

Universidade Federal de Ouro Preto

Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

PPGBIOTEC

Tese

Parâmetros epigenéticos e parasitológicos associados à esquistossomose mansônica em camundongos C57BL/6 *Ebi3*^{-/-}

Ester Alves Mota

Ouro Preto

2020



UFOP

Ester Alves Mota

Parâmetros epigenéticos e parasitológicos associados à esquistossomose mansônica em camundongos *C57BL/6 EBi3^{-/-}*

Tese de doutorado submetida ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Área de concentração: Genômica e Proteômica

Orientadora: Prof^a Dr^a Renata Guerra de Sá Cota

Ouro Preto

2020



SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

M917p Mota, Ester Alves .

Parâmetros epigenéticos e parasitológicos associados à esquistossomose mansônica em camundongos C57BL/6 EBi3-/- . [manuscrito] / Ester Alves Mota. - 2020.

126 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Renata Guerra de Sá Cota.

Tese (Doutorado). Universidade Federal de Ouro Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Biotecnologia.

Área de Concentração: Genômica e Proteômica.

1. Schistosoma mansoni. 2. Epigenética. 3. Relação hospedeiro-parasito. I. Cota, Renata Guerra de Sá. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 616.995.122

Bibliotecário(a) Responsável: Sione Galvao Rodrigues - SIAPE: 1.463.787



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**




ATA DE DEFESA DE DOUTORADO

Aos 31 dias do mês de janeiro do ano de 2020, às 09:00 horas, nas dependências Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (Nupeb), foi instalada a sessão pública para a defesa de tese da doutoranda Ester Alves Mota, sendo a banca examinadora composta pela Profa. Dra. Renata Guerra de Sá Cota (Presidente - UFOP), pelo Prof. Dr. Elio Hideo Baba (Membro - Externo), pela Profa. Dra. Fernanda Janku Cabral (Membro - Externo), pelo Prof. Dr. Milton Hercules Guerra de Andrade (Membro - UFOP), pelo Prof. Dr. Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares (Membro - UFOP). Dando início aos trabalhos, a presidente, com base no regulamento do curso e nas normas que regem as sessões de defesa de tese, concedeu à doutoranda 40 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Parâmetros Epigenéticos e Parasitológicos Associados à Esquistossomose Mansônica em Camundongos C57bl/6 Ebi3-/-", na área de concentração: Genômica e Proteômica. Terminada a exposição, a presidente da banca examinadora concedeu, a cada membro, um tempo para perguntas e respostas à candidata sobre o conteúdo da tese, na seguinte ordem: Primeiro Profa. Dra. Fernanda Janku Cabral; segundo Prof. Dr. Elio Hideo Baba; terceiro Prof. Dr. Milton Hercules Guerra de Andrade; quarto Prof. Dr. Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares; quinto Profa. Dra. Renata Guerra de Sá Cota. Dando continuidade, ainda de acordo com as normas que regem a sessão, a presidente solicitou aos presentes que se retirassem do recinto para que a banca examinadora procedesse à análise e decisão, anunciando, a seguir, publicamente, que a doutoranda foi aprovada, sob a condição de que a versão definitiva da tese deva incorporar todas as exigências da banca, devendo o exemplar final ser entregue no prazo máximo de 60 (sessenta) dias à Coordenação do Programa. Para constar, foi lavrada a presente ata que, após aprovada, vai assinada pelos membros da banca examinadora e pela doutoranda. Ouro Preto, 31 de janeiro de 2020.



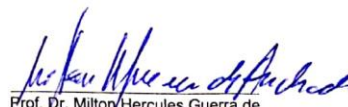
Profa. Dra. Renata Guerra de Sá Cota
Presidente



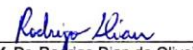
Prof. Dr. Elio Hideo Baba



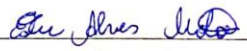
Profa. Dra. Fernanda Janku Cabral



Prof. Dr. Milton Hercules Guerra de Andrade



Prof. Dr. Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares



Doutoranda

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a Deus;

Aos meus familiares, especialmente minha mãe Maria Aparecida Alves Mota;

À professora Dr^a Renata Guerra de Sá Cota pela oportunidade;

Aos colegas do laboratório (LBBM) pelos momentos agradáveis;

Aos laboratórios multiusuários do NUPEB;

Às agências de fomento e à universidade que possibilitaram a execução desse trabalho: Capes, PPG-Biotec e UFOP.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular NUPEB/ICEB/UFOP em Ouro Preto, Minas Gerais, com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

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

Resumo

A hipótese desse trabalho é que o parasito *Schistosoma mansoni* em resposta ao sistema imune do hospedeiro mamífero altera seu estado epigenético e modula o estado epigenético do hospedeiro definitivo, e conseqüentemente a extensão do granuloma hepático. Para investigar essa hipótese foi utilizada a infecção em modelo murino C57BL/6 *Ebi3*^{-/-} e delineados os objetivos específicos: (i) a investigação dos efeitos parasitológicos; (ii) se o parasito modularia mecanismos epigenéticos no hospedeiro; (iii) se o hospedeiro poderia afetar a expressão de genes relacionados a mecanismos epigenéticos do parasito; (iv) avaliar a expressão de miRNAs e lncRNAs de *S. mansoni* no modelo C57BL/6 *Ebi3*^{-/-} bem como o potencial desses ncRNAs como biomarcadores (v) avaliar a expressão de genes relacionados a epigenética na cepa LE do *S. mansoni* resistente ao praziquantel (LE-PZQ). Foram utilizados camundongos C57BL/6 WTC (selvagem controle), WTI (selvagem infectado), *Ebi3*^{-/-}C (nocaute controle) e *Ebi3*^{-/-}I (nocaute infectado) todos com 55 dias de infecção, 100 cercárias. Nos experimentos com *S. mansoni*, foram utilizados *pool* de parasitos recuperados de camundongos WT (LE-controle), cepa LE-PZQ e recuperados de *Ebi3*^{-/-} (LE de *Ebi3*^{-/-}). Os resultados mostram que a esquistossomose murina no modelo C57BL/6 *Ebi3*^{-/-}I apresenta uma diminuição no dano hepático, no volume e número dos granulomas e quantidade de ovos nas fezes em relação ao observado no grupo WTI, (p<0,05). A demetilação do DNA está mais ativa que a metilação em todos os grupos devido ao maior nível de expressão das TETs em comparação com a expressão das DNMTs, sendo que, quanto maior o número de granulomas, menor a expressão de *TET3* e *DNMT1* em *Ebi3*^{-/-}I (p<0,05). A infecção por *S. mansoni* induz uma diminuição no conteúdo de metilação global do DNA. Os vermes adultos machos, recuperados do modelo C57BL/6 *Ebi3*^{-/-} apresentaram uma diminuição no conteúdo de metilação global do DNA comparando com o macho controle, bem como diminuição na expressão de *SmUSPs* 7, 22, 46 e 49, o que pode afetar o *turnover* da via ubiquitina-proteassoma e alterar o padrão de ubiquitinação nas histonas. Já na cepa LE-PZQ o *SmUSP15* foi o único gene *up* regulado em machos. Verificamos também que os miRNAs 190 e 125A possuem função sexo-específica em *S. mansoni*, o miR-190-3p foi o único encontrado no plasma de C57BL/6 *Ebi3*^{-/-}I. Os *lncRNA5* 6 e 7 foram detectados no plasma de C57BL/6 *Ebi3*^{-/-}. Os dados indicam uma modulação epigenética do hospedeiro mamífero no parasito e abrem perspectivas para a influência epigenética na interação parasito-hospedeiro.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*, epigenética, interação parasito-hospedeiro.

Abstract

The hypothesis of this work is that *Schistosoma mansoni* in response to the immune system of the mammalian host alters its epigenetic state and modulates the epigenetic state of the definitive host, and consequently the extent of hepatic granuloma. To investigate this hypothesis, infection in a murine model C57BL/6 *EBi3*^{-/-} was used and the specific objectives were outlined: (i) the investigation of parasitological effects; (ii) whether the parasite would modulate epigenetic mechanisms in the host; (iii) whether the host could affect the expression of genes related to the parasite's epigenetic mechanisms; (iv) to evaluate the expression of *S. mansoni* miRNAs and lncRNAs in the C57BL/6 *EBi3*^{-/-} model as well as the potential of these ncRNAs as biomarkers (v) to evaluate the expression of epigenetic-related genes in the resistant strain of *S. mansoni* LE to praziquantel (LE-PZQ). C57BL/6 WTC (wild control), WTI (wild infected), *EBi3*^{-/-}C (control knockout) and *EBi3*^{-/-}I (infected knockout) mice were all 55 days of infection, 100 cercariae. In experiments with *S. mansoni*, a pool of parasites recovered from WT mice (LE control), strain LE-PZQ and recovered from *EBi3*^{-/-} (LE from *EBi3*^{-/-}) were used. The results show that murine schistosomiasis in the C57BL/6 *EBi3*^{-/-} I model shows a decrease in liver damage, in the volume and number of granulomas and in the quantity of eggs in the feces in relation to that observed in the WTI group, (p <0.05). DNA demethylation is more active than methylation in all groups due to the higher level of expression of TETs compared to the expression of DNMTs, and the greater the number of granulomas, the lower the expression of *TET3* and *DNMT1* in *EBi3*^{-/-}I (p <0.05). *S. mansoni* infection induces a decrease in the overall methylation content of DNA. Adult male worms, recovered from the C57BL/6 *EBi3*^{-/-} model, showed a decrease in the overall DNA methylation content compared to the control male, as well as a decrease in the expression of *SmUSPs* 7, 22, 46 and 49, which can affect the turnover of the ubiquitin-proteasome pathway and alter the pattern of histone ubiquitination. In the LE-PZQ strain, *SmUSP15* was the only up regulated gene in males. We also found that miRNAs 190 and 125A have sex-specific function in *S. mansoni*, miR-190-3p was the only one found in the C57BL/6 *EBi3*^{-/-}I plasma. The *lncRNA5*, 6 and 7 were detected in the plasma of C57BL/6 *EBi3*^{-/-}. The data indicate an epigenetic modulation of the mammalian host in the parasite and open perspectives for the epigenetic influence on the parasite-host interaction.

Keywords: *Schistosoma mansoni*, epigenetics, host-parasite interaction.

Lista de Figuras

- Figura 1: Ciclo de vida de *Schistosoma mansoni* (Mcmanus *et al.*, 2018).....16**
- Figura 2: Mecanismos epigenéticos: Alterações na estrutura da cromatina ocasionadas por modificações pós-traducionais regulam a expressão gênica. LncRNAs podem associar a HDAC1 e outras proteínas formando o complexo NuRD de silenciamento. A metilação do DNA ocorre predominantemente no quinto átomo de carbono das citosinas. A metilação *de novo* ocorre por meio de DNMT3A e B e a manutenção nas fitas recém-sintetizadas é feita por DNMT1. A remoção ativa inclui proteínas TET1-3 de mamíferos. A demetilação passiva ocorre na ausência de DNMT1, enzimas envolvidas no reparo de DNA também podem remover o grupo metil. Adaptado - (Moran-Salvador e Mann; Ambrosi *et al.*, 2017).....22**
- Figura 3: Via de ubiquitinação. As proteínas com Lys (K) 48 cadeias ligadas são geralmente alvo de degradação pelo proteassoma 26S. Outros tipos de ligações Ub (mono- e poly-K63 e outros) podem resultar em degradação, K29 sinaliza para degradação lisossomal. A ubiquitinação da cauda de histonas geralmente está relacionada à repressão gênica e cromatina compactada, USP7, 15, 22, 46 e 44-49 deubiquitinam as histonas e participam da remodelagem da cromatina. Adaptado - (Darwin, 2009; Kowalski *et al.*, 2011; Cole *et al.*, 2015).25**
- Figura 4: Desenho esquemático citocina/receptor: IL12, IL23, IL27 e IL35. A figura mostra a composição das interleucinas da família IL12 e seus respectivos receptores além de mostrar quais apresentam predominantemente funções pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (Vignali e Kuchroo, 2012).31**
- Figura 5: Biogênese de miRNAs e modos de carreamento de miRNAs circulantes que são utilizados como biomarcadores (Roderburg e Luedde, 2014).34**
- Figura 6: Fluxograma dos experimentos realizados: delineamento experimental.....38**
- Figura 7: Gel representativo da extração de RNA total de *S. mansoni* fêmea e macho recuperado de WT e de amostras de fígado de camundongo *EBi3^{-/-}* não infectado. Podemos ver as bandas do RNA ribossômico desnaturado, foram utilizados 2µg de RNA total, no gel 1,2%, corado com brometo de etídeo.42**
- Figura 8: Gel representativo da extração de RNA total contendo miRNAs de amostras de fígado de camundongo *EBi3^{-/-}* não infectado e de *S. mansoni* LE macho e fêmea recuperado de WT. Podemos ver as bandas do RNA ribossômico desnaturado, foram utilizados 2µg de RNA no gel 1,2%, corado com brometo de etídeo.....49**
- Figura 9: Gel representativo da extração de RNA total contendo miRNAs de amostras de plasma de camundongo *EBi3^{-/-}* não infectado e infectado. Podemos ver as bandas do RNA ribossômico desnaturado, foram utilizados 2µg de RNA no gel 1,2%, corado com brometo de etídeo..... 53**
- Figura 10: Parâmetros parasitológicos de camundongos *EBi3^{-/-}* e WT infectados. A) Número de ovos recuperados do intestino de *EBi3^{-/-}* e WT infectados por digestão com KOH, Teste Mann-Whitney, p<0,01; B) Número de ovos recuperados do fígado de camundongos *EBi3^{-/-}* e WT infectados Teste T com correção de Welch, p<0,01; C) Número de ovos recuperados nas fezes de camundongos *EBi3^{-/-}* e WT infectados,**

- Teste Mann-Whitney, $p < 0,01$; D) Oviposição *in vitro* a partir de casais recuperados de *EBi3^{-/-}* e WT infectados, Teste Kruskal Wallis, pós-teste de Dunn, $p < 0,05$; (a: WTI-24H vs. WTI-48H; B: WTI-24H vs. *EBi3^{-/-}*-I-96H; c: *EBi3^{-/-}*-I-24H vs. *EBi3^{-/-}*-I-96H; D: *EBi3^{-/-}*-I-24H vs. *EBi3^{-/-}*-I-120h; e: WTI-48H vs. *EBi3^{-/-}*-I-96H; f: WTI-48H vs. WTI-120H; g: WTI-48H vs. *EBi3^{-/-}*-I-120H; h: *EBi3^{-/-}*-I-48H vs. *EBi3^{-/-}*-I-96H; i: *EBi3^{-/-}*-I-48H vs. WTI-120H; J: *EBi3^{-/-}*-I-48H vs. *EBi3^{-/-}*-I-120H; k: WTI-72H vs. *EBi3^{-/-}*-I-96H; L: WTI-72H vs. WTI-120H; m: WTI-72H vs. *EBi3^{-/-}*-I-120H; n: *EBi3^{-/-}*-I-72H vs. *EBi3^{-/-}*-I-96H; o: *EBi3^{-/-}*-I-72H vs. *EBi3^{-/-}*-I-120H; p: WTI-96H vs. *EBi3^{-/-}*-I-96H e q: WTI-96H vs. *EBi3^{-/-}*-I-120H) E) Número de casais recuperados de *EBi3^{-/-}* e WT infectados, Teste Mann-Whitney, $p < 0,01$; F) Número de parasitos recuperados de *EBi3^{-/-}* e WT infectados, Teste T, $p < 0,01$. GraphPad Prism 6. 59
- Figura 11: Análise histológica e morfométrica dos granulomas hepáticos. A) Número de granulomas encontrados em 20 campos no aumento de 20X em camundongos WT e *EBi3^{-/-}* infectados, teste Mann Whitney, $p < 0,05$ B) Volume dos granulomas encontrados em WT e *EBi3^{-/-}* infectados Teste T com correção de Welch, $p < 0,05$ GraphPad Prism 6. 60
- Figura 12: Imagens representativas das lâminas de fígado: A) WT controle, B) *EBi3^{-/-}* controle, C) WT infectado com granuloma, D) *EBi3^{-/-}* infectado com granuloma, E) Fusão de granuloma em WT infectado, F) Fusão de granuloma em *EBi3^{-/-}* infectado. 61
- Figura 13: Expressão relativa de *DNMT1*, *3A*, *3B*, *TET1*, *2* e *3* em camundongos C57BL/6 WT controle e infectado, C57BL/6 *EBi3^{-/-}* controle e infectado. *HPRT1* foi utilizado como gene calibrador, Kruskal Wallis, pós-teste de Dunn, $p < 0,05$; GraphPad Prism 6. Legenda: a: WTC vs. WTI; b: WTC vs. *EBi3^{-/-}*-C; c: WTC vs. *EBi3^{-/-}*-I; d: WTI vs. *EBi3^{-/-}*-C; e: WTI vs. *EBi3^{-/-}*-I e f: *EBi3^{-/-}*-C vs. *EBi3^{-/-}*-I. 63
- Figura 14: Comparação entre metilação e demetilação em A) WTC; B) WTI; C) *EBi3^{-/-}*-C e D) *EBi3^{-/-}*-I. *HPRT1* foi usado como gene calibrador, GraphPad Prism6 - Kruskal Wallis, pós-teste de Dunn, $p < 0,05$. Legenda: a: *DNMT1* vs. *DNMT3A*; b: *DNMT1* vs. *DNMT3B*; c: *DNMT1* vs. *TET1*; d: *DNMT1* vs. *TET2*; e: *DNMT1* vs. *TET3*; f: *DNMT3A* vs. *DNMT3B*; g: *DNMT3A* vs. *TET1*; h: *DNMT3A* vs. *TET2*; i: *DNMT3A* vs. *TET3*; j: *DNMT3B* vs. *TET1*; k: *DNMT3B* vs. *TET2*; L: *DNMT3B* vs. *TET3*; m: *TET1* vs. *TET2*; n: *TET1* vs. *TET3* e o: *TET2* vs. *TET3*. 64
- Figura 15: Correlação de Spearman entre a expressão de *DNMT1*, o volume médio dos granulomas e o número médio de granulomas dos grupos de camundongos infectados WTI (letra A e B) e *EBi3^{-/-}* (letra C e D). GraphPad Prism 6, $p < 0,05$. ..65
- Figura 16: Correlação de Spearman entre a expressão de *DNMT3A*, o volume médio dos granulomas e o número médio de granulomas dos grupos de camundongos infectados WTI (letra A e B) e *EBi3^{-/-}* (letra C e D). GraphPad Prism 6, $p < 0,05$. ..66
- Figura 17: Correlação de Spearman entre a expressão de *DNMT3B*, o volume médio dos granulomas e o número médio de granulomas dos grupos de camundongos infectados WTI (letra A e B) e *EBi3^{-/-}* (letra C e D). GraphPad Prism 6, $p < 0,05$. ..67

- Figura 18: Correlação de Spearman entre a expressão de *TET1*, o volume médio dos granulomas e o número médio de granulomas dos grupos de camundongos infectados WTI (letra A e B) e *EBi3^{-/-}*I (letra C e D). GraphPad Prism 6, $p < 0,05$. ..68
- Figura 19: Correlação de Spearman entre a expressão de *TET2*, o volume médio dos granulomas e o número médio de granulomas dos grupos de camundongos infectados WTI (letra A e B) e *EBi3^{-/-}*I (letra C e D). GraphPad Prism 6, $p < 0,05$. ..69
- Figura 20: Correlação de Spearman entre a expressão de *TET3*, o volume médio dos granulomas e o número médio de granulomas dos grupos de camundongos infectados WTI (letra A e B) e *EBi3^{-/-}*I (letra C e D). GraphPad Prism 6, $p < 0,05$. ..70
- Figura 21: Conteúdo de 5-mC% no DNA do fígado de C57BL/6 WTC, WTI, *EBi3^{-/-}*C e *EBi3^{-/-}*I. Foi feito Anova one-way, $p < 0,05$, pós-teste de Tukey..... 71
- Figura 22: Expressão dos miRNAs 31-3p, 31-5p, 122-3p e 122-5p em camundongo C57BL/6 WT e *EBi3^{-/-}* infectados com 100 cercárias. Foi utilizado snU6 como calibrador. Foi feito Kruskal-Wallis pós-teste de Dunn, $p < 0,05$72
- Figura 23: Matriz de correlação entre os parâmetros parasitológicos e as expressões gênicas em WTC, WTI, *EBi3^{-/-}*C e *EBi3^{-/-}*I. A figura mostra um resumo das correlações que apresentaram significância estatística usando Spearman, $p < 0,05$ 74
- Figura 24: Expressão relativa de *USPs*, *MBD*, *HDACs* e *GCN5* em *S. mansoni* cepa LE fêmea e macho recuperados de camundongo WT, fêmea e macho de *EBi3^{-/-}*I recuperados de animal C57BL/6 *EBi3^{-/-}*I, foi usado *EIF4E* como gene calibrador. Foi feito Anova One-Way pós-teste de Tukey, $p < 0,01$. σ Fêmea de *EBi3^{-/-}* vs. Macho de *EBi3^{-/-}*. π Macho - LE vs. Macho de *EBi3^{-/-}*. δ Macho - LE vs. Fêmea de *EBi3^{-/-}*. ∞ Fêmea - LE vs. Macho de *EBi3^{-/-}*. ε Fêmea - LE vs. Fêmea de *EBi3^{-/-}*. * Fêmea - LE vs. Macho - LE. 77
- Figura 25: Conteúdo de 5-mC% no DNA de *S. mansoni* recuperado de C57BL/6 WT, C57BL/6 *EBi3^{-/-}* e casais da cepa resistente ao praziquantel. Foi feito Kruskal Wallis, $p < 0,05$, pós-teste de Dunn. 78
- Figura 26: *Fold change* dos miRNAs 124-3p, 125A, 125-3p 190-3p e 190-5p de *S. mansoni* LE recuperado de camundongo C57BL/6 WT e *EBi3^{-/-}* infectados com 100 cercárias. Os experimentos foram feitos em triplicata de pool com no mínimo 50 parasitos por extração. Os grupos calibradores usados foram machos e fêmeas recuperados de camundongos WT, foi feito teste T, $p < 0,01$ 79
- Figura 27: Expressão relativa de lncRNAs de *S. mansoni* no fígado de camundongos C57BL/6 WTC, WTI, *EBi3^{-/-}*C e *EBi3^{-/-}*I por RT-qPCR. *HPRT 1* (*Mus musculus* (mmu)-hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase 1) foi o gene usado como calibrador. 81
- Figura 28: Curva de dissociação dos lncRNAs do plasma de camundongos C57BL/6 *EBi3^{-/-}*I e *EBi3^{-/-}*C: da esquerda para a direita em duplas estão o *lncRNA5* grupo *EBi3^{-/-}*I e *EBi3^{-/-}*C; *lncRNA6* grupo *EBi3^{-/-}*I e *EBi3^{-/-}*C; *lncRNA 7* grupo *EBi3^{-/-}*I e *EBi3^{-/-}*C. Cada cor representa uma réplica biológica..... 83
- Figura 29: Expressão relativa de *USPs*, *MBD*, *HDACs* e *GCN5* em *S. mansoni* cepa LE recuperada de camundongo WT e cepa LepZQ resistente ao praziquantel, foi usado

