during the ChIPmentation procedure and input recovery was measured using qPCR on 2 arbitrarily chosen loci: *Sm*-alpha-tubuline and *Sm*-28S-rDNA. Results are shown in figure 2, indicating that above 8 μ l antibody saturation is achieved.



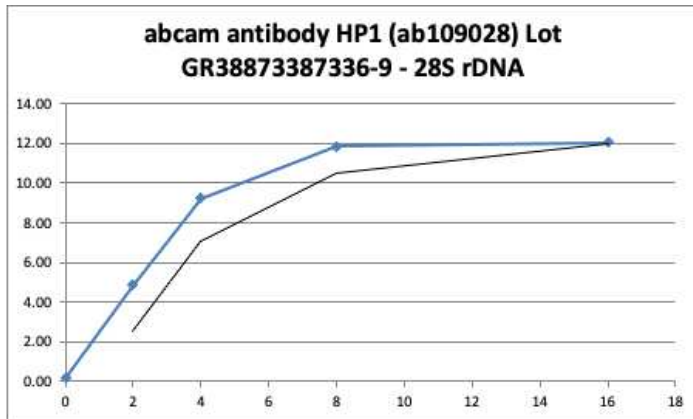


Figure 2: Results of titration of antiHP1 antibody. X-axis indicates amount of antibody in µl, Y-axis input recovery in %. Upper panel for Sm-alpha-tubuline, lower panel for Sm-28S-rDNA. Saturation is achieved with 8 µl of antibody.

Based on this initial testing we decided to proceed to ChIPmentation with 8µl of antibody.

ChIP-Seq metagene profiles in *S.mansoni* peak around transcription end sites (TES)

After having firmly established that ab109028 was suitable for ChIP we proceeded to ChIPmentation on cercariae and sporocysts of *S.mansoni*. We hypothesized that HP1 could establish a heterochromatic structure in the cercariae that are transcriptionally inactive. To investigate the distribution of HP1 with relation to known genomic features we produced metagene profiles around protein coding genes. In contrast to what was observed in other species, *Sm*HP1 shows enrichment around the TES (figure 3) in both, cercariae and sporocysts.

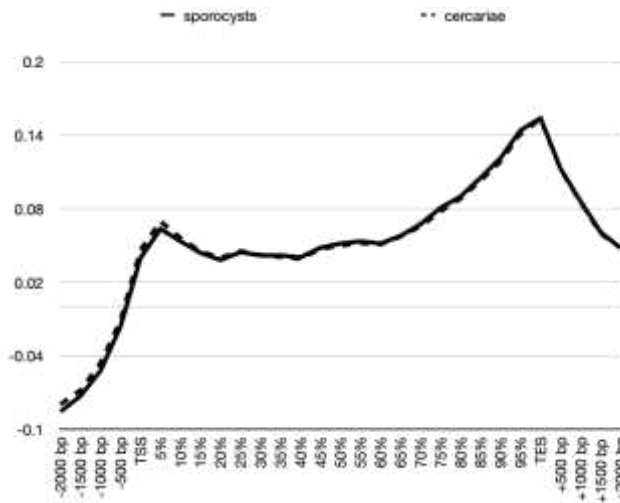


Figure 3: Metagene profiles of *S.mansoni* sporocysts (solid line) and cercariae (dotted line). X-axis : relative position around genes, Y-axis : average log(RPKM) of two replicates, TSS: Transcription start site, TES: transcription end site

This unexpected result and the fact that the current study is the first analysis of HP1 distribution and there are therefore no precedents to compare with, prompted us to test the ChIPmentation procedure with antiHP1 ab109028 on the well characterized model species *D. melanogaster*.

AntiHP1 antibody ab109028 delivers canonical ChIP-Seq results in *D.melanogaster*

It might be argued that the observed metagene profiles in *S.mansoni* are due to a peculiar nature of the antibody that remained unnoticed. We therefore performed ChIPmentation experiments with *D.melanogaster* embryos, a species for which data of ChIP-Seq experiments are available. We used the query terms “hp1 chip drosophila” to search the NCBI SRA and obtained 186 results

belonging to 55 BioSamples. We downloaded ChIP-Seq data for WT embryo replicate 1 and 2 (NCBI SRA: SRS6795886, SRS6795887) corresponding to ENA SRX8497063 and SRX8497065 and data for input (NCBI SRA SRS6795884, ENA SRX8497062). The NCBI SRA entry states that 2 μ g antiHP1, Developmental Studies Hybridoma Bank C1A9 had been used.¹⁷ We also downloaded ChIP-Seq data for fly heads that had been produced with the same antibody¹⁸ (NCBI BioProject PRJNA490276): ENA SRR7817540, SRR7817541, SRR7817542 for 3 ChIP-Seq replicates and ENA SRR7817573 for the input. We then performed ChIPmentation with antibody ab109028 on fruit fly embryos under the same conditions as for our *S.mansoni* samples. After sequencing, we processed the published data and our experimental data as described for the *S.mansoni* samples. For SRA data of embryos, ChromstaR¹⁹ did not manage to construct a differential model probably due to relatively low enrichment of the reads. We resorted therefore to read counts distributions around metagenes (log(RPKM) instead of log(obs/exp), shown in figure 4). While it is interesting to note that there is a small decrease in adult flies compared to embryos at the TES (figure 5), we did not observe strong differences between the profiles generated based on the data of the two independent earlier studies and our experiment.