***EIF4E* como gene calibrador. Foi feito Anova One-Way pós-teste de Tukey, $p < 0,01$.
 σ Fêmea LePZQ vs. Macho LePZQ. π Macho - LE vs. Macho LePZQ. δ Macho -
LE vs. Fêmea LePZQ. ∞ Fêmea - LE vs. Macho LePZQ. ε Fêmea - LE vs. Fêmea
LePZQ. * Fêmea - LE vs. Macho - LE.....86**

Lista de Tabelas

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados na curva de eficiência.	43
Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados na expressão de miRNAs de fígado de camundongo	48
Tabela 3: Componentes utilizados na reação de transcrição reversa de RNA total incluindo miRNAs de <i>S. mansoni</i>	50
Tabela 4: Detecção de RNAs não codificantes no plasma de <i>EBi3^{-/-}C</i> e <i>EBi3^{-/-}I</i>	82
Tabela 5: Coeficiente da matriz de correlação de Spearman $p < 0,05$ – WTC.....	119
Tabela 6: p- valor da matriz de correlação de Spearman $p < 0,05$ – WTC	120
Tabela 7: Coeficiente da matriz de correlação de Spearman $p < 0,05$ – WTI.....	121
Tabela 8: p- valor da matriz de correlação de Spearman $p < 0,05$ – WTI.....	122
Tabela 9: Coeficiente da matriz de correlação de Spearman $p < 0,05$ – <i>EBi3^{-/-}C</i>	123
Tabela 10: p- valor da matriz de correlação de Spearman $p < 0,05$ – <i>EBi3^{-/-}C</i>	124
Tabela 11: Coeficiente da matriz de correlação de Spearman $p < 0,05$ – <i>EBi3^{-/-}I</i>	125
Tabela 12: p- valor da matriz de correlação de Spearman $p < 0,05$ – <i>EBi3^{-/-}I</i>	126

Lista de Abreviaturas

5-mC: 5 metil citosina

CBP: Creb binding protein

DNMT: DNA metil transferase

EBi3^{-/-}C: *Epstein-Barr virus induced 3* duplo nocaute controle

EBi3^{-/-}I: *Epstein-Barr virus induced 3* duplo nocaute infectado

EIF4E: fator de iniciação da tradução eucariótica 4E

GCN5: controle geral não reprimido 5

HAT: histona acetil transferase

HDAC: histona deacetilase

HPRT1: hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase 1

LE: cepa susceptível Luiz Evangelista

LE-PZQ: cepa resistente Luiz Evangelista

MBD: *metil binding CpG domain*

snoU6: small nucleolar U6

TET: *ten eleven translocation*

USP: protease específica de ubiquitina

WTC: *wild type* controle

WTI: *wild type* infectado

Sumário

1	Introdução.....	15
1.1	<i>Schistosoma mansoni</i> : biologia e epidemiologia.....	15
1.2	Interação parasito-hospedeiro.....	16
1.3	Epigenética em eucariotos e suas implicações.....	19
1.3.1	DNMTs – DNA metiltransferases.....	20
1.3.2	TETs- Ten Eleven Translocation (Demetilase).....	21
1.3.3	MBD – Metil CpG binding domain.....	21
1.3.4	Histona acetilases – HATs.....	23
1.3.5	Histona deacetilases – HDACS.....	23
1.3.6	USPs- Proteases específicas de ubiquitina.....	24
1.4	RNAs não codificantes: biogênese e epigenética em <i>Schistosoma</i>	26
1.4.1	MicroRNAs (miRNAs).....	26
1.4.2	RNAs longos não codificantes (Lnc RNAs): conceitos e identificação em <i>S. mansoni</i> 28	
1.5	O modelo murino de infecção experimental pelo <i>S. mansoni</i>	29
1.6	O modelo nocaute EBi3.....	30
1.7	Biomarcadores e epigenética.....	32
2	Justificativa, Relevância e Hipótese.....	35
3	Objetivos.....	36
3.1	Objetivo Geral.....	36
3.2	Objetivos específicos.....	36
4	Materiais e Métodos.....	37
4.1	Eutanásia dos camundongos: Obtenção dos fígados.....	37
4.2	Manutenção do ciclo de vida do <i>S. mansoni</i> e infecção experimental.....	37
4.3	Obtenção dos parasitos.....	38
4.3.1	Cultura <i>in vitro</i> de <i>S. mansoni</i>	38
4.4	Quantificação dos ovos retidos nas fezes e em órgãos do hospedeiro.....	39
4.5	Histologia e morfometria do fígado de C57BL/6 (WT) e C57BL/6 <i>EBi3^{-/-}</i> infectados e não infectados com <i>S. mansoni</i> LE.....	39
4.6	Extração de RNA total.....	40
4.6.1	Camundongos C57BL/6 (WT) e C57BL/6 <i>EBi3^{-/-}</i> infectados e não infectados.....	40

4.6.2	<i>S. mansoni</i> (macho e fêmea adultos)	41
4.7	Obtenção do cDNA a partir de fígado de camundongos C57BL/6 (WT) e C57BL/6 <i>Ebi3</i> ^{-/-} infectados e não infectados e de <i>S. mansoni</i> (macho e fêmea adultos)	42
4.8	Eficiência dos oligonucleotídeos	42
4.9	Expressão por qRT-PCR de genes envolvidos na epigenética em <i>S. mansoni</i> (macho e fêmea separados) e em fígado de camundongos C57BL/6 (WT) e C57BL/6 <i>Ebi3</i> ^{-/-} infectados e não infectados.....	45
4.10	Extração de RNA total incluindo pequenos RNAs a partir de fígado de camundongos C57BL/6 (WT) e C57BL/6 <i>Ebi3</i> ^{-/-} infectados e não infectados.....	46
4.11	Transcrição Reversa de miRNAs recuperados de fígado de camundongos C57BL/6 (WT) e C57BL/6 <i>Ebi3</i> ^{-/-} infectados com LE <i>S. mansoni</i> e não infectados.....	47
4.12	Expressão dos miRNAs de camundongos C57BL/6 (WT) e C57BL/6 <i>Ebi3</i> ^{-/-} infectados com LE <i>S. mansoni</i> e não infectados	47
4.13	Extração de RNA total de <i>S. mansoni</i> LE (macho e fêmea adulto) incluindo pequenos RNAs	48
4.14	Transcrição reversa de miRNAs recuperados de <i>S. mansoni</i> LE (macho e fêmea adulto) 50	
4.15	Expressão dos miRNAs de <i>S. mansoni</i> LE (macho e fêmea adulto) por qRT-PCR 50	
4.16	Extração de RNA total incluindo pequenos RNAs do sangue de camundongos C57BL/6 <i>Ebi3</i> ^{-/-} infectados e não infectados com a cepa LE <i>S. mansoni</i>	51
4.17	Avaliação do conteúdo de metilação do DNA (5-mC %).....	53
4.17.1	Extração de DNA genômico de fígado camundongos C57BL/6 (WT) e C57BL/6 <i>Ebi3</i> ^{-/-} infectados e não infectados com a cepa LE <i>S. mansoni</i>	53
4.17.2	Extração de DNA genômico de <i>S. mansoni</i>	54
4.17.3	Preparação da análise.....	55
4.18	Análise Estatística	55
5	Resultados.....	58
5.1	Avaliação parasitológica em camundongos C57BL/6 <i>Ebi3</i> ^{-/-} infectados por <i>S. mansoni</i>	58
5.1.1	Parâmetros parasitológicos	58
5.1.2	Avaliação da área e volume do granuloma esquistossomótico	60
5.2	<i>S. mansoni</i> modula mecanismos epigenéticos no hospedeiro?.....	61
5.2.1	Expressão de genes envolvidos na metilação de manutenção, metilação <i>de novo</i> e na demetilação de DNA em C57BL/6 WT e <i>Ebi3</i> ^{-/-} (fígado).....	61

5.2.2	Diferença entre metilação e demetilação entre os grupos WTC, WTI, <i>Ebi3</i> ^{-/-} C e <i>Ebi3</i> ^{-/-} I	63
5.2.3	Correlação entre a expressão de <i>DNMTs</i> e <i>TETs</i> e o volume ou número de granulomas	65
5.2.4	Avaliação do efeito do <i>S. mansoni</i> no conteúdo de metilação do DNA (5-mC%) em fígado de camundongo C57BL/6 WT e C57BL/6 <i>Ebi3</i> ^{-/-}	70
5.2.5	Expressão relativa dos miRNAs (fígado) em C57BL/6 WT e <i>Ebi3</i> ^{-/-} infectados e não infectados a partir de qRT-PCR	71
5.2.6	Matriz de correlação entre os parâmetros parasitológicos e as expressões gênicas em WTC, WTI, <i>Ebi3</i> ^{-/-} C e <i>Ebi3</i> ^{-/-} I	72
5.3	O hospedeiro afeta a expressão de genes relacionados a mecanismos epigenéticos do parasito?	74
5.3.1	Expressão de proteases específicas de ubiquitina (<i>USPs</i>) e genes relacionados a alterações epigenéticas em <i>S. mansoni</i> (macho e fêmea LE) recuperado de WTI e <i>Ebi3</i> ^{-/-} I	74
5.3.2	Análise do conteúdo de metilação de DNA (5-mC) em <i>S. mansoni</i> recuperado de camundongos C57BL/6 WT infectado e C57BL/6 <i>Ebi3</i> ^{-/-} infectado	77
5.3.3	Expressão de miRNAs de <i>S. mansoni</i> (macho e fêmea adulto) recuperado de camundongo C57BL/6 WT e <i>Ebi3</i> ^{-/-} por qRT-PCR	78
5.3.4	Expressão de RNAs longos não codificantes de <i>S. mansoni</i> em fígado de C57BL/6 WTI e <i>Ebi3</i> ^{-/-} I por qRT-PCR	80
5.3.5	Detecção de lncRNAs e miRNAs de <i>S. mansoni</i> no sangue de camundongos C57BL/6 <i>Ebi3</i> ^{-/-} controle e infectados	82
5.4	Expressão de genes relacionados a alterações epigenéticas e proteases específicas de ubiquitina (<i>USPs</i>) em <i>S. mansoni</i> (macho e fêmea adulto) resistente ao Praziquantel	83
6	Discussão	87
7	Conclusões	102
8	Perspectivas	103
9	Referências	104
10	Anexos	119

1 Introdução

1.1 *Schistosoma mansoni*: biologia e epidemiologia

A esquistossomose é uma doença que atinge aproximadamente 250 milhões de pessoas, a maioria dos infectados vive na África (Mcmanus *et al.*, 2018). Em 2012 no Brasil 26667 pessoas foram diagnosticadas como portadores da esquistossomose sendo que, em 2017, 1,5 milhões de pessoas viviam em áreas de risco, estas áreas estão localizadas na região nordeste e sudeste (Saúde, 2017). *S. mansoni* possui um ciclo de vida heteroxênico, com uma fase de reprodução assexuada em caramujos do gênero *Biomphalaria* e uma fase de reprodução sexuada em humanos e roedores. A fêmea põe cerca de 300 ovos por dia e aproximadamente 50% desses ovos são liberados, os ovos restantes permanecem aderidos aos órgãos do hospedeiro definitivo, principalmente no fígado, induzindo respostas inflamatórias hepáticas (Neves, 1992). Os ovos são liberados nas fezes, os miracídios eclodem devido a incitações ambientais de luz, pH e temperatura. Na eclosão, a forma infectante do caramujo, o miracídio, é liberada e nada orientada por quimiotaxia (Wilson *et al.*, 1978). Os miracídios são ciliados, o que facilita a penetração no hospedeiro intermediário, eles possuem mucinas polimórficas responsáveis pelo sucesso da infecção no caramujo, que são glicoproteínas com domínio N-terminal e repetições *in tandem*, essas proteínas se ligam a proteínas do sistema imune do caramujo, as proteínas relacionadas ao fibrinogênio (FREPS) (Perrin *et al.*, 2013). Após a penetração, o miracídio se diferencia em esporocisto-mãe que dá origem a esporocistos-filhos por reprodução assexuada. As cercárias-macho saem do caramujo na água seguindo orientação de estímulos químicos oriundos do suor e outros produtos liberados pela pele do hospedeiro definitivo e as cercárias fêmeas seguem preferencialmente estímulos de luz e mecânicos para penetrarem na pele do hospedeiro definitivo se diferenciando em esquistossômulos (McKerrow e Salter, 2002). O transcrito de *S. mansoni* mostra que machos e fêmeas produzem repertórios diferentes de proteases responsáveis pela invasão no hospedeiro (Picard *et al.*, 2016). Os esquistossômulos chegam ao sistema circulatório, passam pelos pulmões, se diferenciam em vermes adultos que acasalam no sistema porta-hepático, como podemos ver na figura 1 (Wilson *et al.*, 1978). Machos e fêmeas de *S. mansoni* apresentam conjuntos diferentes de antígenos de tegumento, receptores e inibidores de proteases, fêmeas apresentam mais elementos genéticos móveis de origem intrônica principalmente, que podem estar envolvidos na remodelagem da cromatina que ocorre na

mudança de esquistossômulo para verme adulto ou podem desempenhar funções estruturais nos cromossomos (Neves, 1992; Picard *et al.*, 2016).

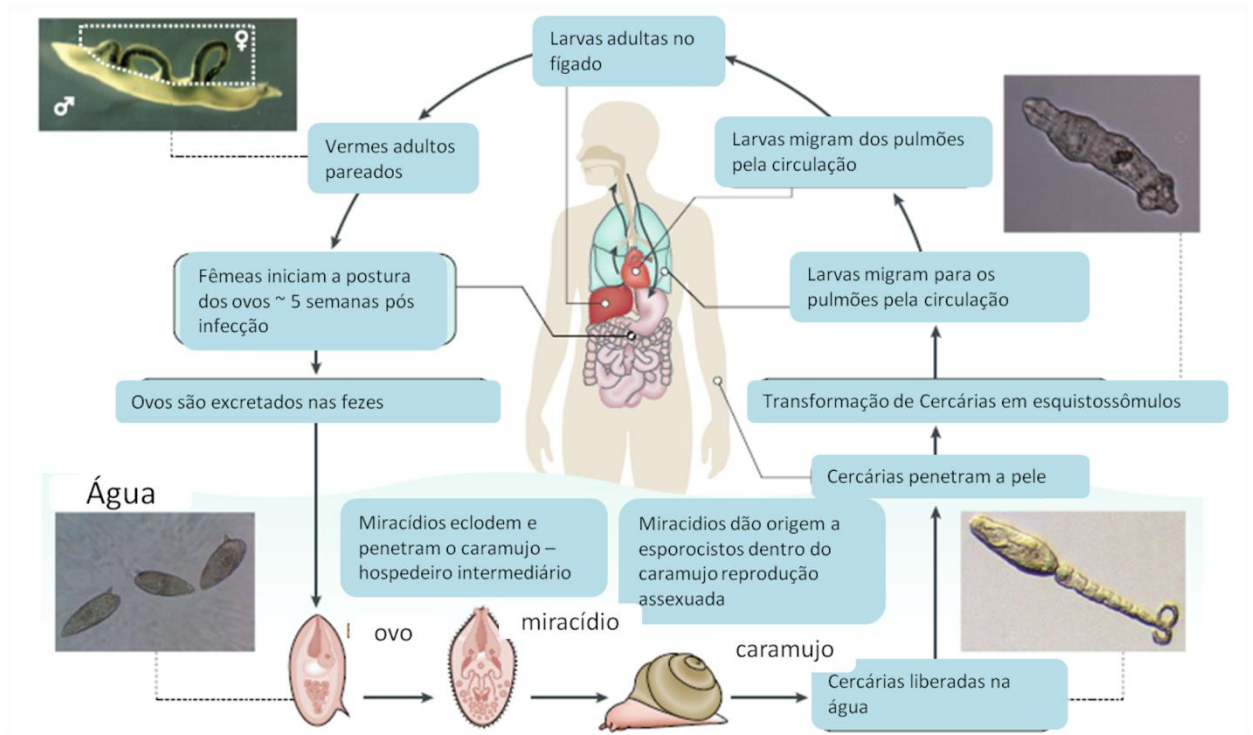


Figura 1: Ciclo de vida de *Schistosoma mansoni* (Mcmanus *et al.*, 2018).

1.2 Interação parasito-hospedeiro

Após a infecção com *S. mansoni* em camundongos, ocorre polarização da resposta imune Th1 mediada pela produção de IL 12 por células acessórias, ocorre secreção de níveis elevados de INF γ e IL 2 até as cinco primeiras semanas de infecção e é principalmente contra os antígenos do verme. O fornecimento inicial de IL 12 é resultado da estimulação de células dendríticas. A mudança de Th1 para Th2 é importante para evitar a inflamação hepática severa seguida de necrose e morte do hospedeiro (Stadecker *et al.*, 2004).

Antígenos solúveis dos ovos, SEA, inibem a ativação de células dendríticas, a secreção de IL 12 e a polarização em Th1, sendo que após o início da postura dos ovos ocorre a polarização em Th2. SEA induz a produção de IL 4 que por sua vez inibe a ativação de macrófagos via INF γ e inibindo assim a secreção de NO e outras citocinas importantes em Th1, e induz a resposta Th2. IL 4, 5, 10 e 13 são as principais interleucinas produzidas durante a resposta imune Th2 na esquistossomose murina, sendo que IL 10 desempenha um

papel regulatório. Os ovos secretam moléculas hepatotóxicas que induzem a formação do granuloma, que é um agregado de linfócitos, macrófagos e eosinófilos e uma crescente matriz extracelular fibrosa induzida por células esteladas hepáticas. A estratégia do parasito é direcionar a resposta imune do hospedeiro definitivo para os ovos e assim completar seu ciclo de vida, isso pode ser evidenciado pelo fato de que a quantidade de ovos nas fezes é comparável à quantidade de ovos agregados aos órgãos do hospedeiro (Pearce *et al.*, 2004)

Em áreas endêmicas já é possível observar a presença de cepas de *S. mansoni* resistentes à droga, em laboratório também é possível observar o desenvolvimento da resistência. Para elucidar possíveis mecanismos de resistência ao praziquantel existem estudos que utilizam cepas Luiz Evangelista (LE) que foram induzidas a resistência em laboratório (LE-PZQ). A indução consiste em administrar concentrações crescentes da droga a caramujos infectados com *S. mansoni*. As cercárias provenientes desses caramujos são então usadas para infectar camundongos, que são também submetidos ao tratamento com concentrações crescentes de praziquantel (Couto *et al.*, 2011; Pinto-Almeida *et al.*, 2016).

Publicações anteriores do nosso grupo identificaram *Major Vault proteins* em *S. mansoni*, esse complexo de proteínas está relacionado à resistência multidrogas em diversos parasitos. Foi observado nesse estudo que a expressão dessas proteínas é maior em machos que fêmeas e que é maior em cepas resistentes que em cepas susceptíveis, sugerindo um possível envolvimento dessas proteínas no desenvolvimento da resistência em LE-PZQ (Reis *et al.*, 2014).

A esquistossomose persiste a milhares de anos, o sucesso adaptativo do parasito do gênero *Schistosoma* está relacionado a mecanismos de regulação da replicação, transcrição e tradução. O parasito enfrenta condições variadas de estresse principalmente quando troca de ambiente, pois possui formas larvais aquáticas de vida livre que possuem respiração aeróbica e estão condicionadas a estresse químico, osmótico, térmico e que posteriormente terão que se instalar em hospedeiros definitivo ou intermediário e nesse novo ambiente enfrentar o sistema de defesa além de modificar seu metabolismo para anaeróbio.

No caso de *S. mansoni*, quando os miracídios encontram caramujos eles expressam diferentes combinações dependendo da susceptibilidade do caramujo, de uma família de genes referentes a mucinas, as *SmPoMucs*, essas proteínas são secretadas pela glândula apical e têm função de neutralizar as proteínas do sistema de defesa do caramujo, as FREPs, essas proteínas podem ser consideradas biomarcadores moleculares e são expressas somente na fase de infecção do hospedeiro intermediário, em outras fases, por mecanismos epigenéticos de

silenciamento gênico, elas se encontram heterocromatizadas (Perrin *et al.*, 2013). A regulação epigenética da invasão por *S. mansoni* pode ser detectada pelo repertório polimórfico que *SmPoMucs* exhibe, e essa regulação ocorre por diferenças na metilação e acetilação de histonas, principalmente H3K9 localizada próximo a região promotora desses genes, vale ressaltar que há pouca diferença na sequência de nucleotídeos da região promotora e da região codificante desses genes sugerindo uma regulação majoritariamente epigenética (Fneich *et al.*, 2016).

Queiroz *et al.* (2017) verificou que *Biomphalaria glabrata* expressa os genes envolvidos na biogênese e processamento de miRNAs e piRNAs, Drosha, Tudor, Argonauta, Exportina 5, etc, diferencialmente durante o desenvolvimento do caramujo e também durante a infecção por *S. mansoni*, sendo que durante a infecção esses genes encontram-se com baixos níveis de expressão. Os autores reportam que os baixos níveis da maquinaria de regulação gênica de mi e piRNAs estejam envolvidos na resistência e susceptibilidade do caramujo a infecção por *S. mansoni*.

Cercárias macho e cercárias fêmeas expressam proteases importantes para a penetração, essas enzimas são estágio dependente e a transcrição é provavelmente ativada por mecanismos epigenéticos de demetilação de DNA e ou acetilação de H3K9 (Roquis *et al.*, 2015). Ensaio de imunoprecipitação da cromatina associado ao sequenciamento das histonas de *S. mansoni* (ChIP-Seq) indicam que cercárias possuem baixo ou nenhum nível de transcrição, pois foram detectadas muitas marcas de repressão H3K27me3, comuns em heterocromatina facultativa, sendo assim os transcritos necessários à sobrevivência do parasito seriam sintetizados nos estágios anteriores e seriam suficientes até a infecção do hospedeiro definitivo, pois o período de permanência no estágio de cercária é curto (Picard *et al.*, 2016). Outro estudo abordou somente a metilação nas histonas de *S. mansoni*, nesse estudo os autores observaram que existe diferença de proporção e distribuição das marcas epigenéticas entre os estágios de miracídios, esporocistos, cercárias, esquistossômulos e adultos. Em miracídios, esporocistos e esquistossômulos eles observaram uma proporção bem maior de H3K4me3 (locais transcricionalmente ativos), em cercárias havia maior proporção de marcas bivalentes H3K27me3 & H3K4me3 (comum em células embriogênicas indica um estado intermediário onde será ativado ou inativado na sequência), adultos apresentaram proporções similares de H3K4me3, H3K27me3 (heterocromatina facultativa) e H3K27me3 & H3K4me3 em locais de início de transcrição. Isso pode indicar mecanismos de regulação que desencadeiam o processo de mudança de estágio (Roquis *et al.*, 2018).

O parasito adulto possui mecanismos de regulação para reprodução, formação do tegumento e produção de esteroides que não estão presentes nos outros estágios, existe uma diminuição acentuada de H3K27me3 devido à necessidade de síntese de novos transcritos para a instalação no hospedeiro definitivo (Roquis *et al.*, 2015). A acetilação de histonas é um mecanismo importante para a expressão de proteínas do ovo e amadurecimento dos ovários em *S. mansoni*, a inibição de HATs acarreta má formação dos órgãos reprodutores e ovos frágeis. Em *S. japonicum* miRNAs miR31 e Bantam estão diretamente ligados ao desenvolvimento saudável dos ovários, a supressão desses miRNAs ocasiona o surgimento de vacúolos nos ovários e alterações teciduais (Carneiro *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2016).

Existem muitos dados sobre as enzimas envolvidas nas modificações de histonas de *Schistosoma*, dados de estrutura, inibidores, possíveis fármacos, porém pouco é conhecido dos mecanismos de metilação de DNA em *Schistosoma*. Somente uma enzima DNA metil transferase, a *SmDNMT2*, é conhecida no genoma de *Schistosoma* e existem contradições sobre a participação dessa enzima na metilação *de novo* do genoma de *Schistosoma*. Existem afirmações sobre a atividade dessa enzima em metilação de RNAt e possível perda de função de metilação *de novo* e existem, em contrapartida, dados mostram que pode haver metilação do genoma de *Schistosoma* em CpG e CpA (Geyer *et al.*, 2011; Raddatz *et al.*, 2013).

1.3 Epigenética em eucariotos e suas implicações

A epigenética compreende as alterações na cromatina que não envolve alterações na sequência de nucleotídeos. Essas alterações são acionadas por fatores ambientais, como alimentação, interação social, exercícios físicos, contágio de doenças, idade, dentre outros. Dentre as alterações epigenéticas podemos citar modificações na porção N-terminal da cauda de histonas (acetilação, deacetilação, ubiquitinação, deubiquitinação, metilação, demetilação, dentre outras), modificações no DNA, como metilação e demetilação de citosinas, regulação por meio de microRNAs e RNAs longos não codificantes (Dupont *et al.*, 2009; Handy *et al.*, 2011).

Essas alterações epigenéticas são essenciais para o desenvolvimento normal, pois são responsáveis pela inativação do cromossomo X em fêmeas e silenciamento de genes gameta-específico. São importantes na regulação da expressão gênica, pois a metilação de CpG está relacionada a repressão gênica e modificações de histonas podem interferir no condensamento/descondensamento da cromatina que faz com que o DNA esteja mais ou

menos acessível a RNA Polimerase II. São ainda fundamentais na estabilidade genômica, pois silenciam elementos repetitivos e transposons (Dupont *et al.*, 2009; Handy *et al.*, 2011).

A acetilação neutraliza a carga positiva das histonas diminuindo assim a interação do DNA com as histonas, já a metilação ocorre na cadeia lateral de lisinas e argininas da cauda das histonas H3 e H4 e causando repressão quando ocorre em K e ativação em R, desse modo ocorre o recrutamento de proteínas efetoras que se ligam a fatores transcricionais ou repressivos. A fosforilação de histonas está relacionada à mitose, apoptose e reparo de DNA, a fosforilação pode ocorrer nos resíduos de S e T. A monoubiquitinação pode ocorrer nos resíduos de K das histonas H2A, H2B e H3 (Bach Svitlana e Hegde Ashok, 2016).

Existem marcas epigenéticas que estão associadas a diferentes estados de empacotamento do DNA, repressão/ativação, H3K9ac (histona H3 acetilada na lisina 9) é uma marca típica de eucromatina, comum em promotores de genes constitutivos e ativadores transcricionais (Nishida *et al.*, 2006). H3K9me3 (histona H3 trimetilada na lisina 9) é uma marca de heterocromatina constitutiva presente em regiões teloméricas. H3K27me3 é uma marca responsável por reprimir genes, indica regiões de heterocromatina facultativa (Binda *et al.*, 2010).

1.3.1 DNMTs – DNA metiltransferases

Em mamíferos existem três tipos principais de DNA metiltransferases que adicionam o grupo metil no quinto carbono de citosinas (5-mC), a metilação de CpG bloqueia a ligação de fatores de transcrição por impedimento estérico. A porção N-terminal das DNMTs possui domínios regulatórios, já a porção C-terminal possui o domínio catalítico metiltransferase. A DNMT1 é responsável pela manutenção dos padrões de metilação, possui domínios de ancoragem na forquilha de replicação e domínio com afinidade por substratos hemimetilados em sua porção N-terminal. UHRF1 é uma proteína que faz parte do processo de metilação do DNA, ela atua se ligando ao DNA hemimetilado e recruta DNMT1 para manutenção dos padrões de metilação, figura 2 (Ambrosi *et al.*, 2017; Edwards *et al.*, 2017).

DNMT 3A e B catalisam a metilação *de novo*, em que novos padrões são criados em resposta a estímulos. DNMT3B possui um parálogo denominado DNMT3C que é responsável por metilar retrotransposons em células germinativas masculinas. DNMT3L é um membro que possui o domínio catalítico metiltransferase inativo, mas atua aumentando a atividade e

especificidade de outras *de novo* DNMTs quando interage com elas, ocorre também regulando a metilação de gametas (Ambrosi *et al.*, 2017; Edwards *et al.*, 2017).

S. mansoni possui apenas DNMT2, há controvérsias sobre a atuação dessa enzima na metilação *de novo* de DNA. Raddatz *et al.* (2013) afirma que esta enzima é uma metiltransferase primitiva que não possui capacidade de metilar DNA e atua na metilação de RNA transportador. Nesse mesmo estudo os autores detectaram níveis de metilação muito baixos que consideraram ruído da técnica que foi realizada em adultos de *S. mansoni* por sequenciamento com bissulfito. Geyer *et al.* (2011) afirma que o genoma de *S. mansoni* é metilado e que a inibição da DNMT2 culmina na permanência dos ovos em estágio imaturo.

1.3.2 TETs- Ten Eleven Translocation (Demetilase)

A demetilação de 5mC-DNA ocorre formando primeiramente 5 hidroximetilcitosina (5hmC), e na sequência 5 formilcitosina (5fC), 5 carboxicitosina (5caC) e depois ocorre o retorno a citosina usual. A demetilação ocorre por oxidação induzida por TETs e também ocorre durante os mecanismos de reparo de DNA, onde a metilação é perdida. TET2 tem atividade de oxidação maior que TET1, e ambas as enzimas possuem menos afinidade por 5hmC do que por 5mC, existem moléculas capazes de aumentar a capacidade das TET de oxidar 5hmC como a vitamina C, figura 2 (Hu, L. *et al.*, 2015).

Até o momento não foram identificados genes com função de demetilação de DNA em *S. mansoni*, visto que, o uso de sequências ortólogas de TETs de *Drosophila* e *Caenorhabditis elegans* não encontram sequências nos bancos de *S. mansoni*.

1.3.3 MBD – Metil CpG binding domain

MBD é uma proteína que se liga em citosinas metiladas, sua ligação gera um impedimento estérico a ligação de fatores de transcrição, essa proteína faz parte da maquinaria de repressão celular. No genoma, ocorre frequentemente a deaminação de citosinas metiladas, que se tornam timinas, esse processo causa a diminuição de CpG durante a evolução. As proteínas MBD tem preferência por regiões que apresentam grande concentração de CpG metilado. Quando ilhas de CpG (CGI) estão associadas a regiões transcricionalmente ativas elas não estão metiladas, para evitar assim a deaminação nessas regiões tão importantes. Em alguns casos quando essas ilhas estão metiladas elas se

encontram associadas à MBDs que protegem as citosinas da deaminação em timinas (Ambrosi *et al.*, 2017). Em *S. mansoni* o silenciamento de MBD por siRNA culmina na postura de ovos anormais pela fêmea, além de causar diminuição na quantidade de ovos produzidos. MBD está expressa tanto em células somáticas como em germinativas (Geyer *et al.*, 2018).

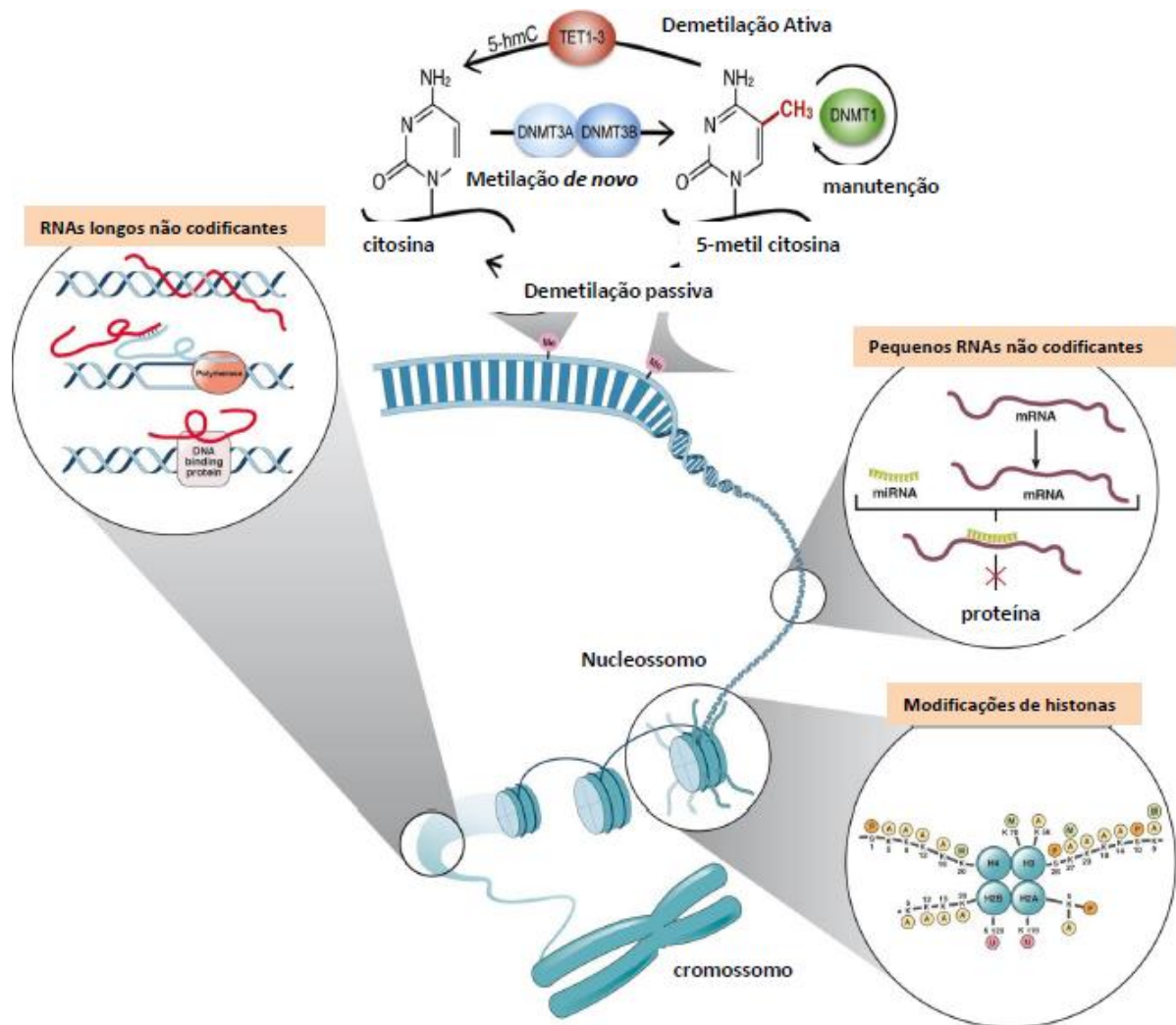


Figura 2: Mecanismos epigenéticos: Alterações na estrutura da cromatina ocasionadas por modificações pós-traducionais regulam a expressão gênica. LncRNAs podem associar a HDAC1 e outras proteínas formando o complexo NuRD de silenciamento. A metilação do DNA ocorre predominantemente no quinto átomo de carbono das citosinas. A metilação *de novo* ocorre por meio de DNMT3A e B e a manutenção nas fitas recém-sintetizadas é feita por DNMT1. A remoção ativa inclui proteínas TET1-3 de mamíferos. A demetilação passiva ocorre na ausência de DNMT1, enzimas envolvidas no reparo de DNA também podem remover o grupo metil. Adaptado - (Moran-Salvador e Mann; Ambrosi *et al.*, 2017).

1.3.4 Histona acetilases – HATs

CBP (*Creb binding protein*) e p300 são HATs presentes em mamíferos, em *S. mansoni* existem os ortólogos *SmCBP1* e *SmCBP2*, sendo que o primeiro é mais conservado e menos expresso que o segundo em relação a mamíferos, essas enzimas acetilam resíduos de lisina da cauda N-terminal das histonas. Em *S. mansoni* esses genes possuem expressão maior no estágio de miracídio e são parálogos (Bertin *et al.*, 2006).

A HAT GCN5 (Controle Geral Não reprimido) acetila resíduos de lisina da cauda N-terminal de histonas, *S. mansoni* possui ortólogo desse gene, que apresenta domínio HAT e bromodomínio, que são conservados em ortólogos de *Homo sapiens*, leveduras, dentre outros. *SmGCN5* possui um motivo de interação com receptores nucleares, foi detectado que esse gene possui altos níveis de expressão em todos os estágios do ciclo de vida de *S. mansoni* (Maciel *et al.*, 2004).

1.3.5 Histona deacetilases – HDACS

S. mansoni possui HDAC1, 3 e 8, esta enzima remove o grupo acetil das histonas H3. HDAC8 tem sido a principal representante proposta como alvo de drogas por que possui altos níveis de expressão durante todos os estágios do ciclo de vida do parasito. Quando as *SmHDACs* foram identificadas em *S. mansoni* Oger *et al.* (2008) verificaram que haviam seis inserções na sequência de aminoácidos que variavam no número (4-17) em *SmHDAC8*, essas inserções são características de *S. mansoni*, pois não estavam presentes nas outras espécies avaliadas por eles, indicando potencial alvo para drogas. Eles verificaram também que essas inserções se projetavam para foram do sítio catalítico e estavam envolvidas com interações externas (Oger *et al.*, 2008).

Tricostatina A (TSA) é um inibidor de histona deacetilase a administração desse inibidor causa diminuição de ovos recuperados nas fezes, o tratamento de esquistossômulos com TSA aumenta a proporção de H3K14ac e apresentam 54% de diferença na expressão gênica por *microarray*, em 48h um quarto dos genes estava *up* regulado. Após 24h de tratamento com TSA ocorreram diferenças na expressão de genes relacionados a reparo de DNA, recombinação e replicação e após 48h ocorriam diferenças na expressão de genes relacionados à motilidade dos parasitos e controle da quantidade de espécies reativas de oxigênio. Promotores que apresentavam H3K4me3 sofrem alterações com a administração de

TSA, promotores que não apresentavam essas modificações não sofriam alterações. Quando o TSA é administrado juntamente com inibidor de histona metiltransferase (EZH2i) que insere a marca H3K27me3 ocorre um aumento expressivo na mortalidade dos parasitos, pois a hiperacetilação de H4 pareceu estar correlacionada com aumento de expressão de caspases 3 e 7. A administração desses inibidores causou a princípio aumento na expressão gênica, e resultou em hiperacetilação das histonas (Anderson *et al.*, 2017).

1.3.6 USPs- Proteases específicas de ubiquitina

A deubiquitinação de substratos compete com a ubiquitinação e pode reverter o destino dos substratos e reciclar cadeias de conjugados poliubiquitinados. A posição da lisina a ser ubiquitinada está diretamente relacionada ao tipo de sinalização gerada, a poliubiquitinação de K48 e 63 estão relacionadas a degradação proteossomal, K11 sinaliza para degradação no retículo endoplasmático, K29 sinaliza para degradação lisossomal, K6 inibe degradação proteossomal, K120 e 119 sinalizam modificações da cromatina em H2B e H2A respectivamente (Darwin, 2009). Neste trabalho a expressão das *USPs* 7, 15, 22, 46 e 49 que tem por alvo histonas foi analisada em *S. mansoni* devido a sua potencial função epigenética, figura 3.

Pereira *et al.* (2015) identificaram 17 ortólogos de USPs em *S. mansoni*, por homologia com 56 USPs presentes em *H. sapiens*, foi detectado que a expressão dessas USPs é diferencial em estágios de ovo, cercaria, esquistossômulos e vermes adultos, refletindo em um *turnover* de proteínas estágio-específico devido as diferentes formas de degradação que são sinalizadas pela ubiquitinação de lisinas e também em regulação transcricional divergente nos estágios, visto que muitas USPs têm histonas como alvo em comum.

AUSP7 é a mais bem descrita, ela participa de vários processos celulares, possui um domínio ICPO que é responsável pelo deslocamento do núcleo para o citoplasma, ativa a transcrição gênica por deubiquitar histonas H2B. Esta enzima também deubiquitina substratos poliubiquitinados marcados para degradação pelo proteassoma, aumentando a meia vida desses substratos proteicos (Hagglund *et al.*, 2002; De Bie *et al.*, 2010). A ubiquitinação de proteínas pode alterar sua sublocalização, USP7 deubiquitina PTEN e Foxo, fazendo com que essas proteínas desloquem do núcleo para o citoplasma, diminuindo o potencial apoptótico da célula, a apoptose também é diminuída pela ação da USP7 quando ela se liga a

p53 ocasionando sua estabilização (Li *et al.*, 2002; Van Der Horst *et al.*, 2006; Trotman *et al.*, 2007).

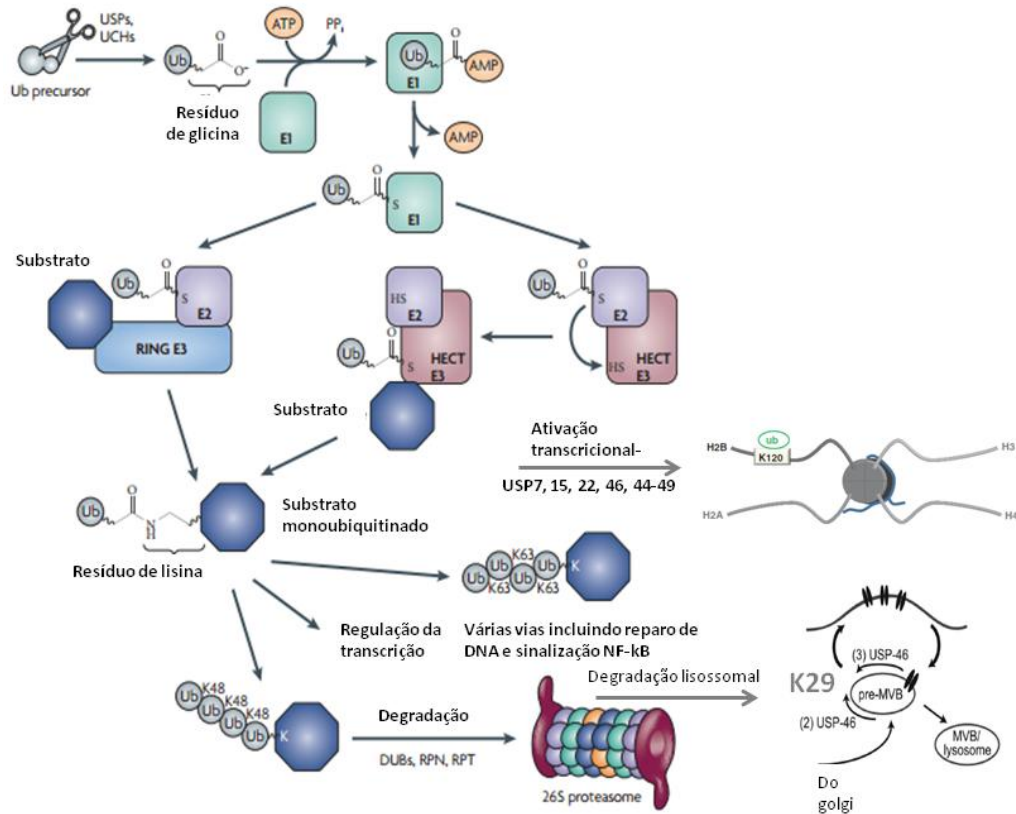


Figura 3: Via de ubiquitinação. As proteínas com Lys (K) 48 cadeias ligadas são geralmente alvo de degradação pelo proteossoma 26S. Outros tipos de ligações Ub (mono- e poly-K63 e outros) podem resultar em degradação, K29 sinaliza para degradação lisossomal. A ubiquitinação da cauda de histonas geralmente está relacionada à repressão gênica e cromatina compactada, USP7, 15, 22, 46 e 44-49 deubiquitinam as histonas e participam da remodelagem da cromatina. Adaptado - (Darwin, 2009; Kowalski *et al.*, 2011; Cole *et al.*, 2015).