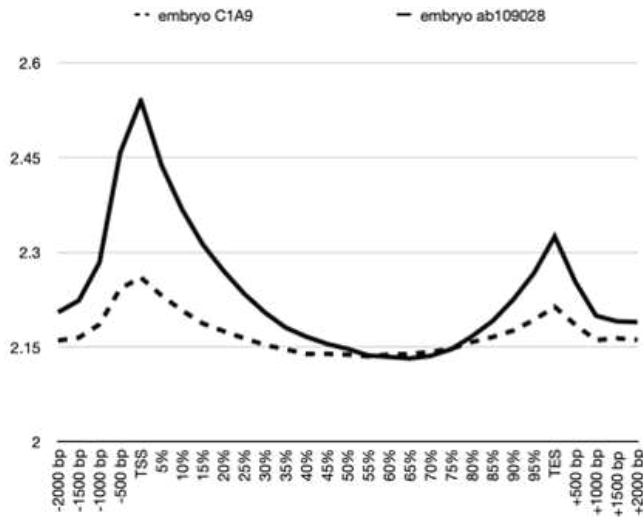


Figure 4: Metagene profiles of *D.melanogaster* embryos (solid line) produced in this study with antibody ab109028, and previously published data on embryos (dotted line) with antibody C1A9. X-axis : relative position around genes, Y-axis : average log(RPKM) of two replicates (the values can therefore not be compared directly to y-axis of figures 3 and 4)

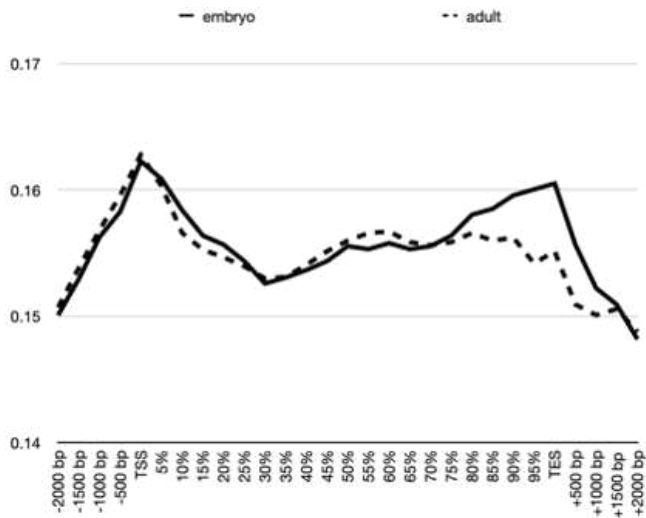


Figure 5: Metagene profiles of *D.melanogaster* embryos (solid line) produced in this study with antibody ab109028, and previously published data from another laboratory on adult flies (dotted line) with antibody C1A9. X-axis: relative position around genes, Y-axis $\log(\text{observed}/\text{expected})$ of two replicates

Therefore, we conclude that antibody ab109028 delivers canonical ChIP-seq profiles around genes with the fruit fly as a model. Consequently, we have no reason to believe that the non-canonical HP1 chromatin landscape around genes in *S.mansoni* is due to the antibody quality or the ChIPmentation procedure.

There are few regions with differential enrichment of HP1 between cercariae and sporocysts

We used ChromstaR to identify 154 regions with differences in HP1 enrichment between cercariae and sporocysts (Suppl. File 1). However, these regions are small and visual inspection of HP1 landscape suggested that HP1 enrichment occurs over broader regions. We therefore applied MACS bdgbroadcall on combined uniquely aligned ChIP-Seq reads, independently for sporocysts and cercaria. Results are in table 1.

Table 1: Number of broad peaks in cercariae and sporocyst larvae using different pvalue scores from MACS2, score 5 means pvalue $1e-5$.

	MACS bdgbroadcall - -cutoff 2	MACS bdgbroadcall - -cutoff 5
sporocysts	6406	89
Cercariae	7485	222

We then used DiffBind for the identification of differential enrichment between sporocysts and cercariae. Based on the conservative peakcall at score 5 we identified 36 differentially enriched regions that separated sporocysts and cercariae into 2 clusters (figure 6).

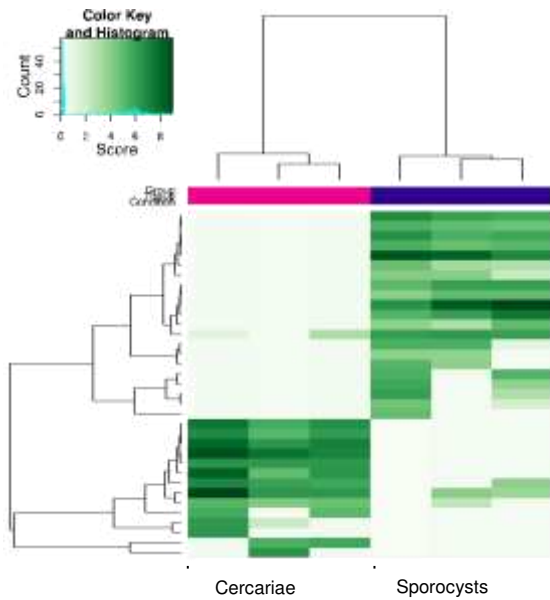


Figure 6: Clustering of Cercariae and sporocyst larvae based on differential HP1 chromatin enrichment

Since this number is relatively low, we wondered whether the number of identified differences could have been obtained by chance alone. We used bootstrapping through random segments that matched the 222 broad cercariae HP1 peaks in number and total span and used DiffBind for identification of differential enrichment. Bootstrapping through these analyses found in average 61.5 ± 6.8 differential peaks. Consequently, we conclude that the differences identified by DiffBind identified on broad regions lack the statistical power to be confident about their occurrence other than by accident.

We then pursued with visual inspection on IGV, to search for regions with HP1 enrichment. Results are shown in figure 7. We observed peaks of HP1 spanning the gene Smp_330520 in sporocysts and cercariae with higher enrichment of HP1 in Sporocysts. This region overlaps also a differential peak identified by ChromstaR (figure 7a). We also identified a large region of roughly 22 kb spanning the gene Smp_344610 in which HP1 is enriched in cercariae (figure 7b). It is noteworthy that this enrichment is not observed in the input (genomic DNA) excluding therefore genetic differences between the samples in these regions. Expression in <https://v7test.schisto.xyz/smansoni-v7/> revealed mRNA presence of Smp_330520 in cercariae but not in sporocysts, and very low expression of Smp_344610 in both stages.