A USP15 possui domínio DUSP que é responsável pela interação proteína-proteína e reconhecimento do substrato, apresenta também o domínio UBL que reconhece a cadeia de ubiquitina e possui a capacidade de se ligar a ela (Faesen *et al.*, 2012). Uma das principais funções conhecidas da USP15 relacionadas com *S. mansoni* é a de deubiquitinar receptores TGFβ a fim de evitar a degradação e também de deubiquitinar R-Smads, que deubiquitinadas se deslocam para o núcleo e podem funcionar como fatores de transcrição de vários genes da via do TGFβ (J a Eichhorn *et al.*, 2012). A inibição da USP15 pode atenuar os efeitos celulares causados na doença de Parkinson, em que ocorre mutação em parquinas, que são E3

ligases que ubiquitinam mitocôndrias despolarizadas sinalizando-as para a degradação e mitofagia (Cornelissen *et al.*, 2014).

A USP22 participa do complexo SAGA de ativação transcricional, dentre as proteínas presentes nesse complexo podemos destacar USP22 e HATS, a USP atua promovendo a deubiquitinação de histonas H2B e as HATs atuam nas regiões com a marca H3K4me3 próximas a início de transcrição. A deubiquitinação culmina em recrutamento de quinase C-terminal, fosforilação da RNA polimerase II e início da transcrição (Wyce *et al.*, 2007).

A USP46 é amplamente expressa no sistema nervoso, faringe, músculo da parede do corpo, intestino, músculo da vulva, principalmente nas regiões da cabeça e neurônios ventrais. Esta enzima participa da reciclagem de receptores glutamatérgicos, que ubiquitinados seriam degradados via lisossomo, a deubiquitinação via USP46 resulta em retorno do receptor para a superfície celular (Kowalski *et al.*, 2011). PHLPP é uma fosfatase que regula negativamente vias de sinalização ativada por cinases como Akt, o aumento de PHLPP está relacionado à diminuição da proliferação celular em vários tipos de câncer, pois a proliferação é dependente de fosforilação. USP46 deubiquitina PHLPP evitando a degradação e atuando como supressor tumoral (Li *et al.*, 2013).

A USP44 e 49 são parálogos, sendo que USP44 tem por alvo histonas H2A, a deubiquitinação de K15 ou K13 por USP44 está relacionada com vias de reparo de DNA, já a deubiquitinação de K119 está relacionada com ativação transcricional, que é um sítio mais comum de atuação. A USP 49 está associada com deubiquitinação de histonas H2B na K120, atuando como ativador transcricional, quando associada SUG1 e RVBL1, a USP49 promove pré-processamento de RNAm, remoção de íntrons (Zhang, Z. *et al.*, 2013).

1.4 RNAs não codificantes: biogênese e epigenética em *Schistosoma*

1.4.1 MicroRNAs (miRNAs)

S. mansoni possui sete pares de cromossomos autossômicos e dois sexuais, sendo ZZ macho e ZW a fêmea. Grande parte do genoma de *S. mansoni* é composta por regiões repetitivas e não codificantes, mas que podem desempenhar função de regulação gênica, o genoma possui 363 megabases (Cosseau *et al.*, 2017). Muitos miRNAs estão presentes nos cromossomos sexuais Z (Picard *et al.*, 2016).

Os miRNAs são RNAs que possuem aproximadamente 22 nucleotídeos e podem ser classificados com intergênicos, em regiões entre éxons ou intrônicos se forem originados de introns localizados dentro de regiões codificantes de proteínas, tanto os intrônicos como os intergênicos podem estar organizados em clusters. Os miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II ou III, o pri-miRNA gerado é processado pela Drosha, formando um pré-miRNA em estrutura de grampo que é transportado para o citoplasma por exportinas, onde é processado por uma enzima Dicer, gerando uma molécula de dupla-fita que interage com o complexo RISC (Complexo de Silenciamento por Interferência por RNA). O complexo RISC é composto por proteína Argonauta, Tudor e FMR-1 que seleciona a fita funcional 3p ou 5p (podendo ser ambas), após essa etapa o miRNA maduro de fita simples está pronto para ligação ao seu RNAm alvo. Os miRNAs regulam a expressão formando moléculas híbridas com seus alvos inibindo a tradução ou conduzindo a degradação (Han *et al.*, 2004).

Marco *et al.* (2013) analisaram o transcrito de miRNAs de *S. mansoni* adultos por contagem e sequenciamento de *reads*, eles identificaram 112 miRNAs em *S. mansoni*, 92 deles tinham ortólogos, sendo que destes, 3 eram específicos de platelmintos, 13 específicos de protostômios, 10 presentes no reino animal. Desses miRNAs identificados 84 não apresentavam similaridade com nenhum outro miRNA e 12 eram *Schistosoma* específicos. Nesse trabalho os autores verificaram que alguns miRNAs estavam diferencialmente expressos em machos (mir-1b, mir-61 e mir-281) e fêmeas (mir-8447; mir-2f; mir-8437; mir-31; mir-2c; mir-2d; mir-755; bantam; mir-71b e mir-36b).

Em *Schistosoma japonicum* estudos mostraram que miR-31 e bantam atuam reduzindo células do parênquima do ovário e oócitos em fêmeas, sendo que miR-1989 e miR-2c também atuam nos ovários onde estão predominantemente localizados, resultado validado por ensaio com luciferase, (Zhu *et al.*, 2016). Protasio *et al.* (2017) identificaram sma-miR-4989 e sma-miR-277 atuando na diferenciação de esquistossômulos para adultos, esses miRNAs são expressos em células do tegumento, participam assim da transição dessas fases. Eles verificaram que miR-277 é diferencialmente expresso em fêmeas despareadas em relação a fêmeas sexualmente maduras, sugerindo assim, para esse miRNA, atuação no desenvolvimento sexual dos parasitas.

O nosso laboratório possui trabalhos publicados que identificaram miRNAs em *S. mansoni*, sendo que alguns são expressos somente em determinado estágio do ciclo de vida. Nesses estudos foi possível observar que vários miRNAs possuem expressão significativamente diferente entre machos e fêmeas, sendo alguns sexo-específicos, o sma-

mir-71 foi um deles e tem como alvo os órgãos sexuais da fêmea, visto que seus genes alvos encontram-se no cromossomo W, sendo que ele atua reprimindo a maturação sexual da fêmea na ausência do macho. A avaliação funcional dos miRNAs é importante para melhor compreensão dos mecanismos de regulação pós-transcricionais e a biologia adaptativa de *S. mansoni* (De Souza Gomes *et al.*, 2011).

1.4.2 RNAs longos não codificantes (Lnc RNAs): conceitos e identificação em *S. mansoni*

Os lnc RNAs geralmente são moléculas que apresentam mais de 200 nucleotídeos e que são sintetizados pela RNA polimerase II, muitos são poliadenilados e capeados. Lnc RNAs possuem funções de regulação e podem ser classificados principalmente como intergênicos (lincRNA) ou antisense (fita contrária a que apresenta os genes que codificam proteínas, NAT) (Chen, 2016). A proporção de lincRNAs encontrada é maior que a de NATs. Existem outros tipos como os ciRNAs (RNA circularizado na formação do laço de *splicing* dos íntrons, com ligação 2',5'), circRNAs (RNA circularizado pela ligação 3',5' da extremidade de *splicing* de éxons), snoLncRNAs (possuem snoRNAs em suas extremidades e íntrons desse snoRNAs em sua extensão, não possuem cap nem poli-A), dentre outros (Quinn e Chang, 2015; Chen, 2016).

Grande parte dos lncRNAs identificados se concentram próximo das regiões em que foram transcritos e atuam regulando genes vizinhos (Chen, 2016). Diederichs (2014) afirma que a conservação de lncRNAs considerando a sequência dos nucleotídeos não é comum, e mesmo em espécies próximas evolutivamente, e que apresentam um dado lncRNA em comum, este não funcionará de maneira similar nas duas. Essas características dos lncRNAs são interessantes na busca por biomarcadores, visto que muitos não apresentarão ortólogos e se apresentarem terão muitas diferenças na sequência e na conformação. Para Diederichs (2014) a conservação dos lncRNAs está baseada na combinação de quatro fatores, que seriam a sequência (MALAT1 de camundongos e humanos teria essa conservação), estrutura, função e o locus (HOTAIR apresenta conservação por sintenia em humanos e camundongos).

Estudos anteriores do nosso laboratório identificaram 170 lncRNA de *S. mansoni* e mostraram que a expressão de alguns desses lncRNAs foi mais alterada nas fêmeas, foram comparados nesse estudo vermes adultos resistentes e suscetíveis ao praziquantel (Oliveira *et al.*, 2018). A análise de enriquecimento da Gene Ontology (GO) desse mesmo estudo

encontrou maior quantidade de lncRNAs funcionais no citoplasma do que no núcleo de *S. mansoni*. As cepas de *S. mansoni* resistentes ao praziquantel exibiram níveis de expressão de lncRNA mais altos nos machos, enquanto as cepas de *S. mansoni* susceptíveis ao praziquantel exibiram níveis de expressão de lncRNA mais altos nas fêmeas, indicando as funções relacionadas à resistência dos lncRNAs e também indicando que os lncRNAs são expressos de uma maneira sexo-específica (Oliveira *et al.*, 2018).

O primeiro conjunto de lncRNAs de *S. mansoni* identificado detectou muitos lncRNAs de origem intergênica sendo que esquistossômulos e machos foram os estágios que exibiram maiores diferenças nos níveis de expressão relativa dos lncRNAs escolhidos para serem validados (Vasconcelos *et al.*, 2017). Recentemente o mesmo grupo que identificou o primeiro conjunto de lncRNAs de *S. mansoni* reanalisaram esses lncRNAs previamente descritos e observaram que muitos deles foram equivocadamente identificados como lncRNAs, pois eram pré-RNAm. Nessa nova análise os autores utilizaram o transcrito de *S. mansoni* em diferentes estágios, exceto os ovos devido à baixa cobertura. Eles descreveram diferentes marcas epigenéticas de silenciamento e de ativação associadas a diferentes estágios nos locais de início da transcrição, reforçando o papel dos lncRNAs na biologia do desenvolvimento e da adaptação do parasita (Maciel *et al.*, 2019).

1.5 O modelo murino de infecção experimental pelo *S. mansoni*

Vários modelos nocaute já foram empregados com uma abordagem imunológica na esquistossomose mansônica. Jankovic *et al.* (1999) mostraram que camundongos *IL4^{-/-}* possuem tamanho de granulomas similar a camundongos controle, mas por outro lado quando ele infectou camundongos nocaute para o receptor *IL-4Ra^{-/-}*, que não responde para IL4 e IL13, houve a formação de granulomas extensivamente menores.

Anderson *et al.* (1999) mostraram que camundongos *IL12^{-/-}* infectados com *S. mansoni* apresentavam grande quantidade de células multinucleadas do sistema imune durante a infecção pulmonar, diminuição dos níveis de IFN γ e TNF α , aumento de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 nos pulmões, os autores afirmam que a ausência de IL12 ocasionou um aumento da resposta Th2 que está associada ao surgimento de células multinucleadas do sistema imune.

Wolowczuk *et al.* (1999) verificaram que camundongos *IL7^{-/-}* desenvolveram uma resposta Th1 aumentada, em seus trabalhos eles verificaram que os camundongos *IL7^{-/-}* infectados apresentavam menor quantidade de vermes recuperados durante a perfusão em comparação com controle infectado e também apresentavam menor quantidade de ovos aderidos aos órgãos do hospedeiro. As análises morfológicas do parasita revelaram que o tamanho dos vermes recuperados dos camundongos *IL7^{-/-}* infectados foi bem reduzido em relação aos camundongos infectados controle.

Shainheit *et al.* (2007) realizaram experimentos com camundongos C57BL/6 infectados e *WSX-1^{-/-}* (nocaute para cadeia do receptor IL27) com uma abordagem imunológica, eles detectaram menores níveis de IFN γ , mas que não implicaram em diferenças no aspecto e tamanho dos granulomas hepáticos. Na fase crônica eles observaram que houve uma diminuição de citocinas pró-inflamatórias no modelo *WSX-1^{-/-}* infectado, mas que não acarretou diferenças na patologia em relação ao grupo controle.

1.6 O modelo nocaute EBi3

EBi3 (*Epstein-Barr virus induced 3*) é uma proteína de 25 kDa, que foi descoberta pela hibridização de genes expressos por células B durante a infecção por Epstein-Barr virus (EBV) (Devergne *et al.*, 1996). É uma proteína secretada e possui modificações pós-traducionais de glicosilação. Em seres humanos é mais expressa na placenta, baço, linfonodos, apêndice e vesícula biliar (Fagerberg *et al.*, 2014). Além de possuir motivos de ligação a WSXWS, EBi3 possui homologia estrutural com IL-12p40 e CNTFR (*ciliary neurotrophic factor receptor*) que são outras proteínas constituintes de interleucinas e citocinas, exemplo disso é que IL-12p40 combinado a p35 forma o IL12 (Devergne *et al.*, 1996).

O modelo *EBi3^{-/-}* afeta a resposta imune IL27 e IL35, pois ambas interleucinas são heterodímeros, figura 4. O IL27 é formado pela combinação de EBi3 e IL-27p28, sendo que o receptor dessa interleucina é composto da glicoproteína 130 e de WSX-1 (ou IL-27R α) que é a cadeia alfa transmembrana (Pflanz *et al.*, 2002). Já o IL35 ocorre pela combinação de EBi3 e p35, o IL 35 possui uma promiscuidade na combinação de receptores, ele pode usar 3 combinações diferentes, IL-12R β 2–gp130, IL-12R β 2–IL-12R β 2 e gp130-gp130 (Vignali e Kuchroo, 2012).

Já foram usados camundongos nocaute para EBi3 em estudos que abordavam infecção por *Leishmania major*, nesse estudo os autores puderam perceber que o modelo nocaute usado ($EBi3^{-/-}/IL27R\alpha^{-/-}$), aumentou o tamanho da lesão e a ativação de Th17 e influenciou na ativação da resposta Th2 em estágios precoces da patologia (Artis *et al.*, 2004). Usando os mesmos modelos nocautes ($EBi3^{-/-}/IL27R\alpha^{-/-}$), outros autores observaram que a resposta imune efetora de células T CD8 foi afetada durante a infecção por Influenza (Mayer *et al.*, 2008). Usando somente o modelo $EBi3^{-/-}$ foi observado que esse modelo nocaute aumentou a ativação de Th17 durante a infecção por *Listeria monocytogenes* (Yang *et al.*, 2008).

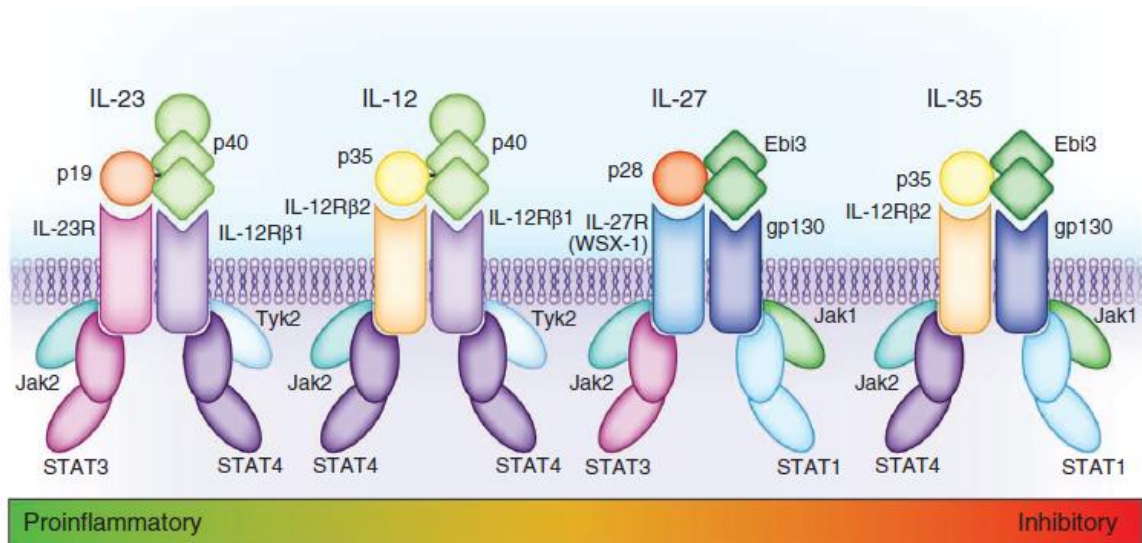


Figura 4: Desenho esquemático citocina/receptor: IL12, IL23, IL27 e IL35. A figura mostra a composição das interleucinas da família IL12 e seus respectivos receptores além de mostrar quais apresentam predominantemente funções pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (Vignali e Kuchroo, 2012).

IL27 pode apresentar efeitos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios dependendo do tipo de célula em que ele está atuando. Já foi descrito que em linfócitos T CD4 e T CD8, essa interleucina induz a expressão de Ahr e IFN- γ , além de estimular a proliferação, em T CD4 ainda inibe IL4 e IL17, em linfócitos B estimula a proliferação e secreção de anticorpos, exercendo assim atividade pró-inflamatória (Hall *et al.*, 2012). Em granulócitos e mastócitos exerce atividade pró-inflamatória por induzir a produção de IL6, IL1 e TNF α . Em neutrófilos, macrófagos e células dendríticas exerce função anti-inflamatória, pois inibe TNF α , IL12p40, CD80 e CD86 (Hall *et al.*, 2012).

Como o IL27 induz a produção de IFN γ , ele pode promover a resposta imune Th1, porém a sua capacidade de estimular a produção de IL10 pode induzir também uma resposta imune T regulatória. Vale ressaltar que IL10 e IL21 são fatores de crescimento de células T CD8 e isso pode influenciar no papel pró-inflamatório de IL27 considerando esse tipo celular (Hall *et al.*, 2012). As células que produzem esse fator são células B, dendríticas, macrófagos e monócitos (Zhang *et al.*, 2019).

IL35 possui predominantemente atividade anti-inflamatória e regulatória, já foi descrito que essa interleucina inibe a expressão de fatores de crescimento que são requeridos para a diferenciação das células da resposta imune Th1 e Th17. IL35 atua inibindo a resposta imune Th2 também, pois inibe a transcrição de IL4 e do fator de transcrição GATA-3 (Vignali e Kuchroo, 2012). Por ter uma forte função regulatória a ausência dessa interleucina é fundamental no desenvolvimento de doenças auto-imunes. As células que produzem esse fator são células B regulatórias, células dendríticas ativadas, células T regulatórias Foxp3+. Já foi descrito que a administração de IL35 melhorou os sintomas de pacientes com artrite colágeno-induzida e asma. Mas em pacientes com tumores essa interleucina apresenta efeito prejudicial, pois inibe a apoptose, regula fatores inflamatórios, promove angiogênese, induz a expressão de genes do ciclo celular e promove o escape por inibir células T (Zhang *et al.*, 2019).

Nosso grupo realizou infecções utilizando vários modelos nocautes, nesses estudos foi possível observar que em camundongos *EBi3*^{-/-} infectados com *S. mansoni* ocorreu menor quantidade de ovos recuperados do fígado em comparação com outros grupos nocaute. Considerando que a fibrose hepática é o principal sintoma da doença e os antígenos solúveis nos ovos são os responsáveis pelo desencadeamento da reação inflamatória que compromete o fígado, esse modelo foi o escolhido para este trabalho (experimento em colaboração com Patrocínio AB, FMRP).

1.7 Biomarcadores e epigenética

Os biomarcadores que podem ser usados para detectar a ocorrência ou não de uma doença são biomarcadores de diagnóstico. Biomarcadores de diagnóstico devem ser altamente específicos, sensíveis e de preferência devem ser capazes de detectar a doença a partir de secreções, amostras de sangue, etc, sem necessitar de amostragem invasiva (Epigenetic biomarker development, 2009). Bons biomarcadores tem de apresentar consistência, pois

devem funcionar em diferentes indivíduos de diferentes populações, além de sofrer temporalidade e responsividade, em que o biomarcador sofre alterações durante um tratamento indicando progressão ou regressão da doença, além de exibir um sinal que sobressaia o ruído da técnica (Aronson e Ferner, 2017).

Os miRNAs são propostos como biomarcadores para diagnóstico na infecção por *S. mansoni*, alguns hospedeiros definitivos possuem infecção monosssexual ou apresentam ovos aderidos somente aos órgãos, não eliminam ovos nas fezes, isso faz com que o diagnóstico por Kato-Katz seja inadequado (Hoy *et al.*, 2014; Meninger *et al.*, 2017). Hoy *et al.* (2014) verificaram que os miRNAs bantam, miR-277 e miR-3479-3p provenientes de *S. mansoni* estavam presentes no soro de pacientes infectados na fase aguda e crônica da doença podendo ser implementados como biomarcadores no diagnóstico da esquistossomose.

Bantam e miR-2c-3p são os dois miRNAs circulantes mais expressos, após o início da ovoposição (30 dias) já é possível recuperar quantidades detectáveis para diagnóstico clínico, e por isso estão sendo desenvolvidas metodologias para empregá-los como biomarcadores, com o intuito de tornar o diagnóstico e tratamento da doença mais precoce possível e evitar danos hepáticos graves (Meninger *et al.*, 2017).

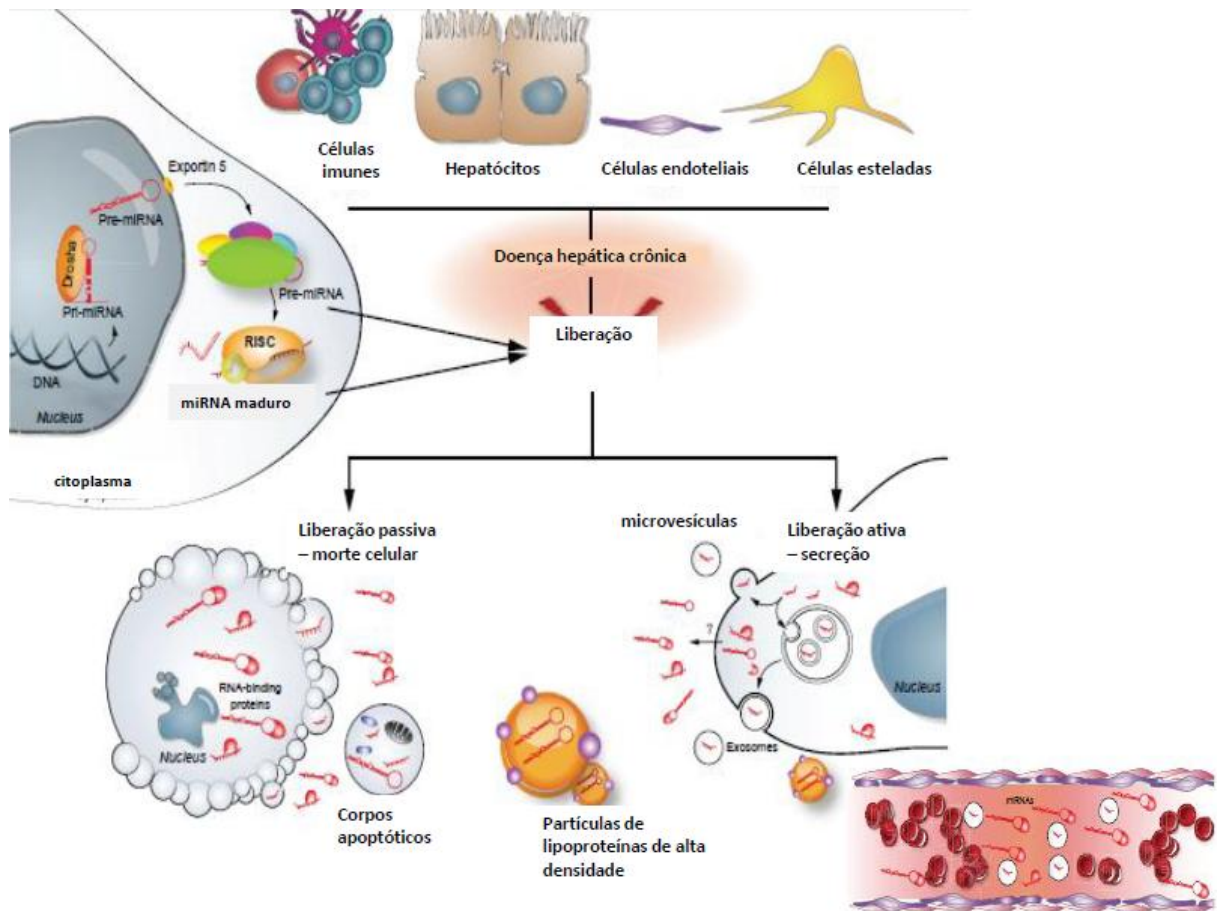


Figura 5: Biogênese de miRNAs e modos de carregamento de miRNAs circulantes que são utilizados como biomarcadores (Roderburg e Luedde, 2014).

Hoy *et al.* (2014) analisaram miRNAs de fígado de camundongos C57BL/6 por qRT PCR *array* e verificaram que os miRNAs de fígado miR-199-5p, miR-199-3p, miR-214, miR-21, miR-210 apresentaram aumento na expressão durante a infecção com *S. mansoni*, já miR-192, miR194, miR-365, miR-122 e miR-151 apresentaram diminuição da expressão durante a mesma infecção, alguns desses miRNAs estão com as níveis de expressão alteradas em qualquer patologia que ocasione fibrose hepática. Eles observaram também que miR-21 e miR-214 permaneciam com expressão elevada no soro mas somente após 12 semanas de infecção, não sendo possível utilizar esses miRNAs em estágios anteriores como biomarcadores. Podemos ver na figura 5 as diferentes formas de transporte de miRNAs no sangue e também a biogênese dessas moléculas.

2 Justificativa, Relevância e Hipótese

Os sintomas da esquistossomose incluem fibrose hepática, hipertensão portal, ascite, hematêmese e hipertrofia do lóbulo esquerdo (causada pela obstrução do fluxo sanguíneo lateral devido ao acúmulo de ovos), dores abdominais, diarreia sanguinolenta, dentre outros sintomas que causam grande prejuízo físico e social ao portador. A droga mais utilizada no tratamento da esquistossomose é o praziquantel (Mcmanus *et al.*, 2018). Sabe-se que os canais de cálcio do parasito são afetados durante o tratamento com praziquantel, causando contrações e surgimento de vacúolos no tegumento, levando-o a morte (Nogi *et al.*, 2009). Cerca de 90% dos casos de esquistossomose estão no continente africano, porém a China, Indonésia, América do Sul e Central apresentam grandes percentuais de indivíduos infectados devido ao clima tropical e subtropical favorável desses países. Só em 2017 mais de 89 milhões de indivíduos receberam o tratamento para a esquistossomose já diagnosticada (Who, 2018). No Brasil em 2012 foram registrados 218 internações e 426 óbitos (Saúde, 2017)

O fígado é o órgão mais afetado pela esquistossomose mansoni, aumento demasiado na fibrose hepática pode levar pacientes ao óbito. Existem uma série de fatores que conduzem a progressão da fibrose, dentre eles, podemos citar o aumento de IL4, 5, 13, 33 e HMGB1(High mobility group box 1), que ativam células esteladas hepáticas promovendo assim a deposição de colágeno, dentre outras moléculas como hsa-miR-222/221 e hsa-miR-10a que ativam HSCs e TGF- β desencadeando a formação granulomatosa intensa nos espaços intraportais em humanos (Kamdem *et al.*, 2018).

Inibidores de HDACs, como Tricostatina A e SmI-124, SmI-148 e SmI-558 tem mostrado eficiência por diminuir a viabilidade dos vermes adultos e esquistossômulos por gerar instabilidade na regulação da expressão gênica dos parasitos. Efeitos semelhantes são observados em HATs por inibição enzimática e silenciamento via dsRNA, em que órgãos reprodutivos e ovos são afetados, sugerindo possíveis vantagens do surgimento de epidrogas no tratamento de esquistossomose (Carneiro *et al.*, 2014; Guidi *et al.*, 2018).

A hipótese desse estudo é que *S. mansoni* re programe a expressão gênica em resposta ao sistema imune do hospedeiro mamífero, neste caso C57BL/6 *Ebi3*^{-/-}, altere o número de ovos produzidos, e expressão de genes relacionados a epigenética, miRNAs e a porcentagem de 5-mC do DNA. Em resposta, o hospedeiro mamífero altera o perfil de metilação do DNA dos hepatócitos, alterando os níveis de expressão de DNMTs, TETs, miRNAs, a porcentagem de 5-mC no DNA e também module a extensão do granuloma hepático.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Investigar aspectos epigenéticos da interação parasito-hospedeiro influenciados pelo sistema imune na esquistossomose murina C57BL/6 *EBi3*^{-/-}.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar se o modelo *EBi3*^{-/-} afeta a carga parasitária, fertilidade dos parasitos LE e modulação na formação do granuloma hepático;

Avaliar se o *background* imunológico C57BL/6 *EBi3*^{-/-} induz alteração no perfil de expressão das metil CpG *binding domain*, histona acetiltransferases, histona deacetilases e proteases específicas de ubiquitina do *S. mansoni* LE;

Comparar o perfil de expressão das metil CpG *binding domain*, histona acetiltransferases, histona deacetilases e proteases específicas de ubiquitina do *S. mansoni* LE-PZQ com LE recuperada de WT;

Avaliar se o *background* imunológico C57BL/6 *EBi3*^{-/-} induz alteração no perfil de metilação do DNA de parasitos machos e fêmeas LE;

Avaliar se o *background* imunológico C57BL/6 *EBi3*^{-/-} induz alteração no perfil expressão de miRNAs 124-3P, 125A, 190-3P e 5P de *S. mansoni* LE;

Avaliar se o *background* imunológico C57BL/6 *EBi3*^{-/-} induz alteração no perfil expressão das DNMTs e TETs e dos miRNAs 31-3p e 5P e 122-3P e 5P no fígado de animais infectados e não infectados com a cepa LE;

Avaliar se o *background* imunológico C57BL/6 *EBi3*^{-/-} induz alteração no perfil de metilação do DNA do fígado de animais infectados e não infectados com a cepa LE;

Avaliar se lncRNAs de *S. mansoni* são detectáveis no fígado de camundongos infectados e se o *background* imunológico C57BL/6 *EBi3*^{-/-} induz alteração no perfil expressão desses mesmos lncRNAs;

Avaliar se lncRNAs e miRNAs de *S. mansoni* são detectáveis no sangue de camundongos C57BL/6 *EBi3*^{-/-} controle e infectados e se podem ser utilizados como biomarcadores.

4 Materiais e Métodos

4.1 Eutanásia dos camundongos: Obtenção dos fígados

A infecção experimental murina utilizando camundongos C57BL/6 *EBi3*^{-/-} foi realizada no biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia da FMRP-USP, todos os experimentos envolvendo camundongos foram realizados de acordo com os princípios éticos em experimentação animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sob o protocolo 195/2015 em responsabilidade do professor Dr. Vanderlei Rodrigues. Os camundongos foram perfundidos com 55 dias, os fígados foram divididos em quatro partes (ensaios parasitológicos, extração de DNA, RNA e lâmina) e pesados. Foram obtidos 60 animais, sendo que 12 eram C57BL/6 WT não infectado, 10 C57BL/6 WT infectado com cepa LE, 10 C57BL/6 *EBi3*^{-/-} não infectado e 28 C57BL/6 *EBi3*^{-/-} infectado com cepa LE, figura 6. Os camundongos pesavam 17 g e tinham 5 semanas de idade quando foram infectados, no fim do experimento os camundongos tinham aproximadamente 13 semanas de idade. Os camundongos foram eutanasiados usando uma combinação de cloridrato de cetamina (8 mg/kg) e xilazina (4 mg/kg) administrados por injeção intraperitoneal.

4.2 Manutenção do ciclo de vida do *S. mansoni* e infecção experimental

O ciclo biológico de *S. mansoni* (linhagem Luiz Evangelista - LE) é mantido no laboratório de Biologia Molecular de Parasitas, do Departamento de Bioquímica e Imunologia da FMRP- USP, utilizando como hospedeiros definitivos camundongos da linhagem C57BL/6 (WT) e C57BL/6 *EBi3*^{-/-} e como hospedeiros intermediários caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*. Os ovos do parasito foram recuperados das fezes de camundongos infectados, pelo método de Hoffman (Hoffman e A Poxs, 1934), e expostos à água e a luz por 1 h para eclosão dos miracídios. 15 a 18 miracídios foram utilizados para infecção de cada caramujo. As cercárias liberadas 43 dias após infecção dos caramujos foram coletadas e aproximadamente 100 cercárias foram inoculadas em cada camundongo por via subcutânea.

Esses experimentos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr Vanderlei Rodrigues, do Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Campus, Ribeirão Preto (FMRP-USP).

Os vermes adultos macho e fêmea da cepa LE-PZQ utilizados nesse projeto foram gentilmente cedidos pela Dra Liana Konovaloff Jannotti Passos, do Laboratório de Helmintologia e Malacologia Médica do Centro de Pesquisas René Rachou – Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte/MG (CPqRR/FIOCRUZ).

Para o cálculo amostral foi considerando as diferenças mínimas entre as médias e o erro padrão da média, com poder de 0,95 e nível de significância (α) de 0,05. Utilizou-se o teste de comparação de médias do programa Bioestat, versão 5.0.

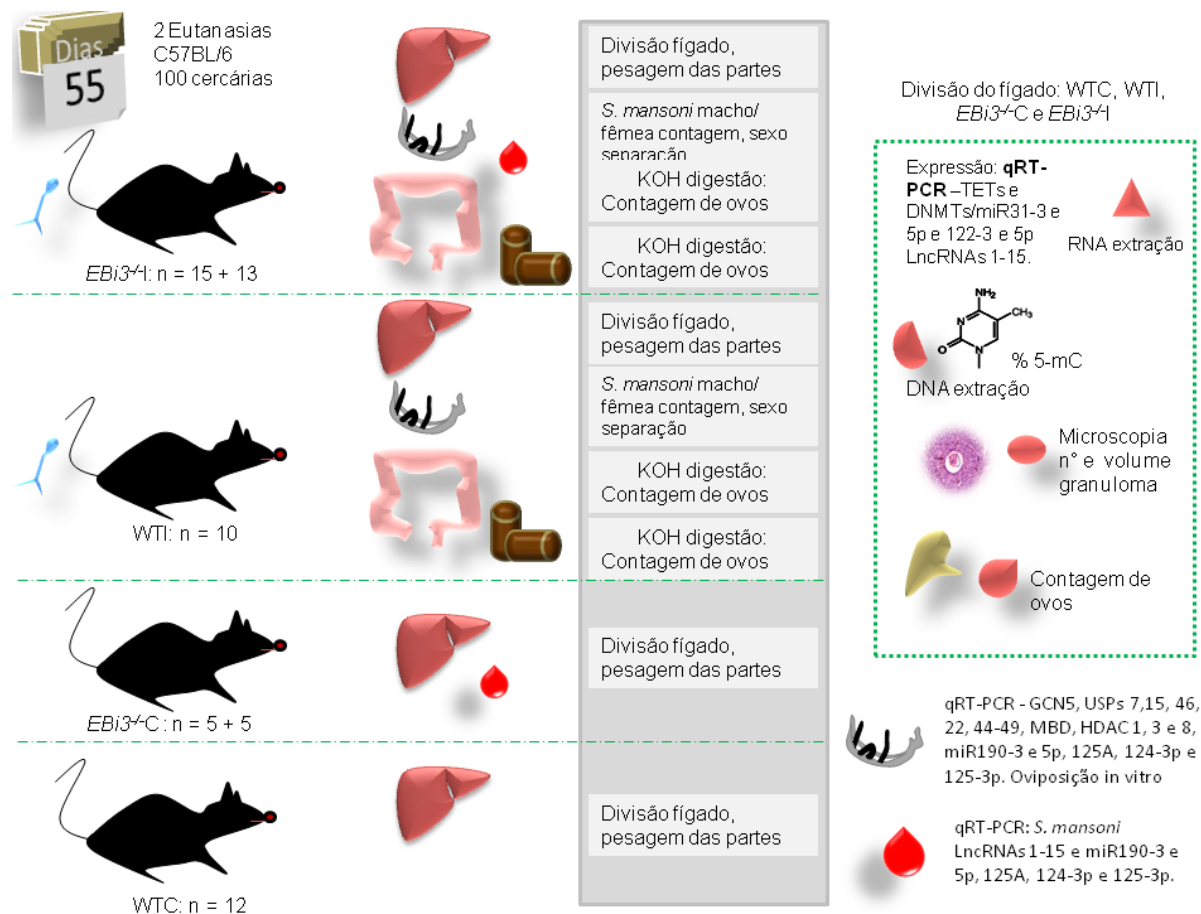


Figura 6: Fluxograma dos experimentos realizados: delineamento experimental.

4.3 Obtenção dos parasitos

4.3.1 Cultura *in vitro* de *S. mansoni*

Os vermes adultos foram obtidos por meio da perfusão do sistema porta-hepático de camundongos eutanasiados com 55 dias de infecção, segundo as condições previamente

descritas por Smithers e Terry (1965). Após a coleta, os parasitos foram cultivados em atmosfera de 5% CO₂ dentro de placas estéreis de 24 poços a 37°C, contendo o meio RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) suplementado com 25 µM de HEPES (pH 7,5), antibióticos (100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina), 10% de soro fetal bovino (Gibco, Carlsbad, CA, EUA). Após 24 horas de adaptação em cultivo *in vitro*, a produção total de ovos por casal foi monitorada por um período de 24h, 48h e 72h, 96h e 120h em microscópio óptico invertido.

4.4 Quantificação dos ovos retidos nas fezes e em órgãos do hospedeiro

As fezes obtidas na noite anterior à eutanásia foram pesadas e homogeneizadas em tampão fosfato contendo 10% de formol até o dia da contagem, alíquotas de 100 µL foram utilizadas para contagem com auxílio de microscopia de luz.

Após a eutanásia dos animais uma parte do fígado e todo o intestino foram pesados e incubados separadamente em solução de KOH a 10% por 16h em tubos de 15 mL. Posteriormente os órgãos digeridos foram centrifugados a 200 xg por 2 minutos, lavados cinco vezes em solução de NaCl 0,85% e armazenados a 4°C para contagem, alíquotas de 100 µL foram utilizadas para contagem com auxílio de microscopia de luz.

4.5 Histologia e morfometria do fígado de C57BL/6 (WT) e C57BL/6 *EBi3*^{-/-} infectados e não infectados com *S. mansoni* LE

Após a eutanásia dos animais o lobo quadrado foi fixado em tampão PBS 1X suplementado com formaldeído 10%. Esse lobo foi utilizado para o preparo das lâminas, a coloração utilizada foi Hematoxilina eosina, as lâminas foram preparadas conforme os protocolos do Laboratório Multiusuários de Microscopia do NUPEB/UFOP, empregando microscópio Leica DM5000B, (Leica, Wetzlar, Alemanha). A avaliação microscópica foi estabelecida no aumento de 20 vezes. Foram obtidas 20 imagens de cada camundongo, os granulomas presentes em cada imagem foram medidos quanto ao volume e posteriormente foi feito uma média por camundongo. Os valores da cada camundongo 10 WTI e 15 *EBi3*^{-/-} representavam o grupo de infectados. Os parâmetros morfométricos foram medidos no programa ImageJ em campos de 885.303 µm² considerando os seguintes parâmetros:

Volume: onde R= raio do granuloma

$$Ve = \frac{4}{3}\pi.R^3$$

4.6 Extração de RNA total

4.6.1 Camundongos C57BL/6 (WT) e C57BL/6 *EBi3*^{-/-} infectados e não infectados

Foram feitas ao todo 60 extrações de RNA com os fígados camundongos C57BL/6 (WT) e C57BL/6 *EBi3*^{-/-} infectados e não infectados com a cepa LE *S. mansoni*, para a extração foi utilizado o kit PROMEGA SV total (Promega, Madison, Wisconsin, EUA). Foram homogeneizados cerca de 100-120 mg de fígado com 1mL de Tri Reagent com o auxílio de polítron seguindo 3 pulsos de 30 segundos com intervalo de 1 minuto no gelo. Posteriormente as amostras foram incubadas 5 minutos em temperatura ambiente, foram adicionados 400 µL de clorofórmio e vortexados por 1 minuto na velocidade máxima. As amostras foram submetidas à incubação por 25 minutos em temperatura ambiente e centrifugadas 15 minutos 12000 xg 4°C. A fase aquosa incolor, cerca de 400 µL, foi transferida para novo tubo e foram adicionados 400 µL de clorofórmio para posterior vortexagem. As amostras foram centrifugadas 2 minutos 12000 xg, 4°C e o sobrenadante de cada uma transferido para um novo tubo e adicionado a ele 600 µL de etanol 95%, seguido de homogeneização por pipetagem. Foram transferidos 600 µL do sobrenadante com etanol para a coluna e centrifugados 2 minutos 12000 xg, os resíduos foram descartados, o processo repetido com o restante do material. Foram adicionados 600µL de *Wash Solution* na coluna e submetidas à centrifugação por 2 minutos 12000 xg. Foram adicionados 50µL de solução de digestão de DNA (5µL de DNase, 5µL de MnCl₂, 40 µL de *Yellow core*) e posteriormente incubadas por 25 minutos em temperatura ambiente. Foram adicionados 200 µL de DNase *Stop Solution* e centrifugados por 2 minutos 12000 xg. As colunas foram lavadas duas vezes, uma adicionando 600µL de *Wash Solution* e centrifugando por 2 minutos 12000 xg e outra adicionando 250µL de *Wash Solution* e centrifugando 2 minutos 12000 xg. O RNA foi eluído com 100µL de água livre de RNase, em centrifugação de 3 minutos 12000 xg. As amostras foram quantificadas no nano drop (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA), e armazenadas a -

80°C. A integridade do RNA extraído foi avaliada em gel de agarose/formaldeído, como mostra na figura 7.

4.6.2 *S. mansoni* (macho e fêmea adultos)

Foram feitas extrações de machos e fêmeas recuperados de camundongos C57BL/6 (WT) e C57BL/6 *EBi3^{-/-}* infectados e LE-PZQ recuperada de camundongos C57BL/6 (WT), é necessário um pool mínimo de 50 vermes (separação mecânica de parasitos com auxílio de pincel). Para a extração foi utilizado o kit PROMEGA SV total (Promega, Madison, Wisconsin, EUA). Foram homogeneizados cerca de 50 vermes com 700 µL de Tri Reagent com o auxílio de politron seguindo 3 pulsos de 15 segundos com intervalo de 1 minuto no gelo. Posteriormente as amostras foram incubadas 15 minutos em temperatura ambiente, foram adicionados 400 µL de clorofórmio e vortexados por 1 minuto na velocidade máxima. As amostras foram submetidas à incubação por 25 minutos em temperatura ambiente e centrifugadas 15 minutos 12000 xg 4°C. A fase aquosa incolor, cerca de 400 µL, foi transferida para novo tubo e foram adicionados 400 µL de clorofórmio para posterior vortexagem. As amostras foram centrifugadas 2 minutos 12000 xg, 4°C e o sobrenadante de cada uma transferido para um novo tubo e adicionado a ele 600 µL de etanol 95%, seguido de homogeneização por pipetagem. Foram transferidos 600 µL do sobrenadante com etanol para a coluna e centrifugados 2 minutos 12000 xg, os resíduos foram descartados, o processo repetido com o restante do material. Foram adicionados 600 µL de *Wash Solution* na coluna e submetidas à centrifugação por 2 minutos 12000 xg. Foram adicionados 50µL de solução de digestão de DNA (5 µL de DNase, 5 µL de MnCl₂, 40 µL de *Yellow core*) e posteriormente incubadas por 25 minutos em temperatura ambiente, foram feitos 3 tratamentos com DNase devido a grande quantidade de DNA proveniente dos ovos das fêmeas. Foram adicionados 200 µL de DNase *Stop Solution* e centrifugados por 2 minutos 12000 xg. As colunas foram lavadas duas vezes, uma adicionando 600 µL de *Wash Solution* e centrifugando por 2 minutos 12000 xg e outra adicionando 250 µL de *Wash Solution* e centrifugando 2 minutos 12000 xg. O RNA foi eluído com 100 µL de água livre de RNase, em centrifugação de 3 minutos 12000 xg. As amostras foram quantificadas no nano drop Thermo Fisher e armazenadas a -80°C. A integridade do RNA extraído foi avaliada em gel de agarose/formaldeído como mostra a figura 7.