Figure 7: Genomic regions identified by visual inspection with differential enrichment of SmHP1 in cercariae and sporocyst larvae. IGV Screenshots of two genomic fragments that contain differentially enriched regions: A. SM_V9_5 15,108-15,122 kb spanning Smp_330520; B. SM_V9_ZSR 16,420 – 16,560 kb spanning Smp_344610. Lanes from top: GFF annotation (blue), Input sporocysts (light green), HP1 enrichment in 3 replicates for sporocysts (green), enrichment of combined sporocysts replicates (dark green), MACS broad peak call sporocysts (green), enrichment of combined cercariae replicates (dark magenta), MACS broad peak call cercariae (red), Input cercariae (pink), HP1 enrichment in 3 replicates for cercariae (magenta), ChromstaR detected differential enrichment (blue)

In summary, our finding cannot formally exclude that there are differences between sporocyst and cercariae in HP1 enrichment, but differences are small.

In vivo knock-down of SmHP1 increases parasite's fitness in mice

Given the unexpected distribution of SmHP1 over the genome and absence of important differences between two developmental stages we wondered if SmHP1 played any role in the parasite *in vivo*. We designed an experiment to perform the knockdown of SmHP1 by RNA interference in schistosomula. Decrease of expression was small (Suppl. Figure 1) compared with control dsmCherry and wild type schistosomula. The *in vivo* results are shown in the Figure 8. Parasite burden showed that parasite was able to migrate, develop and to achieve the correct destination that is portal hepatic and mesenteric veins, despite dsRNA employed and schistosomula injection. To evaluate infection success and parasite fitness, we measured granuloma and egg count/feces gram using Kato-Katz method²⁰. The number of granulomas and area were the same for all tested conditions, suggesting that knock-down of SmHP1 does not affect the granulomatous response from host. Surprisingly, the parasite number of eggs/feces gram were roughly 2 times higher in the knock-down.

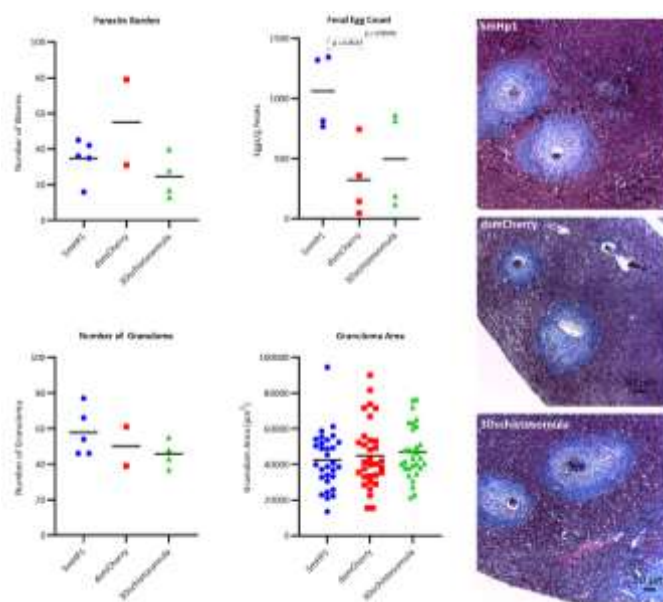


Figure 8: Functional *in vivo* studies in mice injected with (i) dsRNA incubated HP1 3 days schistosomula (blue) compared to (ii) mock treated dsRNA gene (dsMCherry), and (iii) wild type. Parasite burden, fecal egg count, granuloma number and area were measured. Significant differences were only found for fecal egg count which increased for the knock-down parasites.

Discussion

Recent years have seen an important increase in our understanding of chromatin structure of *S.mansoni*. However, this knowledge stems almost exclusively from work on histone modifications and DNA methylation. To widen our view to other chromatin proteins we focused here on the HP1 homologue.

Our results of antibody titration show you that antibody ab109028 is suitable for ChIP-seq experiments on *S.mansoni*. Our report shows for the first time the HP1 profile for this species.

There are several works that have focused on transcription and translation in cercariae, absence of transcription but use of mRNA from previous stages, low rates of translational until infection and schistosomula migration when transcription is activated.^{21–23} Since cercariae is transcriptionally silent and poised for transcription⁴, we reasoned that they might have a tighter heterochromatin formation and differential HP1 occupancy, but our results suggest the opposite: HP1 presence (and presumably heterochromatinization) might not be advantageous if it is necessary to rapidly activate transcription after infection.

HP1 is a conserved member of the large family of chromatin proteins, and it is believed to fulfil conserved functions in different organisms. For example, in *Drosophila* there are 5 isoforms of HP1 and it is mainly located in heterochromatic regions rich in H3K9me3¹⁷. However, in *Drosophila* HP1 is found preferentially associated with heterochromatin, polytene chromosomes and the X chromosome. The study also suggested that the formation of heterochromatin occurs in parallel with the transcriptional activation of the nuclei and expression of different genes²⁴. Previous work using RNA interference technology have found that HP1 silencing was directly related to chromosomal defects²⁵.²⁴ The distribution of HP1 throughout the *S. mansoni* genome does not follow a pattern observed for other organisms suggesting that its function is also different.

Our *in vivo* findings indicate an increase of fitness through an increase of oviposition. Even with a moderate decrease of *SmHP1* expression it was possible to observe an increase of oviposition. This goes in line with earlier results where alteration of oviposition was shown in *in vitro* adult worms' culture with siRNA against *SmCBX/SmHP1* (Smp_179650). In this work, it was also demonstrated that *SmCBX/SmHP1* interacts with *Smmdb2/3* colocalizing together with schistosome neoblasts and reproductive tissues, suggesting a role on reproductive organs of parasite¹⁵.