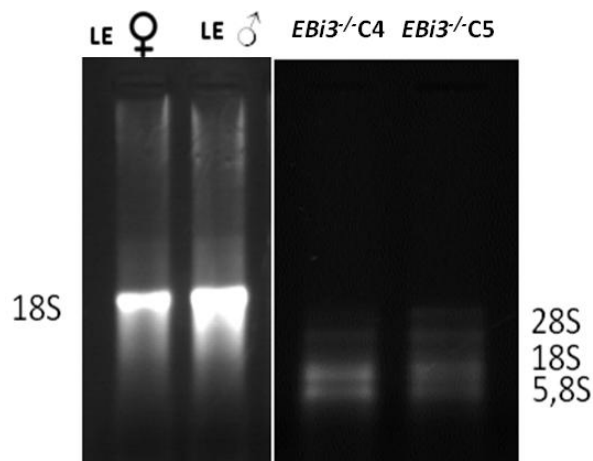


Figura 7: Gel representativo da extração de RNA total de *S. mansoni* fêmea e macho recuperado de WT e de amostras de fígado de camundongo *EBi3^{-/-}* não infectado. Podemos ver as bandas do RNA ribossômico desnaturado, foram utilizados 2µg de RNA total, no gel 1,2%, corado com brometo de etídeo.

4.7 Obtenção do cDNA a partir de fígado de camundongos C57BL/6 (WT) e C57BL/6 *EBi3^{-/-}* infectados e não infectados e de *S. mansoni* (macho e fêmea adultos)

A primeira fita do cDNA foi sintetizada utilizando 1µg de RNA total extraído e o Kit *High Capacity RT-PCR System* (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA), seguindo as recomendações fornecidas pelo fabricante. Para cada 1µg de RNA total, foram utilizados 2 µL de iniciadores randômicos (10X RT *Random primer*), 0,8 µL de dNTPs [25x dNTP Mix (100 mM)], 2 µL de tampão 10X, 1µL de transcriptase reversa e água livre de RNase para um volume final de 10 µL. A mistura foi incubada a 25°C por 10 minutos, seguidos de 120 minutos a 37°C e 85° por 5 minutos, com auxílio de um termociclador (*Biocycler*, version 3.2). As amostras de cDNA foram quantificadas em nano drop Thermo Fisher e armazenadas a -80°C até o momento do uso.

4.8 Eficiência dos oligonucleotídeos

Foram feitas diluições seriadas do cDNA em cinco concentrações, em triplicata. O cálculo da estimativa da eficiência (E) foi calculado pela fórmula: $E = (10^{-1/slope} - 1) \times 100$, um slope de 3,32 equivale a 100% de eficiência, isso quer dizer que a cada 3,32 ciclos a quantidade de produto formada aumenta dez vezes na fase exponencial. A faixa de eficiência aceitável para o SYBR Green é de 80-120%.

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados na curva de eficiência.

Oligo-nucleotídeos	Sequência	Referência
<i>SmDnmt2</i>	D: CGTGTTATCGAGAGTTTTAGTC R: TAATAAGCATTCTGAAACCAG	(Geyer <i>et al.</i> , 2011)
<i>SmMBD</i>	D: CGGTTATTGTACGTTCTCATCC R: CAGCACTCTGTATTCCTTTAGGC	(Geyer <i>et al.</i> , 2011)
<i>SmGCN5</i>	D: GTGCAATGCAAATGGTTGAC R: TTACGAAGGCGCTTCAAAT	(Carneiro <i>et al.</i> , 2014)
<i>SmCBP1</i>	D: TTACGAAGGCGCTTCAAAT R: ACGTTTTCCGGATCTGTTG	(Carneiro <i>et al.</i> , 2014)
<i>SmHDAC1</i>	D: GCGAGTATTTCCCGGAAGTCTG R: CGCGACCTGCACCAATATCT	(Oger <i>et al.</i> , 2008)
<i>SmHDAC3</i>	D: TTTTACGATCCAGATTGTGGGA R: CATGGGATGATTCGGTCCATA	(Oger <i>et al.</i> , 2008)
<i>SmHDAC8</i>	D: GGCATCAATGATTTGGACTGG R: TCGGCTCCGCATTGAACTAC	(Oger <i>et al.</i> , 2008)
<i>SmUSP 7</i>	D: 5'TTATGTCTCACCCGTCTC3' R: 5'CCCACTCTCTACAGAACAG3'	(Pereira <i>et al.</i> , 2015)
<i>SmUSP 15</i>	F: 5'TAGAACAAGAGCGTCCAC3' R: 5'GCAATCAGGGAGGCATAC3'	(Pereira <i>et al.</i> , 2015)
<i>SmUSP 22</i>	F: 5'CTGTAAATGGCTGCTCTG3' R: 5'ACGGGTGTATGGGTCAAC3'	(Pereira <i>et al.</i> , 2015)
<i>SmUSP 46</i>	F: 5'TCGGAGTAGATGCTGAAG3' R: 5'GGCACCTAGTTTCATTGG3'	(Pereira <i>et al.</i> , 2015)
<i>SmUSP 49/44</i>	F: 5'GGATTGGTGTGTTGTTCTTC3' R: 5'CGCATCTCCATCTTGTAG3'	(Pereira <i>et al.</i> , 2015)
<i>EIF4E</i>	F: 5' TGTTCOAACCACGGTCTCG 3' R: 5' TCGCCTTCCAATGCTTAGG-3'	(Liu <i>et al.</i> , 2012)
<i>MmuHPRT1</i>	F: 5'TGACACTGGCAAACAATGCA3' R: 5'GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT3'	(Vandesompele <i>et al.</i> ,

		2002)
<i>Sm-lncRNA 1</i>	F: 5'- AAGGGATGAGTTGACTGC -3' R: 5'- ACACGAAGACACCTATGACC -3'	(Oliveira <i>et al.</i> , 2018)
<i>Sm-lncRNA 2</i>	F: 5'- AGACAATGCGATGCCGTTAG -3' R: 5'- TTTGGAACCTCGTCAGCTAGG -3'	(Oliveira <i>et al.</i> , 2018)
<i>Sm-lncRNA 3</i>	F: 5'- TCACATCTCGCAACTCAG -3' R: 5'-AGTGGTCGTCAAGCAAAC -3'	(Oliveira <i>et al.</i> , 2018)
<i>Sm-lncRNA 4</i>	F: 5'-TTTCGACACGGCAACTGATC-3' R: 5'-GCCGATTCAGTGTAGCAAAG-3'	(Oliveira <i>et al.</i> , 2018)
<i>Sm-lncRNA 5</i>	F: 5'-GATCGAGCTGTAAGTGCAC-3' R: 5'-GATCCACATCCATATGAGTG-3'	(Oliveira <i>et al.</i> , 2018)
<i>Sm-lncRNA 6</i>	F: 5'-GACTGTTGGAAGAGGAAATG-3' R: 5'-GAGGATTTAAGCGACCATTG-3'	(Oliveira <i>et al.</i> , 2018)
<i>Sm-lncRNA 7</i>	F: 5'-CCGATGAGATGCGTATAG-3' R: 5'-GCAACACAGTGAGGTAGAG-3'	(Oliveira <i>et al.</i> , 2018)
<i>Sm-lncRNA 8</i>	F: 5'-CCACACAGGTAGTTCAGC-3' R: 5'-GAATCACTTGCCTTCGC-3'	(Oliveira <i>et al.</i> , 2018)
<i>Sm-lncRNA 9</i>	F: 5'-CTGTGAGAATGGTGGATG-3' R: 5'-ACGTTTATGAGCCGTAGC-3'	(Oliveira <i>et al.</i> , 2018)
<i>Sm-lncRNA 10</i>	F: 5'-GTGATATGCCCGGACAAAG-3' R: 5'-TTGAACGAGCAGCTGGAC-3'	(Oliveira <i>et al.</i> , 2018)
<i>Sm-lncRNA 11</i>	F: 5'-CCTCGTGTTTGTGCTTTG-3' R: 5'-GGAATGTGATTGCCTAGTCG-3'	(Oliveira <i>et al.</i> , 2018)
<i>Sm-lncRNA 12</i>	F: 5'-GCACTTGACACTAACCAGG-3' R: 5'-GGAGCTGTTCACTCATTG-3'	(Oliveira <i>et al.</i> , 2018)
<i>Sm-lncRNA 13</i>	F: 5'-TTCCCTCCAGACTATGATCC-3' R: 5'-CACGTATTGCACCTGATG-3'	(Oliveira <i>et al.</i> , 2018)
<i>Sm-lncRNA 14</i>	F: 5'-GTTGAAGAAGGTGAGTGC-3' R: 5'-GTGGAGGACTTGGAGATAC-3'	(Oliveira <i>et al.</i> , 2018)
<i>Sm-lncRNA 15</i>	F: 5'-CCATGCAAGTGTGATCCG-3' R: 5'-GTGGGATTATCAGCTGCAGG-3'	(Oliveira <i>et al.</i> , 2018)
<i>LTR- Saci 4 Retrotransposon</i>	F: 5'-GGGTGCATCAGAGTAATC-3' R: 5'-ACTTGATCCGCATACTCC-3'	(Oliveira <i>et al.</i> , 2018)

<i>MmuDNMT1</i>	F: 5'- CTACCTGGCTAAAGTCAAGTC-3' R: 5'- CACTCTCTGTGTCTACAACCTC-3'	(Xia <i>et al.</i> , 2015)
<i>MmuDNMT3A</i>	F: 5'- GCACCTATGGGCTGCTGCGAAGACG-3' R: 5'-CTGCCTCCAATCACCAGGTCGAATG-3'	(Xia <i>et al.</i> , 2015)
<i>MmuDNMT3B</i>	F: 5'- CAAGGAGGGCGACAACCGTCCATT-3' R: 5'- TGTTGGACACGTCCGTGTAGTGAG-3'	(Xia <i>et al.</i> , 2015)
<i>MmuTET1</i>	F: 5'- GAGCCTGTTCTCGATGTGG-3' R: 5'- CAAACCCACCTGAGGCTGTT-3'	(Li <i>et al.</i> , 2016)
<i>MmuTET2</i>	F: 5'- AACCTGGCTACTGTCATTGCTCCA-3' R: 5'- ATGTTCTGCTGGTCTCTGTGGGAA-3'	(Xia <i>et al.</i> , 2015)
<i>MmuTET3</i>	F: 5'- TCCGGATTGAGAAGGTCATC-3' R: 5'- CCAGGCCAGGATCAAGATAA-3'	(Xia <i>et al.</i> , 2015)

A tabela 1 mostra os oligonucleotídeos utilizados neste estudo, os marcados em negrito tiveram a eficiência analisada, os demais oligonucleotídeos utilizados neste estudo já haviam sido testados classificados quanto à eficiência (Bustin *et al.*, 2009).

4.9 Expressão por qRT-PCR de genes envolvidos na epigenética em *S. mansoni* (macho e fêmea separados) e em fígado de camundongos C57BL/6 (WT) e C57BL/6 *Ebi3*^{-/-} infectados e não infectados

As reações foram realizadas utilizando o kit Power SYBR Green Master Mix (Thermo Fischer) em placas de 96 poços (MicroAmp® Optical 96 Well Reaction Plate – Applied Biosystems) e seladas com adesivo óptico (MicroAmp® Optical Adhesive Film – Applied Biosystems). Foram adicionados a reação 3 µL dos oligonucleotídeos (concentração de 2,5 µM) e 7 µL de um mix de reação contendo 2µL de cDNA diluído (100ng por reação) e 5 µL de SYBR® Green Master Mix, totalizando um volume de reação em cada poço de 10 µL, as reações foram feitas em triplicata para todos os oligonucleotídeos no aparelho ABI7300 Applied Biosystems. Os valores de *baseline* foram ajustados para 3-15 ciclos. O *threshold* foi ajustado para 0,02, acima da *baseline*, onde ocorre amplificação significativa e específica. O corante de referência passiva presente no SYBR é o ROX, que serve para corrigir poço a poço as flutuações de fluorescência não provenientes da PCR. Foram utilizados água estéril e RNA ao invés de cDNA nos poços referentes ao controle

negativo. As análises foram conduzidas utilizando o método de quantificação relativa da expressão gênica ($2^{-\Delta Cq}$), que permite quantificar diferenças no nível de expressão de alvos específicos entre as diferentes amostras normalizadas pelos níveis de expressão do controle endógeno *HPRT1* para camundongo e *EIF4E* para os parasitos (Bustin *et al.*, 2009).

4.10 Extração de RNA total incluindo pequenos RNAs a partir de fígado de camundongos C57BL/6 (WT) e C57BL/6 *EBi3*^{-/-} infectados e não infectados

Foram feitas extrações de RNA total incluindo miRNAs com os fígados de camundongos C57BL/6 (WT) e C57BL/6 *EBi3*^{-/-} infectados e não infectados, para a extração foi utilizado o kit miRNeasy (Qiagen, Venlo, Netherlands). Foram homogeneizados cerca de 50 mg de fígado em 700 μ L de Qiazol, mínimo 3 pulsos de 40 segundos com intervalo no gelo de 1 minuto. As amostras foram incubadas a 15-25°C por 5 minutos para dissociação de complexos de nucleoproteínas. Foram então adicionados 140 μ L de clorofórmio e as amostras foram vortexadas por 15 segundos na velocidade máxima, a homogeneização é importante para a separação das fases. Os tubos foram incubados em temperatura ambiente por 3 minutos, posteriormente eles foram centrifugados por 15 minutos 12000xg 4°C, nesta etapa ocorre a separação das fases, a fase superior é translúcida contendo RNA, a interfase é branca contendo proteínas e a inferior orgânica. A fase superior, cerca de 350 μ L, foi transferida para novo tubo e foram adicionados 1,5 volumes, cerca de 530 μ L de etanol 100%, a mistura foi homogeneizada por pipetagem. Foram adicionados 700 μ L da mistura na coluna de purificação e as amostras centrifugadas a 8000 xg por 15 segundos, em temperatura ambiente, esse procedimento foi repetido até o esgotamento do material. Foram adicionados 350 μ L de RWT buffer e as amostras foram centrifugadas a 8000 xg por 15 segundos em temperatura ambiente para lavagem das amostras. Foi adicionado 80 μ L de solução de DNase (10 μ L de DNase em 70 μ L de RDD) na membrana da coluna e esta foi incubada por 20°-30°C, 15 minutos. Foram adicionados 350 μ L de RWT buffer prosseguindo para a centrifugação a 8000 xg por 15 segundos, em temperatura ambiente. As colunas foram lavadas duas vezes, uma adicionando 500 μ L de tampão RPE e centrifugando a 8000 xg por 15 segundos em temperatura ambiente e a outra adicionando 500 μ L de tampão RPE e centrifugando a 8000 xg por 2 minutos. A coluna vazia foi centrifugada a 8000 xg por 1 minuto em temperatura ambiente para eliminação dos resíduos do tampão de lavagem da membrana. O RNA foi eluído em 30-50 μ L de água livre de RNases em centrifugação a 8000 xg por 1 minuto em

temperatura ambiente. As amostras foram quantificadas no nano drop Thermo Fisher e armazenadas a -80°C . A integridade do RNA extraído foi avaliada em gel de agarose/formaldeído, figura 8.

4.11 Transcrição Reversa de miRNAs recuperados de fígado de camundongos C57BL/6 (WT) e C57BL/6 *EBi3*^{-/-} infectados com LE *S. mansoni* e não infectados

A primeira fita do cDNA foi sintetizada utilizando 1µg de RNA total extraído e o Kit miScript Reverse Transcription (Qiagen), seguindo as recomendações dadas pelo fabricante. Para cada 1µg de RNA total, foram utilizados 4 µL miScript RT Buffer 5x, 1µL de transcriptase reversa (miScript Reverse Transcriptase Mix), 2µL de 10X miScript Nucleics Mix e água livre de RNase para um volume final de 20 µL. A mistura foi incubada a 37°C por 60 minutos, seguidos de 5 minutos a 95°C , com auxílio de um termociclador (Biocycler, version 3.2). As amostras foram quantificadas em nano drop Thermo Fisher e armazenadas a -80°C .

4.12 Expressão dos miRNAs de camundongos C57BL/6 (WT) e C57BL/6 *EBi3*^{-/-} infectados com LE *S. mansoni* e não infectados

As reações foram realizadas utilizando o kit miScript SYBR® Green PCR (Qiagen) em placas de 96 poços (MicroAmp® Optical 96 Well Reaction Plate – Applied Biosystems) e seladas com adesivo óptico (MicroAmp® Optical Adhesive Film – Applied Biosystems). Foi feita uma configuração da *baseline*, que é o nível de ruído em ciclos iniciais onde não há produtos detectáveis; ela deve estar 2 ciclos antes do ciclo de amplificação inicial, mas não deve ultrapassar o ciclo 15. O volume de cDNA diluído não excedeu 10% do volume da reação, as reações foram feitas em triplicata para todos os oligonucleotídeos. Foram adicionados na reação 5µL de 2X Quantitect SYBR Green Master Mix; 1µL de miScript Universal oligonucleotídeo, a sequência complementar a etiqueta do OligodT presente no kit de transcrição reversa Qiagen que é incorporada ao cDNA; 2µL de cDNA diluído, 100ng por reação e 2µL de oligonucleotídeo, a sequência madura do miRNA. Foi adicionado um passo de 15 minutos a 95°C inicial para ativar a Hot Star Taq DNA Polimerase do 2X Quantitect SYBR Green PCR Master Mix, partindo para 40 ciclos com Desnaturação por 15 segundos a 94°C , anelamento por 30 segundos a 55°C e extensão com

coleta de fluorescência por 34 segundos a 70°C no aparelho ABI 7300 Applied Biosystems. Foram utilizados água estéril e RNA ao invés de cDNA nos poços referentes ao controle negativo.

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados na expressão de miRNAs de fígado de camundongo

Oligonucleotídeo	Sequência
snoU6	GATACAGAGAAGATTAGCAT
MMT-MIR31-5P	AGGCAAGATGCTGGCATAGCTG
MMT-MIR31-3P	TGCTATGCCAACATATTGCCATC
MMT-MIR122-5P	TGGAGTGTGACAATGGTGTTTG
MMT-MIR122-3P	AAACGCCATTATCACACTAA

As análises foram conduzidas utilizando o método de quantificação relativa da expressão gênica ($2^{-\Delta Cq}$), que permite quantificar diferenças no nível de expressão de alvos específicos (miRNAs 31 3P; 31 5P; 122 3P e 122 5P) entre as diferentes amostras normalizadas pelos níveis de expressão do calibrador snU6 (tabela 2).

4.13 Extração de RNA total de *S. mansoni* LE (macho e fêmea adulto) incluindo pequenos RNAs

Foram feitas extrações de RNA total incluindo miRNAs de machos e fêmeas recuperados de camundongos C57BL/6 (WT) e de C57BL/6 *EBi3^{-/-}*, é necessário um pool mínimo de 50 vermes, para a extração foi utilizado o kit miRNeasy (Qiagen). Foram homogeneizados cerca de 50 vermes em 700 µL de Qiazol, mínimo 3 pulsos de 20-40 segundos com intervalo no gelo de 1 minuto. As amostras foram incubadas a 15-25°C por 15 minutos para dissociação de complexos de nucleoproteínas. Foram então adicionados 140 µL de clorofórmio e as amostras foram vortexadas por 15 segundos na velocidade máxima, a homogeneização é importante para a separação das fases. Os tubos foram incubados em temperatura ambiente por 3 minutos, posteriormente os tubos foram centrifugados por 15 minutos 12000 xg 4°C, nesta etapa ocorre a separação das fases, a fase superior é translúcida contendo RNA, a interfase é branca contendo proteínas e a inferior orgânica. A fase superior, cerca de 350 µL, foi transferida para novo tubo e foram adicionados 1.5 volumes, cerca de

530 μL de etanol 100%, a mistura foi homogeneizada por pipetagem. Foram adicionados 700 μL da mistura na coluna de purificação e as amostras centrifugadas a 8000 $\times g$ por 15 segundos, em temperatura ambiente, esse procedimento foi repetido até o esgotamento do material. Foram adicionados 350 μL de RWT buffer e as amostras foram centrifugadas a 8000 $\times g$ por 15 segundos em temperatura ambiente para lavagem das amostras. Foi adicionado 80 μL de solução de DNase (10 μL de DNase em 70 μL de RDD) na membrana da coluna e esta foi incubada por 20°-30°C, 15 minutos, esse procedimento foi repetido 3 vezes. Foram adicionados 350 μL de RWT buffer prosseguindo para a centrifugação a 8000 $\times g$ por 15 segundos, em temperatura ambiente. As colunas foram lavadas duas vezes, adicionando 500 μL de tampão RPE e centrifugando a 8000 $\times g$ por 15 segundos em temperatura ambiente e depois adicionando 500 μL de tampão RPE e centrifugando a 8000 $\times g$ por 2 minutos. A coluna vazia foi centrifugada a 8000 $\times g$ por 1 minuto em temperatura ambiente para eliminação dos resíduos do tampão de lavagem da membrana. O RNA foi eluído em 30-50 μL de água livre de RNAses em centrifugação a 8000 $\times g$ por 1 minuto em temperatura ambiente. As amostras foram dosadas no nano drop Thermo Fisher e armazenadas a -80°C. A integridade do RNA extraído foi avaliada em gel de agarose/formaldeído, figura 8.