Our results are another step towards the better understanding of the role of *SmHP1* in chromatin structure, gene expression and parasite fitness. It shows that results from model organisms, albeit tremendously useful in many cases, cannot be simply extrapolated to any other organism. *SmHP1* seems to play according to rules that are yet to be discovered.

Materials And Methods

Extraction of sporocysts and cercariae

Sporocysts were obtained from *Biomphalaria glabrata* strain BgGUA, 6 months infected with *S.mansoni* strain SmDFO. Dissection was performed at room temperature. The snails were placed individually in large petri dishes and water was added. With the help of smaller glass plates, the snails were crushed, and fragments and tissues were removed. The sporocysts were transferred to new petri dishes and the membrane surrounding them was removed. Then, the hepatic pancreas was removed, and two samples were obtained for each snail, sporocysts free of *Biomphalaria* tissues and sporocysts that may be contaminated with *Biomphalaria* tissues. Sporocyst samples were stored at -20°C

Cercariae strain SmVEN were obtained from snails *B. glabrata*. The snails were placed in pots of water and exposed to artificial light for 2 hours. Next, the Cercariae were counted and divided into aliquots with 1000 Cercariae each. They were then stored at -20°C.

Experiments were done according to the national ethics standards. The IHPE animal facility holds agreement number F6613601 and has authorization APAFIS #39910-2022121915564694 v2 for the routine production and shared used of *S.mansoni* larvae.

ChIPmentation *S.mansoni* cercariae, sporocysts and drosophila

ChIPmentation Kit for Histones (Diagenode, Cat. No. C01011009) was used. Approximately 1000 cercariae, 1 sporocyst and a corresponding amount of drosophila embryos were used for each ChIPmentation reaction. Samples were thawed, resuspended in 500 µL of HBSS, crushed for 1 minute with a sterile pestle, and then left at room temperature for 3 minutes. After this, 13.5 µL of 37% formaldehyde was added and gently homogenized for 10 minutes at room temperature. To stop the cross-link reaction, 57 µL of glycine from the Diagenode kit was added and left under agitation for 5 minutes. We then proceeded according to the suppliers manual. Chromatin was disrupted by sonication using the Bioruptor Pico with 5 cycles of 30s ON and 30s OFF. ChIPmentation were done on an IP-Star pipetting robot according to the pre-established protocol with the modification of washing time to 20 minutes. Antibody titration was done as described in¹⁶ with 0, 2, 4, 8 and 16µl antibody to obtain the saturating quantity and finally 8 µL of antibody HP1 AbCam (ab109028, lot GR38873387336-9) were used for each reaction. Input libraries were generated as described earlier and optimal number of library amplification cycles was determined by qPCR as described in the same protocol²⁶.

Primers and low molecular weight fragments were removed from the libraries with AMPure beads on the IP-Star and the quality and quantity of the sequencing libraries were checked with a BioAnalyzer High Sensitivity DNA Assay. Sequencing was done by the BioEnvironnement core facility on an Illumina NextSeq 550 as 75 bp single-end reads.

Bioinformatic Analyzes

Analyzes were carried out on a local Galaxy instance (<http://bioinfo.univ-perp.fr>). First, the quality of the sequences were checked by FastQC/MultiQC, adapter sequences were removed with Trim Galore! and reads were aligned to version 9 of the *S. mansoni* genome (*schistosoma_mansoni.PRJEA36577.WBPS17.genomic.fa*) with permission from <https://parasite.wormbase.org/>²⁷ using Bowtie2 evoking sensitive end-to-end. Uniquely aligned reads were retained using the Bowtie tag": "XS:". PCR duplicates were removed with SamTools RmDup. The number of aligned unique reads was downsampled to 4.7 Mio reads per library using Picard Tools (Suppl. table 2). Differential analysis was done with ChromstaR²⁸ with bin size 1000 bp and step size 500 bp.

Annotations came from *schistosoma_mansoni.PRJEA36577.WBPS17.genes.gff3*. For metagene analyses, the gene feature was retained and 4898 genes of the forward strand were used.

Differential chromatin states were detected with ChromstaR default parameters.

Peakcalling was performed also with MACS2 and default parameters, followed by MACS2 bdgbroadcall, with 2 and 5 as -cutoff value. Differential HP1 enrichment was detected by DiffBind.²⁹ IGV was used for visual inspection.

The same procedures were applied to *D.melanogaster* data based on *dmel_r6.06_FB2015_03_gtf_dmel-all-r6.06.gff3* and the corresponding genome fasta file. Details in Suppl. table 2.

***In vivo* studies**

In vivo study was carried out with 15 female Balb mice divided into 3 groups. Ethical statement at the University of Campinas was under number CEUA protocol (Comissão de Ética no Uso de Animais # 6064-1/2022). Each group contained 5 animals and each animal was infected with 100 3-day-old schistosomula (Groups 1-3). The quantity of schistosomula and cercariae per animal was determined according to the study by Vilar and collaborators³⁰. The infection of the groups was subcutaneous, however, in groups 1 and 2, represented by SmHP1 and dsmCherry, respectively, the schistosomula were previously incubated in culture for 3 days with dsRNA. The third group was also kept in culture for 3 days, however, in the absence of dsRNA. For each group, 100 schistosomula were inoculated per animal. Schistosomula was conducted as previously described³¹. Briefly, BH (Belo Horizonte) lineage of the *S. mansoni* was used and schistosomula were transformed by tail break and several RPMI washes for tail removal. After 3 washes, 200 schistosomula were counted and distributed equally in culture plates with 2ml of Medium 169 (Atená, Biotechnology, Campinas, Brazil), described by³², supplemented with hormones and fetal bovine serum, 30 µg of dsRNA and kept in CO₂ atmosphere at 37°C for 3 days.

All dsRNAs were done using the T7RiboMAX Express RNAi System (Promega, Belo Horizonte, Brazil). Specifically, the oligonucleotides for amplification HP1 gene (T7 + Forward **TAATACGACTCACTATAGGGTGTGGAAGAGTCAGCTGGT** and T7 + reverse **TAATACGACTCACTATAGGGAGGGTCGATTTTCAGGTGTG**), containing T7 promotor for dsRNA synthesis. Gene expressions were evaluated in the QuantStudio qPCR System (Thermo), using the HP1 primers (Primer Forward (CGTCACTCAGTTCAGACAGC) e primer reverse (CTCTTCCACACTCACGGGTA)) and endogenous SmEIF4E (Smp_001500) as described previously³³, and using the 3 days-schistosomula condition as gene expression calibrator³⁴. Infected animals with wild type and dsRNA were weighted and Kato Katz²⁰ were done one week before perfusion. Perfusion was done as described by³⁵. For histology, liver tissues were fixed in 10% formaldehyde and fixed in paraffin block and tissue slices were cut and colored by Masson's trichrome. All granulomas present in 10 random fields of the histological section of each animal were quantified. The images were captured using a photomicroscope using Leica® LAS EZ4 HD software. The total area of the granuloma was measured using ImageJ 1.53t software.

End Matter

Author Contributions and Notes

F.J.C and C.G designed research, C.G. N.S.T. M.V.B. A.R., T.M.F.M. S.M.A. and F.J.C performed research, C.G analyzed ChIP-seq data, N.S.T. and M.B.V. analyzed *in vivo* results; and F.J.C., C.G and NST wrote the paper. The authors declare no conflict of interest.

Data availability

Sequencing raw data are available at NCBI SRA under BioProject accession number PRJNA1090249.

Acknowledgments

With the support of LabEx CeMEB, an ANR “Investissements d’avenir” program (ANR-10-LABX-04-01) through mobility grants to NST and FJC, and a mobility grant of the Défi RIVOC of the Region Occitanie to FJC. This study is set within the framework of the « Laboratoire d’Excellence (LabEx) » TULIP (ANR-10-LABX-41). Experimental work was done on the Environmental epigenomics platform of the LabEx CeMEB. *D.melanogaster* embryos were a generous gift of Bernd Schüttengruber, IGP Montpellier, France. FJC is supported by FAPESP 2021/14982-6 (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) and FAEPEX (Fundação de Amparo à Pesquisa e Extensão da Universidade Estadual de Campinas) and NST Ph.D. studies is supported by CAPES fellowship supplied by Animal Biology post-graduation program. We thank the Bio-Environment platform (University of Perpignan Via Domitia) and Jean-François Allienne for support in library preparation and sequencing

References

1. 1. [!\[\]\(746d018fdf6ab02bf5fb7681133e8b29_img.jpg\)](#)
Lo, N. C. et al. Review of 2022 WHO guidelines on the control and elimination of schistosomiasis. The Lancet Infectious Diseases vol. **22** e327–e335 Preprint at doi:10.1016/S1473-3099(22)00221-3 (2022).
[CrossRefGoogle Scholar](#)
2. 2. [!\[\]\(5daa6eee1904cb6b9d765700250de764_img.jpg\)](#)
Wilson, R. A. Schistosomiasis then and now: What has changed in the last 100 years? Parasitology vol. **147** 507–515 Preprint at doi:10.1017/S0031182020000049 (2020).
[CrossRefGoogle Scholar](#)
3. 3. [!\[\]\(d72e437c7cc5947bc0b147aba6602563_img.jpg\)](#)
Roquis, D. et al. Exposure to hycanthone alters chromatin structure around specific gene functions and specific repeats in Schistosoma mansoni. Front Genet **5**, 1–12 (2014).
[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)
4. 4. [!\[\]\(0d2a89e6d0cbcd8e0459b972b9332401_img.jpg\)](#)
Roquis, D. et al. The Epigenome of Schistosoma mansoni Provides Insight about How Cercariae Poise Transcription until Infection. PLoS Negl Trop Dis **9**, e0003853 (2015).
[Google Scholar](#)
5. 5.
Roquis, D. et al. Histone methylation changes are required for life cycle progression in the human parasite Schistosoma mansoni. PLoS Pathog **14**, 1–26 (2018).
[CrossRefGoogle Scholar](#)
6. 6. [!\[\]\(cdcd8a42e5993b465235781ccc1c8555_img.jpg\)](#)
Picard, M. A. L. et al. Sex-Biased Transcriptome of Schistosoma mansoni: Host-Parasite Interaction, Genetic Determinants and Epigenetic Regulators Are Associated with Sexual Differentiation. PLoS Negl Trop Dis **10**, 1–28 (2016).
[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)
7. 7. [!\[\]\(c0c9434f3698c901303014555ccb5687_img.jpg\)](#)
Meyer-Nava, S., Nieto-Caballero, V. E., Zurita, M. & Valadez-Graham, V. Insights into HP1a-Chromatin Interactions. Cells vol. **9** Preprint at doi:10.3390/cells9081866 (2020).
[CrossRefGoogle Scholar](#)
8. 8. [!\[\]\(4f9bd4c242eb94a69f6647adc92289eb_img.jpg\)](#)

Dialynas, G. K., Vitalini, M. W. & Wallrath, L. L. Linking Heterochromatin Protein 1 (HP1) to cancer progression. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* vol. **647** 13–20 Preprint at doi:10.1016/j.mrfmmm.2008.09.007 (2008).