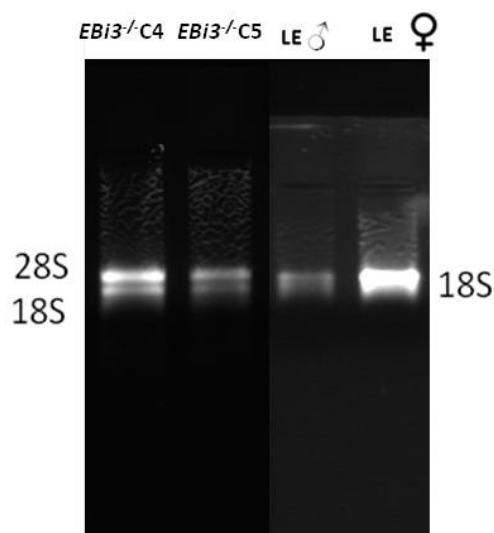


Figura 8: Gel representativo da extração de RNA total contendo miRNAs de amostras de fígado de camundongo *EBi3^{-/-}* não infectado e de *S. mansoni* LE macho e fêmea recuperado de WT. Podemos ver as bandas do RNA ribossômico desnaturado, foram utilizados 2 μg de RNA no gel 1,2%, corado com brometo de etídeo.

4.14 Transcrição reversa de miRNAs recuperados de *S. mansoni* LE (macho e fêmea adulto)

A transcrição reversa de RNA para cDNA foi feita usando um pequeno RNA específico, o stem loop RT oligonucleotídeo do TaqMan® Small RNA Assays Applied Biosystems e reagentes do kit miScript SYBR Green PCR kit, Qiagen de acordo com a tabela 3. O oligonucleotídeo (124-3p; 125-3p; 125A; 190-3p e 5p) combinado ao RNA foi incubado a 85°C por 5 minutos, 60°C por 5 minutos e posteriormente no gelo. As amostras foram incubadas 37°C por 60 minutos e 95°C por 5 minutos no termociclador (*Biocycler*, version 3.2).

Tabela 3: Componentes utilizados na reação de transcrição reversa de RNA total incluindo miRNAs de *S. mansoni*

Componentes	Quantidade para volume final de 20 µL
5X miScript HiSpec tampão Qiagen	4 µL (1X)
1µg de RNA total	Variável
10 mM de dNTP Affymetrix	2 µL (1mM)
Transcriptase Reversa Qiagen	2 µL
Stem loop RT oligonucleotídeo 5X Applied Biosystems	4µL (1X)
Água	Variável

4.15 Expressão dos miRNAs de *S. mansoni* LE (macho e fêmea adulto) por qRT-PCR

As reações foram realizadas utilizando placas de 96 poços (MicroAmp® Optical 96 Well ReactionPlate – Applied Biosystems) e seladas com adesivo óptico (MicroAmp® OpticalAdhesive Film – Applied Biosystems). O taqman MGB probe possui um repórter FAM™ dye na extremidade 5' da sonda, um minor groove binder (MGB) na extremidade 3' da sonda que serve para aumentar a temperatura de melting sem aumentar o comprimento da sonda e um quencher não fluorescente na extremidade 3' da sonda. Durante a PCR, a taqman MGB probe anela especificamente a uma sequência entre os sítios complementares ao oligonucleotídeo iniciador direto e ao reverso. Quando a sonda está intacta a proximidade do repórter com o quencher resulta em uma supressão de fluorescência pelo repórter, causada por

transferência de energia. A DNA polimerase cliva a sonda que está ligada ao alvo, a separação do repórter do quencher resulta em aumento da fluorescência do repórter, o sinal ocorre somente se a sequência alvo é complementar a sonda e é amplificada durante a PCR, amplificação não específica não é detectada. Foi adicionado na reação 1µL de 20X TaqMan® Small RNA Assay (1X final); 1,33µL de cDNA sem diluir; 10 µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix II 2X (1X final) e 7,67 µL de água livre de nucleases, as reações foram feitas em triplicata para todos os primers. Foram utilizados água estéril e RNA ao invés de cDNA nos poços referentes ao controle negativo. A reação foi conduzida no aparelho ABI 7500 Applied Biosystems sob as seguintes condições de ciclagem: ativação enzimática por 10 minutos a 95°C seguida de 40 ciclos de PCR com desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento com extensão a 60°C por 60 segundos. Como não é conhecido um bom controle endógeno para cálculo de expressão de miRNA em *S. mansoni* utilizando sonda Taqman, foi feito o *fold change* entre a amostra controle proveniente do camundongo WT e a amostra proveniente do camundongo *Ebi3^{-/-}*.

Camundongos C57BL/6 WT infectados e *Ebi3^{-/-}* infectados com 100 cercárias foram perfundidos após 55 dias, os vermes foram recuperados, os machos foram separados das fêmeas mecanicamente e ambos foram utilizados para a extração. Em *S. mansoni* não há descrição de um miRNA a ser usado como calibrador, por esse motivo a expressão dos miRNAs foi feita por Taqman Assay, foi feito cálculo de *fold*, o Cq do controle (recuperado de WT) é subtraído do Cq do grupo tratado (recuperado de *Ebi3^{-/-}*).

4.16 Extração de RNA total incluindo pequenos RNAs do sangue de camundongos C57BL/6 *Ebi3^{-/-}* infectados e não infectados com a cepa LE *S. mansoni*

Foram feitas extrações de RNA total incluindo miRNAs do sangue de camundongos C57BL/6 *Ebi3^{-/-}*, para a extração foi utilizado o kit miRNeasy (Qiagen). As amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 xg, por 10 minutos a 4°C, o plasma foi coletado. Posteriormente as mesmas amostras foram homogeneizadas em 1 mL de Qiazol, mínimo 5 pulsos de 1 minuto no vórtex com intervalos de 1 minuto no gelo. As amostras foram incubadas a 15-25°C por 15 minutos para dissociação de complexos de nucleoproteínas. Foram então adicionados 140 µL de clorofórmio e as amostras foram vortexadas por 15 segundos na velocidade máxima, a homogeneização é importante para a separação das fases. Os tubos

foram incubados em temperatura ambiente por 3 minutos, posteriormente os tubos foram centrifugados por 15 minutos 12000 $\times g$ 4°C, nesta etapa ocorre separação das fases, a fase superior é translúcida contendo RNA, a interfase é branca contendo proteínas e a inferior orgânica. A fase superior, cerca de 350 μL , foi transferida para novo tubo e foram adicionados 1,5 volumes, cerca de 530 μL de etanol 100%, a mistura foi homogeneizada por pipetagem. Foram adicionados 700 μL da mistura na coluna de purificação e as amostras centrifugadas a 8000 $\times g$ por 15 segundos, em temperatura ambiente, esse procedimento foi repetido até o esgotamento do material. Foram adicionados 350 μL de RWT buffer e as amostras foram centrifugadas a 8000 $\times g$ por 15 segundos em temperatura ambiente para lavagem das amostras. Foi adicionado 80 μL de solução de DNase (10 μL de DNase em 70 μL de RDD) na membrana da coluna e esta foi incubada por 20°-30°C, 15 minutos, esse procedimento foi repetido 3 vezes. Foram adicionados 350 μL de RWT buffer prosseguindo para a centrifugação a 8000 $\times g$ por 15 segundos, em temperatura ambiente. As colunas foram lavadas duas vezes, uma adicionando 500 μL de tampão RPE e centrifugando a 8000 $\times g$ por 15 segundos em temperatura ambiente e a outra adicionando 500 μL de tampão RPE e centrifugando a 8000 $\times g$ por 2 minutos. A coluna vazia foi centrifugada a 8000 $\times g$ por 1 minuto em temperatura ambiente para eliminação dos resíduos do tampão de lavagem da membrana. O RNA foi eluído em 30-50 μL de água livre de RNases em centrifugação a 8000 $\times g$ por 1 minuto em temperatura ambiente. As amostras foram dosadas no nano drop Thermo Fisher e armazenadas a -80°C. A integridade do RNA extraído foi avaliada em gel de agarose/formaldeído, figura 9. Foram feitas duas transcrições reversas, uma para síntese do cDNA referente aos miRNAs e outra referente ao cDNA de mRNAs que inclui lncRNAs. O protocolo de transcrição foi o mesmo adotado nos itens 4.7 e 4.11. A análise de expressão foi feita para detecção dos lncRNAs de *S. mansoni* listados na tabela 1 e dos miRNAs de *S. mansoni* que são os mesmos listados no item 4.15.

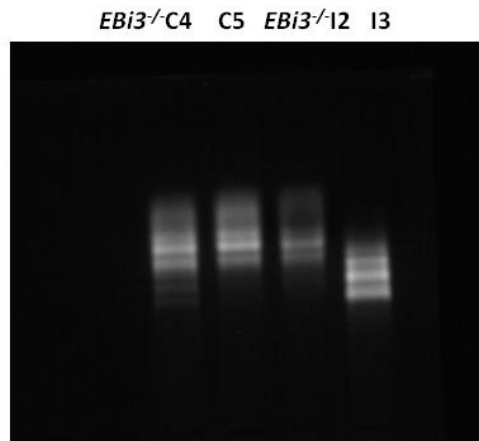


Figura 9: Gel representativo da extração de RNA total contendo miRNAs de amostras de plasma de camundongo *EBi3^{-/-}* não infectado e infectado. Podemos ver as bandas do RNA ribossômico desnaturalizado, foram utilizados 2µg de RNA no gel 1,2%, corado com brometo de etídeo.

4.17 Avaliação do conteúdo de metilação do DNA (5-mC %)

4.17.1 Extração de DNA genômico de fígado camundongos C57BL/6 (WT) e C57BL/6 *EBi3^{-/-}* infectados e não infectados com a cepa LE *S. mansoni*

Foram feitas extrações de DNA genômico com os fígados de camundongos WT infectado e não infectado e C57 BL/6 *EBi3^{-/-}* infectado e não infectado, para a extração foi utilizado o kit Wizard PROMEGA. Foram homogeneizados cerca de 30 mg de fígado com auxílio de nitrogênio líquido e cadinho, o lisado foi transferido para um frasco de 1,5mL com 600 µL de Solução de Lise do Núcleo, posteriormente o lisado foi incubado a 65°C por 15-30 minutos. Foram adicionados 17,5µL de proteinase K 20 mg/mL em cada amostra, que posteriormente foram homogeneizadas com vórtex e incubadas a 55°C por 16h. Foram adicionados 3µL de RNase às amostras com homogeneização por inversão de 2 a 5 vezes, as amostras foram incubadas por 30 minutos a 37°C em banho seco. Posteriormente as amostras seguiram para incubação por 5 minutos a temperatura ambiente. Foram adicionados 200 µL de Solução de Precipitação de Proteínas e as amostras foram homogeneizadas com vórtex por 20 segundos em velocidade máxima. Foram incubadas a 4°C por 5 minutos, prosseguindo para centrifugação 13000 a 16000 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para novo tubo de 1,5 mL contendo 600 µL de isopropanol em temperatura ambiente. As amostras foram homogeneizadas por inversão e posteriormente centrifugadas 13000 a 16000 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 600 µL de etanol 70% a

temperatura ambiente, prosseguindo para centrifugação entre 13000 a 16000 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco durante 15 minutos em fluxo laminar. Foram adicionados 100 µL de Solução de Reidratação de DNA e as amostras prosseguindo para incubação a 65°C por 1 h ou 16h a temperatura ambiente, para solubilização. As amostras foram dosadas no nano drop Thermo Fisher, diluídas e posteriormente quantificadas no Qubit Thermo Fisher para obter maior precisão. A integridade do DNA extraído foi avaliada em gel de agarose 0,6%.

4.17.2 Extração de DNA genômico de *S. mansoni*

Foram feitas extrações com 50 vermes machos LE (recuperados de WTI e *EBi3^{-/-}*), 50 vermes fêmeas LE separadas (recuperados de WTI e *EBi3^{-/-}*) e 50 casais da cepa LE-PZQ. Os parasitos foram homogeneizados em nitrogênio líquido e posteriormente foram adicionados 250 µL de tampão de lise contendo 50 mM de Tris HCl, pH 7,5; 1mM de EDTA; 1% de N-lauril sarcosina. Ao tampão de lise foi adicionado 100 µL/mL de proteinase K na concentração de 20 mg/mL seguido de incubação por 2h a 37°C. Logo após foram adicionados 100 µL de NaCl a 5M com incubação de 10 minutos, e em seguida adicionados 50 µL de CTAB/NaCl a 65°C por 20 minutos. Foram adicionados a amostra 1:1 da solução 24:1 de clorofórmio/álcool isoamílico, a amostra foi então homogeneizada com auxílio de vórtex e centrifugada 10000 rpm 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL e foi adicionado volume igual de isopropanol, a amostra permaneceu 30 minutos a -20°C e posteriormente foi centrifugada 10000 rpm 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo DNA foi lavado em 1 mL de etanol 70% em centrifugação a 10000 rpm 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado incubado em temperatura ambiente até a secagem completa. Foram adicionados 50µL de TE com incubação a 37°C ao precipitado para solubilizá-lo. As amostras foram dosadas no nano drop Thermo Fisher, diluídas e posteriormente quantificadas no Qubit Thermo Fischer para obter maior precisão. A integridade do DNA extraído foi avaliada em gel de agarose 0,6%.

4.17.3 Preparação da análise

Posteriormente 100ng de DNA extraído do fígado de camundongos WT, WTI, *Ebi3*^{-/-}C e *Ebi3*^{-/-}I e 100 ng de DNA de *S. mansoni* cepa LE (recuperada de WTI e *Ebi3*^{-/-}I) e LE-PZQ foram usados para quantificação do conteúdo de metilação do DNA usando o kit 5-mC DNA ELISA Zimoresearch, D5325 (Zimoresearch, Irvine, CA, EUA). A proporção de metilação foi obtida pela fórmula da regressão logarítmica obtida com os valores de absorvância da curva do padrão de DNA com proporções conhecidas de metilação:

$$\%5 - mC = e^{\left[\frac{(Absorvância-y)}{slope}\right]}$$

Após a reação as absorvâncias obtidas referentes às amostras de fígado foram inseridas na equação da curva padrão ($y = 0,09\ln(x) + 0,4776$; $R^2 = 0,9985$). Após a reação, as absorvâncias obtidas referentes às amostras dos vermes foram inseridas na equação da curva padrão ($y = 0,0593\ln(x) + 0,114$; $R^2 = 0,9942$).

4.18 Análise Estatística

O perfil parasitológico dos camundongos representou os animais da primeira perfusão, WTC (n = 12), WTI (n = 10), *Ebi3*^{-/-}C (n = 5) e *Ebi3*^{-/-}I (n = 15). Para ovos no intestino, o teste utilizado foi T não pareado com correção de Welch, não foi possível encontrar significância. Para ovos no fígado, o teste utilizado foi o Unpaired T com correção de Welch, encontramos significância de $p = 0,0029$. Para o número de parasitas por camundongo, o teste utilizado foi o Unpaired T com a correção de Welch, sem significância encontrada. Para o número de casais por camundongo, o teste usado foi o Unpaired T com a correção de Welch, sem significância encontrada. Para ovos por grama de fezes, o teste utilizado foi T não pareado com correção de Welch, a significância de $p < 0,0001$. Oviposição *in vitro* a partir de casais recuperados de *Ebi3*^{-/-}I e WT infectados, Teste Kruskal Wallis, pós-teste de Dunn, $p < 0,05$.

Para número de granulomas, o teste de Mann-Whitney apresentou significância de $p = 0,0001$. Para o volume de granulomas, T não pareado com correção de Welch apresentou significância de $p < 0,0001$.

A expressão de TETS e DNMTs no fígado de camundongos foi analisada pelo teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$. *DNMT1* $p = 0,0348$; *DNMT3A* $p = 0,0008$; *DNMT3B* $p = 0,0001$; *TET1* $p = 0,0041$; *TET2* $p = 0,0001$ e *TET3* $p = 0,0001$. A análise do isolado de cada grupo também foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$. WTC $p < 0,0001$; WTI $p < 0,0001$; *EBi3^{-/-}C* $p = 0,0015$ e *EBi3^{-/-}I* $p < 0,0001$. Essas análises representaram os animais das duas perfusões, WTC (n = 12), WTI (n = 10), *EBi3^{-/-}C* (n = 10) e *EBi3^{-/-}I* (n = 28).

A correlação de Spearman foi utilizada na matriz e nas correlações duplas, os resultados representaram os animais da primeira perfusão, exceto *EBi3^{-/-}C*, WTC (n = 12), WTI (n = 10), *EBi3^{-/-}C* (n = 10) e *EBi3^{-/-}I* (n = 15), porque todos os parâmetros foram testados para a primeira perfusão em animais infectados. O *EBi3^{-/-}C* foi integrado na matriz porque o camundongo controle não continha ovos no fígado, intestino ou fezes e os parâmetros parasitológicos foram os únicos dados que não obtivemos na segunda perfusão. Para resultados de correlações matriciais, os valores de p e coeficientes são plotados em uma tabela nos anexos. A correlação de Spearman entre número de granulomas e expressão de *TET3* foi significativa em *EBi3^{-/-}I*, $p = 0,0415$, e também em *EBi3^{-/-}I* a correlação de Spearman entre número de granulomas e expressão de *DNMT1* $p < 0,0001$.

O teste Anova one-way com pós-teste de Tukey, analisou as diferenças entre os tratamentos considerando a expressão de genes em *S. mansoni*, $p < 0,01$. Os seguintes genes foram significativos, *SmGCN5* $p = 0,0084$; *SmUSP7* $p < 0,0001$; *SmUSP22* $p < 0,0001$; *SmUSP46* $p = 0,0087$; *SmHDAC1* $p = 0,0002$; *SmHDAC8* $p = 0,0027$; e *SmMBD* $p < 0,0001$, foi usado *EIF4E* como gene calibrador. Em *S. mansoni* cepa LE recuperada de camundongo WT e *EBi3^{-/-}*.

O teste Anova one-way com pós-teste de Tukey, analisou as diferenças entre os tratamentos considerando a expressão de genes em *S. mansoni* cepa LE recuperada de camundongo WT e cepa LE-PZQ, $p < 0,01$. Os seguintes genes foram significativos, *SmUSP15* $p = 0,0003$; *SmUSP7* $p < 0,0001$; *SmUSP22* $p < 0,0001$; *SmUSP46* $p = 0,0001$; *SmUSP49-44* $p = 0,0022$; e *SmMBD* $p = 0,0001$, foi usado *EIF4E* como gene calibrador.

A expressão de miRNAs de *S. mansoni* foi significativa para miR-190-3p ($p = 0,0055$) e 5p ($p = 0,0033$), usando T não pareado com correção de Welch, $p < 0,01$. Para expressão dos miRNAs 31-3p, 31-5p, 122-3p e 122-5p em camundongo C57BL/6 WT e *EBi3^{-/-}* infectados com 100 cercárias, foi utilizado snU6 como calibrador e foi feito Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, $p < 0,05$. Essas análises representaram os animais das duas perfusões, WTC (n = 12), WTI (n = 10), *EBi3^{-/-}C* (n = 10) e *EBi3^{-/-}I* (n = 28).

As porcentagens de DNA de 5 mC de amostras de camundongos hepáticos representaram os animais da primeira perfusão, WTC (n = 12), WTI (n = 10), *EBi3^{-/-}*C (n = 5) e *EBi3^{-/-}*I (n = 15). Anova one-way test foi realizado, $p < 0,05$, a significância dos resultados avaliados foi $p = 0,0004$. Para a análise do conteúdo de 5-mC% no DNA de *S. mansoni* recuperado de C57BL/6 WT, C57BL/6 *EBi3^{-/-}* e casais da cepa resistente ao praziquantel, foi feito Kruskal Wallis, $p < 0,05$, pós-teste de Dunn.

5 Resultados

Para investigar as interações epigenéticas entre o *S. mansoni* e o hospedeiro mamífero, o presente trabalho foi dividido em três etapas principais: (i) a investigação dos efeitos parasitológicos do modelo C57BL/6 *EBi3*^{-/-}; (ii) se o parasito modularia mecanismos epigenéticos no hospedeiro e (iii) se o hospedeiro poderia afetar a expressão de genes relacionados a mecanismos epigenéticos do parasito. No sentido de auxiliar na melhor apresentação dos resultados obtidos, a seção resultados será apresentada dessa forma.

5.1 Avaliação parasitológica em camundongos C57BL/6 *EBi3*^{-/-} infectados por *S. mansoni*

5.1.1 Parâmetros parasitológicos

A carga parasitária em camundongos C57BL/6 *EBi3*^{-/-} experimentalmente infectados por *S. mansoni* foi estimada pela quantificação de vermes adultos recuperados pela perfusão sanguínea, pela contagem de ovos eliminados nas fezes e retidos nos órgãos.

Foram quantificados uma mediana de $480,9 \pm 107,5$ ovos/g de intestino nos camundongos *EBi3*^{-/-}I e $526,3 \pm 72,26$ ovos/g de intestino nos camundongos WTI, figura 10A. Embora o número de ovos agregados no intestino de camundongos WTI seja maior que em camundongos *EBi3*^{-/-}I, essa diferença não foi significativa. Foi obtido também uma média de $2735 \pm 413,6$ ovos/g de fígado nos camundongos *EBi3*^{-/-}I e 8178 ± 1310 ovos/g de fígado em camundongos WTI, que foram estatisticamente diferentes, com $p = 0,0029$, onde o WTI foi diferentemente maior que o *EBi3*^{-/-}I infectado em relação à quantidade de ovos agregados no fígado, figura 10B. No que diz respeito à eliminação de ovos nas fezes, foram quantificados uma mediana de $17,76 \pm 5,938$ em camundongos *EBi3*^{-/-}I e $135,8 \pm 9,181$ ovos/g de fezes foram contados em camundongos WTI. O número de ovos nas fezes diminuiu significativamente nos camundongos *EBi3*^{-/-}I, $p < 0,0001$, figura 10C.