[CrossRefPubMedWeb of ScienceGoogle Scholar](#)

9. 9.

Capkova Frydrychova, R., Biessmann, H. & Mason, J. M. Regulation of telomere length in *Drosophila*. *Cytogenetic and Genome Research* vol. **122** 356–364 Preprint at doi:10.1159/000167823 (2009).

[CrossRefGoogle Scholar](#)

10. 10. [¶]

Pérez-Toledo, K. et al. Plasmodium falciparum heterochromatin protein 1 binds to tri-methylated histone 3 lysine 9 and is linked to mutually exclusive expression of var genes. *Nucleic Acids Res* **37**, 2596–2606 (2009).

[CrossRefPubMedWeb of ScienceGoogle Scholar](#)

11. 11.

Nakamura, R. & Nakayama, J. I. Regulation of the SUV39H Family Methyltransferases: Insights from Fission Yeast. *Biomolecules* vol. **13** Preprint at doi:10.3390/biom13040593 (2023).

[CrossRefGoogle Scholar](#)

12. 12. [¶]

Exner, V. et al. The chromodomain of LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 is essential for H3K27me3 binding and function during arabidopsis development. *PLoS One* **4**, (2009).

[Google Scholar](#)

13. 13. [¶]

Flueck, C. et al. Plasmodium falciparum heterochromatin protein 1 marks genomic loci linked to phenotypic variation of exported virulence factors. *PLoS Pathog* **5**, (2009).

[Google Scholar](#)

14. 14. [¶]

da Trindade, N. S. et al. Schistosoma mansoni Heterochromatin Protein 1 (HP1) nuclear interactome in cercariae. *J Proteomics* **239**, (2021).

[Google Scholar](#)

15. 15. [¶]

Geyer, K. K. et al. Methyl-CpG-binding (SmMBD2/3) and chromobox (SmCBX) proteins are required for neoblast proliferation and oviposition in the parasitic blood fluke Schistosoma mansoni. *PLoS Pathog* **14**, p(2018).

[Google Scholar](#)

16. 16. [¶]

Cosseau, C. & Grunau, C. Native chromatin immunoprecipitation. Native chromatin immunoprecipitation.. *Methods in Molecular Biology* **791**, 195–212 (2011).

[Google Scholar](#)

17. [17.](#)

Zenk, F. et al. HP1 drives de novo 3D genome reorganization in early *Drosophila* embryos. *Nature* **593**, 289–293 (2021).

[Google Scholar](#)

18. [18.](#)

Lee, S. K. et al. Topoisomerase 3 β interacts with RNAi machinery to promote heterochromatin formation and transcriptional silencing in *Drosophila*. *Nat Commun* **9**, p(2018).

[Google Scholar](#)

19. [19.](#)

Taudt, A., Nguyen, M. A., Heinig, M., §4, F. J. & Colomé-Tatché, M. chromstaR: Tracking combinatorial chromatin state dynamics in space and time. (2016) doi:10.1101/038612.

[Abstract/FREE Full TextGoogle Scholar](#)

20. [20.](#)

Katz, N., Chaves, A. & Pellegrino, J. A SIMPLE,DEVICE FOR QUANTITATIVE STOOL THICK-SMEAR TECHNIQUE IN SCHISTOSOMIASIS MANSONI. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* vol. **14** (1972).

[Google Scholar](#)

21. [21.](#)

Gobert, G. N., Moertel, L., Brindley, P. J. & McManus, D. P. Developmental gene expression profiles of the human pathogen *Schistosoma japonicum*. *BMC Genomics* **10**, (2009).

[Google Scholar](#)

22. [22.](#)

Hagerty, J. R. & Jolly, E. R. Heads or tails? Differential translational regulation in cercarial heads and tails of schistosome worms. *PLoS One* **14**, (2019).

[Google Scholar](#)

23. [23.](#)

Parker-Manuel, S. J., Ivens, A. C., Dillon, G. P. & Wilson, R. A. Gene expression patterns in larval *Schistosoma mansoni* associated with infection of the mammalian host. *PLoS Negl Trop Dis* **5**, (2011).

[Google Scholar](#)

24. [24.](#)

Apte, M. S. & Meller, V. H. Sex differences in *Drosophila melanogaster* heterochromatin are regulated by non-sex specific factors. *PLoS One* **10**, (2015).

[Google Scholar](#)

25. 25. [↗](#)

Liu, L. P., Ni, J. Q., Shi, Y. D., Oakeley, E. J. & Sun, F. L. Sex-specific role of *Drosophila melanogaster* HP1 in regulating chromatin structure and gene transcription. *Nat Genet* **37**, 1361–1366 (2005).

[CrossRefPubMedWeb of ScienceGoogle Scholar](#)

26. 26. [↗](#)

Lasica, C. et al. Automated ChIPmentation procedure on limited biological material of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Wellcome Open Res* **7**, (2022).

[Google Scholar](#)

27. 27. [↗](#)

Howe, K. L., Bolt, B. J., Shafie, M., Kersey, P. & Berriman, M. WormBase ParaSite – a comprehensive resource for helminth genomics. *Mol Biochem Parasitol* **215**, 2–10 (2017).

[CrossRefPubMedGoogle Scholar](#)

28. 28. [↗](#)

Taudt, A., Nguyen, M. A., Heinig, M., §4, F. J. & Colomé-Tatché, M. chromstaR: Tracking combinatorial chromatin state dynamics in space and time. (2016) doi:10.1101/038612.

[Abstract/FREE Full TextGoogle Scholar](#)

29. 29. [↗](#)

Ross-Innes, C. S. et al. Differential oestrogen receptor binding is associated with clinical outcome in breast cancer. *Nature* **481**, 389–393 (2012).

[CrossRefPubMedWeb of ScienceGoogle Scholar](#)

30. 30. [↗](#)

Vilar, M. M. & Pinto, R. M. REAPPRAISAL OF EXPERIMENTAL INFECTIONS WITH CERCARIAE AND SCHISTOSOMULA OF A BRAZILIAN STRAIN OF *Schistosoma Mansoni* IN MICE. *Braz. J. Biol* vol. **65** (2005).

[Google Scholar](#)

31. 31. [↗](#)

Ramalho-Pinto, F. J. et al. *Schistosoma Mansoni*: Defined System for Stepwise Transformation of Cercaria to Schistosomule in Vitro ‘. *EXPERIMENTAL PARASITOLOGY* vol. **36** (1974).

[Google Scholar](#)

32. 32. [↗](#)

Basch, P. F. Cultivation of *Schistosoma Mansoni* In Vitro. I. Establishment of Cultures from Cercariae and Development until Pairing. Source: *The Journal of Parasitology* vol. **67** <https://about.jstor.org/terms> (1981).

[Google Scholar](#)

33. 33. [↗](#)

Pereira, R. V. et al. Ubiquitin-specific proteases are differentially expressed throughout the *Schistosoma mansoni* life cycle. *Parasit Vectors* **8**, (2015).

[Google Scholar](#)

34. 34.4

Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).

[CrossRefPubMedWeb of ScienceGoogle Scholar](#)

35. 35.4

Smithers SR & Terry RJ. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms.. *Parasitology* **55**, 695–700 (1965).

[CrossRefPubMedWeb of ScienceGoogle Scholar](#)

Supplementary table 1: previous use of antiHP1 antibody Abcam ab109028

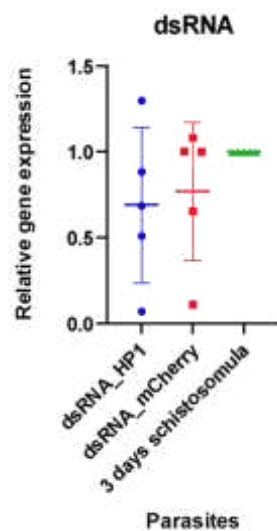
Designation of target	Reference	Technique	Cat# (Abcam)
HP1 α	https://doi.org/10.1101/2024.02.07.579285	Cell Tension	ab109028
CBX5	https://doi.org/10.1021/acs.omega.1c05381	Chemiprecipitation	ab109028
HP1 α	https://doi.org/10.1101/2023.11.09.566494	ChIP-seq	ab109028
HP1 α	https://doi.org/10.17615/p7cp-z032	Co-Immunoprecipitation	ab109028
HP1 α	https://doi.org/10.1038/s41556-022-01008-5	eCLIP-seq	ab109028
HP1 α	https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.08.006	Immunoblots	ab109028
HP1 α	https://doi.org/10.7554/eLife.63972	Immunoblotting and immunostaining	ab109028
HP1 α	https://doi.org/10.15252/embr.202051041	immunoblotting, immunofluorescence, flow cytometry	ab109028
HP1 α	https://doi.org/10.1080/15384101.2018.1471313	Immunocytochemistry	ab109028
HP1 α	https://doi.org/10.1016/j.theorigenology.2024.01.003	Immunofluorescence	ab109028
HP1	https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.04.001	Immunofluorescence	ab109028

HP1α	https://doi.org/10.1038/s41467-023-38118-z	Immunofluorescence	ab109028
HP1α	https://doi.org/10.1186/s13059-021-02455-3	Immunofluorescence	ab109028
HP1α	DOI: 10.1126/sciadv.abq4831	Immunofluorescence	ab109028
HP1α	https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2023.103592	Immunofluorescence	ab109028
HP1α	https://doi.org/10.1111/cpr.13566	Immunofluorescence	ab109028
HP1α	https://doi.org/10.1091/mbc.E18-04-0256	Immunofluorescence	ab109028
HP1α	https://doi.org/10.1101/2023.07.17.549271	Immunofluorescence	ab109028
HP1α	https://doi.org/10.1016/j.cellrep.2023.112329	Immunofluorescence	ab109028
HP1α	https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.12.013	Immunofluorescence	ab109028
HP1α	https://doi.org/10.1101/2023.12.21.572889	Immunofluorescence	ab109028
HP1α	https://doi.org/10.1096/fj.201700753R	Immunofluorescence and Western Blotting	ab109028
HP1α	https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.12.016	Immunofluorescence and Western Blotting	ab109028
HP1α	https://doi.org/10.3390/cancers12102833	Immunohistochemistry	ab109028
HP1α	https://doi.org/10.1101/2023.12.03.569804	Immunoprecipitation and Western blotting	ab109028
CBX5	https://doi.org/10.1186/s12935-020-1157-7	Western Blotting	ab109028
HP1	https://doi.org/10.1007/s43032-021-00500-x	Western Blotting	ab109028
HP1	https://doi.org/10.1093/nar/gkab249	Western Blotting	ab109028
CBX5	https://doi.org/10.1186/s12885-023-11108-6	Western Blotting	ab109028
HP1	10.18632/genesandcancer.84	Western Blotting	ab109028
HP1α	https://doi.org/10.18632/genesandcancer.84	Western Blotting	ab109028
HP1α	https://doi.org/10.1016/j.cellrep.2021.109694	Western Blotting and immunoprecipitation	ab109028

Supplementary table 2: Detailed sequencing and alignment data

Sample	Supplier Name	file name	reads R1	adapte r trimmi ng	Aligne -ment rate	pick unique and RmDup	in %	Down- sample to
Ce 1	cercaria ChIP HP1 - replica 1	Ce1_S25_L001_R1_001_fastq.gz	27,584,702	100%	85.75%	8,539,009	30.96%	4,700,000
Ce 2	cercaria ChIP HP1 - replica 2	Ce2_S26_L001_R1_001_fastq.gz	31,243,784	100%	90.78%	10,362,799	33.17%	4,700,000
Ce 3	cercaria ChIP HP1 - replica 3	Ce3_S27_L001_R1_001_fastq.gz	30,792,782	100%	81.45%	8,857,714	28.77%	4,700,000
Ce-In	input cercariae undiluted Tn5	InNa_S31_L001_R1_001_fastq.gz	14,441,656	100%	96.04%	9,316,089	64.51%	4,700,000
Sp 1	sporocyst ChIP HP1 - replica 1	Sp1_S28_L001_R1_001_fastq.gz	34,896,078	100%	59.46%	7,340,487	21.04%	4,700,000
Sp 2	sporocyst ChIP HP1 - replica 2	Sp2_S29_L001_R1_001_fastq.gz	35,630,630	100%	61.87%	7,967,706	22.36%	4,700,000
Sp 3	sporocyst ChIP HP1 - replica 3	Sp3_S30_L001_R1_001_fastq.gz	29,439,162	100%	44.01%	4,719,547	16.03%	4,700,000
Sp-In	input tagmentation library sporocysts SmDFO in BgGUA	Sp-In_S7_L001_R1_001_fastq.gz	188,264,064	100%	57.44%	16,001,570	8.50%	4,700,000
Dm2	D.melanogaster embryos HP1 ChIPmentation rep 2	Dm2_S9_L001_R1_001_fastq.gz	157,680,688	100%	83.54%	18,515,265	11.74%	16,000,000
Dm3	D.melanogaster embryos HP1 ChIPmentation rep 3	Dm3_S10_L001_R1_001_fastq.gz	185,909,252	100%	87.05%	22,123,566	11.90%	16,000,000

Dm-In	D.melanogaster embryos HP1 Input	Dm-In_S11_L001_R1_001_fastq.gz	173,301,784	100%	95.84% 45	20,385,7	11.76% 6	16,000,000
Dm-adult1	D.melanogaster adults HP1 ChIP rep 1 from SRA	SRR7817540.fastq.gz	27,849,221	100%	91.26% 24	12,676,1	45.52% 2	10,000,000
Dm-adult2	D.melanogaster adults HP1 ChIP rep 2 from SRA	SRR7817541.fastq.gz	30,240,617	100%	91.42% 30	15,525,8	51.34% 4	10,000,000
Dm-adult3	D.melanogaster adults HP1 ChIP rep 3 from SRA	SRR7817542.fastq.gz	37,549,684	100%	89.03% 05	10,173,6	27.09% 9	10,000,000
Dm-input	D.melanogaster adults HP1 Input from SRA	SRR7817573.fastq.gz	23,583,211	100%	95.44% 90	17,566,2	74.49% 9	10,000,000
Dm-embryo1	D.melanogaster embryo HP1 ChIP rep 1 from SRA	SRR11952662.fastq.gz	19,894,682	100%	94.63% 86	12,376,1	62.21% 1	10,000,000
Dm-embryo2	D.melanogaster embryo HP1 ChIP rep 2 from SRA	SRR11952664.fastq.gz	46,050,252	100%	91.61% 10	25,623,5	55.64% 4	10,000,000
Dm-embryo-In	D.melanogaster embryo HP1 Input from SRA	SRR11952661.fastq.gz	27,346,764	100%	95.32% 14	19,767,6	72.29% 9	10,000,000



Supplementary Figure 1. Relative gene expression of dsRNA schistosomula cultures compared to expression of wild type schistosomula. The gene expression was calculated by delta CT method³⁴, using wild type schistosomula as gene expression calibrator and the endogenous gene was SmEIF4E (Smp_001500) as described previously³³

ANEXOS

Anexo I – Declaração de Bioética e Biossegurança

CERTIFICADO CEUA nº 246/2022




CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Estudo da Proteína da Heterocromatina (HP1) como co-regulador da expressão gênica, o papel no desenvolvimento do parasita e na infecção do hospedeiro vertebrado**, registrada com o nº **6064-1/2022** sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Fernanda Janku Cabral e Natália Silva da Trindade**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **18/07/2022**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/09/2022 a 30/12/2024
Vigência da autorização para manipulação animal:	18/07/2022 a 30/12/2024
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/c/JUnib
No. de animais:	48
Idade/Peso:	30.00 Dias / 20.00 Gramas
Sexo:	48 Fêmeas
Origem:	CEMIB
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotérios da Parasitologia, DBA, IB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA, SISEBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, **08 de setembro de 2022**

Prof. Dr. Wagner José Fávoro

Presidente

Rosângela dos Santos

Secretária Executiva

Observação: Realizar consulta ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a esta protocolo até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP área de pesquisadores responsáveis. A não apresentação do relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

Documento assinado. Verificar autenticidade em sigad.unicamp.br/sigad/verifica
Informar código: 418E2C7FD AEE4432B AD454F5E 7E31D64E

Documento assinado eletronicamente por **WAGNER JOSE FAVARO, PRESIDENTE DA CEUA/UNICAMP**, em 14/09/2022, às 08:14 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.250/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

Documento assinado eletronicamente por **ROSANGELA DOS SANTOS, SECRETÁRIA EXECUTIVA DA CEUA/UNICAMP**, em 08/09/2022, às 09:26 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site:
sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador:
418ECF7D AEE4430B ADA54F9E 7631D64E

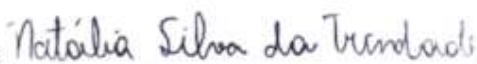


Anexo II – Declaração de Direitos Autorais

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Heterochromatin protein 1 (HP1) of Schistosoma mansoni: non-canonical chromatin landscape and fitness effects**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 07/06/2024

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Natália Silva da Trindade**
RG n.º 13376959

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Fernanda Janku Cabral**
RG n.º 233703159