O ensaio de oviposição *in vitro* realizado com vermes recuperados de camundongos *EBi3*^{-/-} e WT infectados com *S. mansoni*, mostrou que os casais recuperados de *EBi3*^{-/-} apresentavam menor postura de ovos que casais recuperados de WT infectados principalmente no intervalo de 96H, onde ocorre diferença estatística entre *EBi3*^{-/-}I-96H e WTI-96H, e não ocorre diferença entre WTI-96H e WTI-120H, mostrando que essa menor

postura de ovos não ocorre por causa da diminuição da fecundidade dos vermes com o passar das horas no meio de cultura, figura 10D.

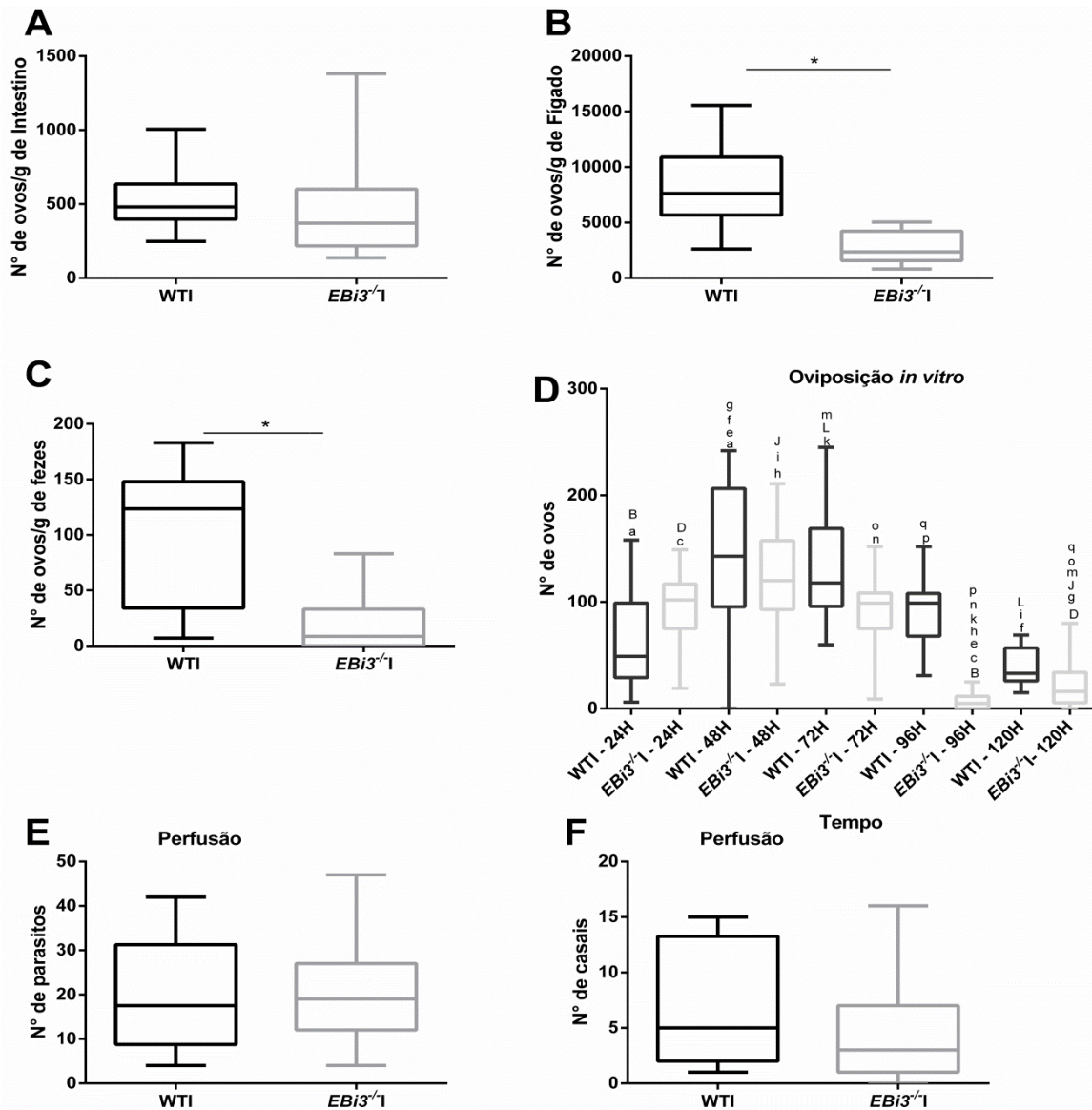


Figura 10: Parâmetros parasitológicos de camundongos $EBi3^{-/-}$ e WT infectados. A) Número de ovos recuperados do intestino de $EBi3^{-/-}$ e WT infectados por digestão com KOH, Teste Mann-Whitney, $p < 0,01$; B) Número de ovos recuperados do fígado de camundongos $EBi3^{-/-}$ e WT infectados Teste T com correção de Welch, $p < 0,01$; C) Número de ovos recuperados nas fezes de camundongos $EBi3^{-/-}$ e WT infectados, Teste Mann-Whitney, $p < 0,01$; D) Oviposição *in vitro* a partir de casais recuperados de $EBi3^{-/-}$ e WT infectados, Teste Kruskal Wallis, pós-teste de Dunn, $p < 0,05$; (a: WTI-24H vs. WTI-48H; B: WTI-24H vs. $EBi3^{-/-}$ -I-96H; c: $EBi3^{-/-}$ -I-24H vs. $EBi3^{-/-}$ -I-96H; D: $EBi3^{-/-}$ -I-24H vs. $EBi3^{-/-}$ -I-120h; e: WTI-48H vs. $EBi3^{-/-}$ -I-96H; f: WTI-48H vs. WTI-120H; g: WTI-48H vs. $EBi3^{-/-}$ -I-120H; h: $EBi3^{-/-}$ -I-48H vs. $EBi3^{-/-}$ -I-96H; i: $EBi3^{-/-}$ -I-48H vs. WTI-120H; J: $EBi3^{-/-}$ -I-48H vs. $EBi3^{-/-}$ -I-120H; k: WTI-72H vs. $EBi3^{-/-}$ -I-96H; L: WTI-72H vs. WTI-120H; m: WTI-72H vs. $EBi3^{-/-}$ -I-120H; n: $EBi3^{-/-}$ -I-72H vs. $EBi3^{-/-}$ -I-96H; o: $EBi3^{-/-}$ -I-72H vs. $EBi3^{-/-}$ -I-120H; p: WTI-96H vs. $EBi3^{-/-}$ -I-96H e q: WTI-96H vs. $EBi3^{-/-}$ -I-120H) E) Número de casais recuperados de $EBi3^{-/-}$ e WT infectados, Teste Mann-Whitney, $p < 0,01$; F) Número de parasitos recuperados de $EBi3^{-/-}$ e WT infectados, Teste T, $p < 0,01$. GraphPad Prism 6.

A carga parasitária de *S. mansoni* em camundongos selvagens experimentalmente infectados e camundongos *EBi3^{-/-}* foi estimada pela quantificação de vermes adultos recuperados por perfusão do sistema portal hepático. Um total de 100 cercárias foi inoculado por camundongo; uma média de $19,96 \pm 2,051$ vermes foi recuperada nos camundongos *EBi3^{-/-}* e $19,33 \pm 2,726$ nos camundongos WTI. Nenhuma diferença estatística foi observada na recuperação de vermes entre os grupos experimentais, figura 10E. Casais vermes também foram quantificados, mas nenhuma diferença foi detectada entre camundongos *EBi3^{-/-}* (Mediana: $4,826 \pm 0,8906$) e WTI (Mediana: $6,833 \pm 1,256$), figura 10F.

5.1.2 Avaliação da área e volume do granuloma esquistossomótico

Foram feitas micrografias de 20 campos de cada camundongo no aumento de 20X. Posteriormente foi quantificado o número de granulomas presentes nas micrografias e o volume dos granulomas foi medido. O número de granulomas de camundongos WTI (mediana = 57,5) foi significativamente maior do que em camundongos *EBi3^{-/-}* (mediana = 22) com $p = 0,0001$, figura 11A. Nos camundongos WTI, o volume de granulomas também foi maior que nos camundongos *EBi3^{-/-}*, com $p < 0,0001$, figura 11B.

O dano hepático é maior na presença da resposta imune realizada pelo EBi3 e, se compararmos o aspecto dos granulomas do WTI com o *EBi3^{-/-}*, veremos que nos camundongos nocaute a forma dos granulomas é frequentemente difusa e desorganizada. Nos animais WTI, os granulomas são concêntricos, com maior presença de matriz extracelular. Em animais WTI havia muitos granulomas fundidos perifericamente, figura 12.

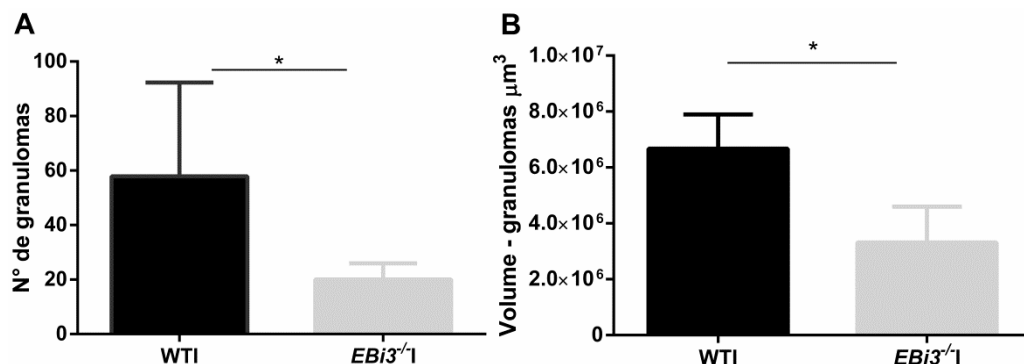


Figura 11: Análise histológica e morfométrica dos granulomas hepáticos. A) Número de granulomas encontrados em 20 campos no aumento de 20X em camundongos WT e *EBi3^{-/-}* infectados, teste Mann Whitney, $p < 0,05$ B) Volume dos granulomas encontrados em WT e *EBi3^{-/-}* infectados Teste T com correção de Welch, $p < 0,05$ GraphPad Prism 6.

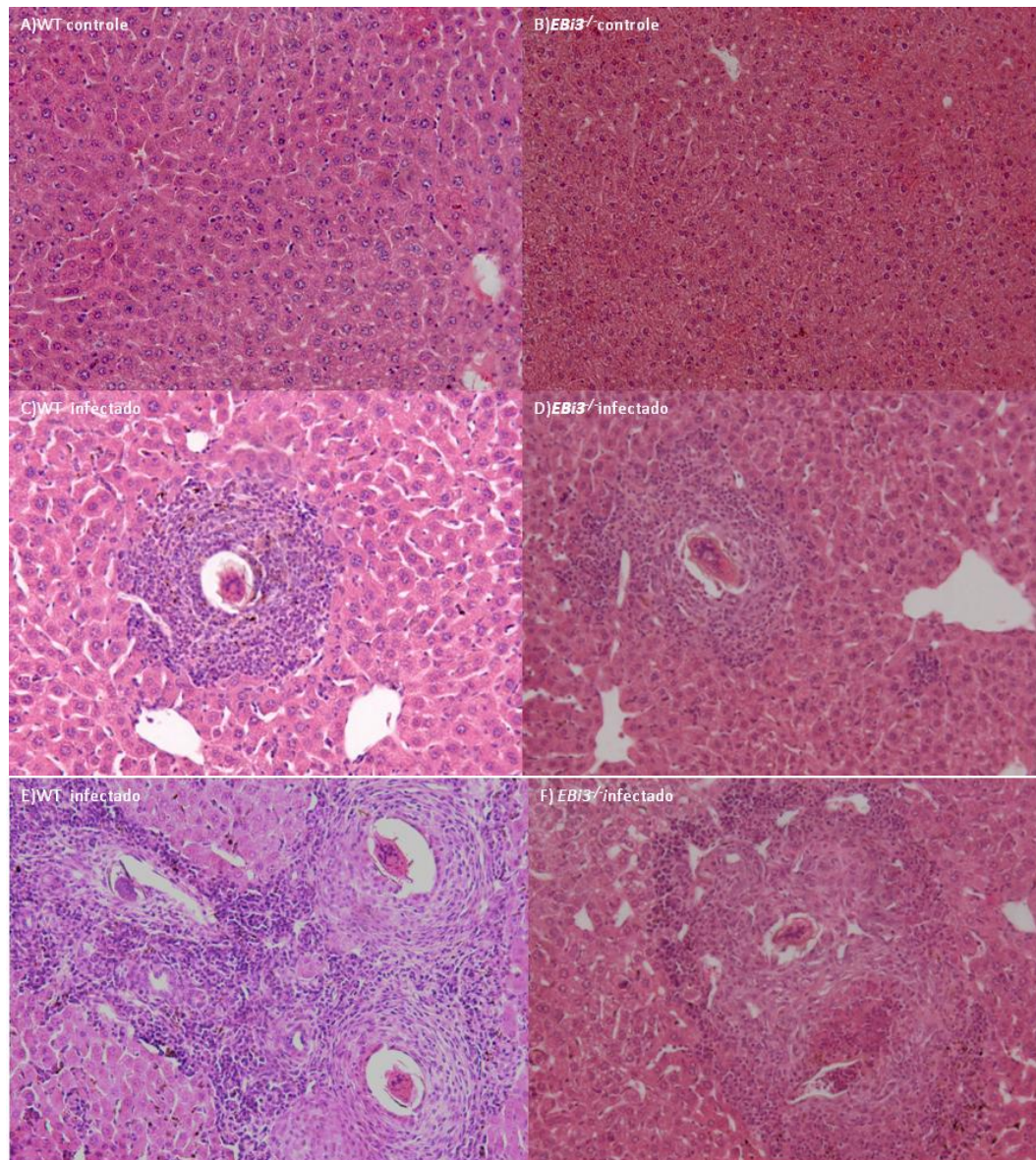


Figura 12: Imagens representativas das lâminas de fígado: A) WT controle, B) *EBi3*^{-/-} controle, C) WT infectado com granuloma, D) *EBi3*^{-/-} infectado com granuloma, E) Fusão de granuloma em WT infectado, F) Fusão de granuloma em *EBi3*^{-/-} infectado.

5.2 *S. mansoni* modula mecanismos epigenéticos no hospedeiro?

5.2.1 Expressão de genes envolvidos na metilação de manutenção, metilação *de novo* e na demetilação de DNA em C57BL/6 WT e *EBi3*^{-/-} (fígado)

A expressão gênica de *DNMT1* foi quantificada usando o gene *HPRT1* como calibrador, essa enzima está relacionada com a manutenção da metilação já existente durante o processo de replicação, copiando os padrões da fita molde para a nova fita, está mais

expressa no período antes da mitose, reconhece a fita hemi-metilada (Bian *et al.*, 2013). Não houve diferença estatística entre os grupos pela análise feita no teste Kruskal Wallis, $p < 0,05$, os animais *EBi3^{-/-}* infectados apresentaram menores níveis médios que os selvagens infectados, figura 13A.

DNMT3A e *B* são enzimas que estão relacionadas à criação de novos padrões de metilação no DNA, são *de novo* metiltransferases. Podemos perceber que ocorreu aumento de cinco vezes na expressão relativa de *DNMT3A* em camundongos WTI em relação a camundongos WTC, no grupo selvagem a infecção induziu o aumento da expressão desse gene. Existiu também uma diferença entre WTI e *EBi3^{-/-}C*, onde a nível de expressão de WTI foi maior, figura 13B. A análise de expressão de *DNMT3B* mostrou que existiu diferença estatística e que entre o grupo WTI e o grupo *EBi3^{-/-}I*, ou seja, a diminuição da expressão de 3,87 vezes em *DNMT3B* está ligado a alteração no sistema imune do hospedeiro em *EBi3^{-/-}I*. Também foi possível observar que a infecção por *S. mansoni* induziu diminuição da expressão desse gene, pois *EBi3^{-/-}C* apresentou 1,3 vezes níveis maiores que *EBi3^{-/-}I*, figura 13C.

As demetilases de DNA também foram avaliadas, *TET1* foi diferencialmente expressa entre os camundongos WTC e WTI, WTI apresentou 2,9 vezes mais expressão que WTC, houve diferença entre os grupos WTI e *EBi3^{-/-}C*, onde o nocaute controle apresentou menores níveis que o selvagem infectado, figura 13D. A expressão de *TET2* mostrou que existe diferença entre os controles, indicando que a própria construção do nocaute influencia na expressão desses genes, WTC foi 1,8 vezes mais expresso que *EBi3^{-/-}C*, figura 13E. Houve também diferença entre os grupos WTC e *EBi3^{-/-}I*, nesse caso, o grupo selvagem controle foi mais expresso. *TET3* foi diferencialmente expressa entre os grupos WTC e *EBi3^{-/-}C*; WTC e *EBi3^{-/-}I*; WTI e *EBi3^{-/-}C* e WTI e *EBi3^{-/-}I*. Considerando os dois grupos não infectados, o nocaute foi 4,4 vezes menos expresso que o selvagem. Considerando os dois grupos infectados, o infectado nocaute foi 2 vezes menos expresso que o infectado selvagem, figura 13F.

Dos genes analisados *TET3* foi o que apresentou as maiores níveis nos grupos WTC, WTI e *EBi3^{-/-}I*. Em *EBi3^{-/-}C* o gene que apresentou níveis maiores foi *TET2*. *DNMT1* foi o gene menos expresso em todos os grupos.

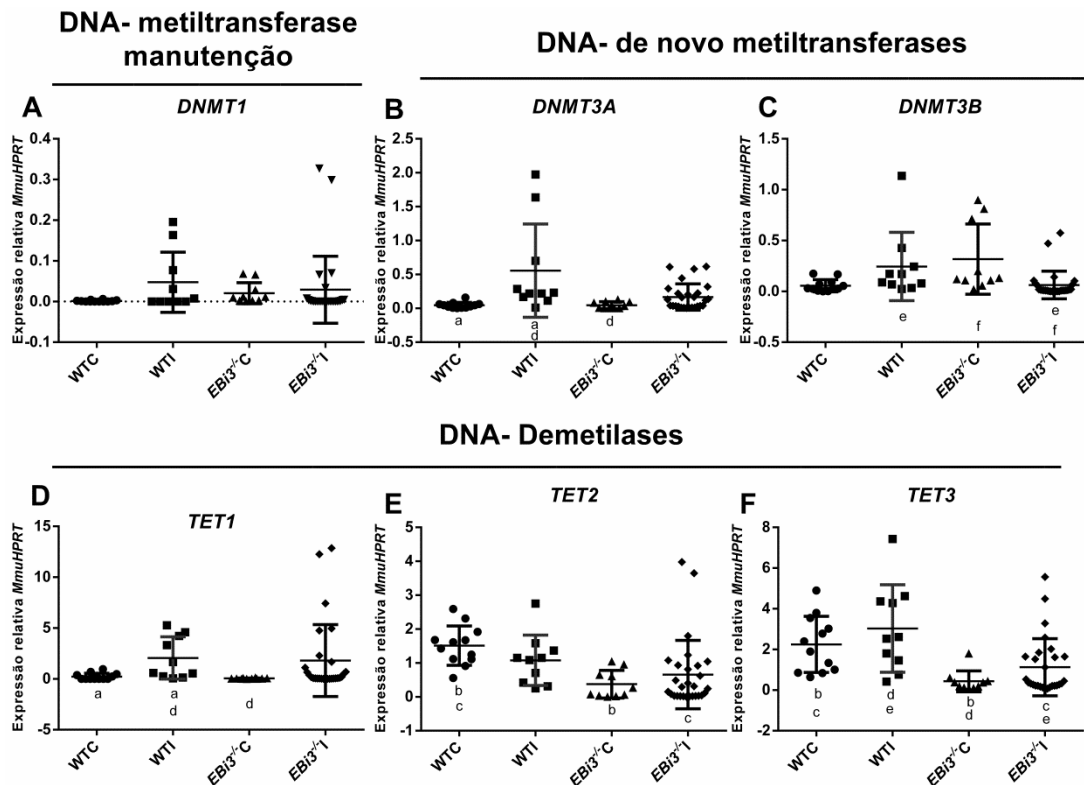


Figura 13: Expressão relativa de *DNMT1*, *3A*, *3B*, *TET1*, *2* e *3* em camundongos C57BL/6 WT controle e infectado, C57BL/6 *EBi3^{-/-}* controle e infectado. *HPRT1* foi utilizado como gene calibrador, Kruskal Wallis, pós-teste de Dunn, $p < 0,05$; GraphPad Prism 6. Legenda: a: WTC vs. WTI; b: WTC vs. *EBi3^{-/-}C*; c: WTC vs. *EBi3^{-/-}I*; d: WTI vs. *EBi3^{-/-}C*; e: WTI vs. *EBi3^{-/-}I* e f: *EBi3^{-/-}C* vs. *EBi3^{-/-}I*.

5.2.2 Diferença entre metilação e demetilação entre os grupos WTC, WTI, *EBi3^{-/-}C* e *EBi3^{-/-}I*

Podemos observar pela figura 14 que os genes responsáveis pela demetilação estão mais expressos que os responsáveis pela metilação em todos os grupos. O grupo WTC apresentou diferença estatística de quase todas as *DNMTs* contra quase todas as *TETs*. É possível perceber também que a infecção por *S. mansoni* fez com que os níveis de expressão das *DNMTs* aumentassem, culminando na perda da diferença estatística observada entre *DNMTs* e *TETs* no grupo selvagem controle, a esquistossomose pode ter aumentado as níveis de metilação do DNA, com particular queda na expressão de *TET2* e aumento na expressão de *DNMT3A* que ocasionou a equivalência dos níveis com *TET2* e *3* principalmente.

Nos grupos *EBi3^{-/-}* ocorreu o oposto, o grupo *EBi3^{-/-}C* apresentava níveis maiores de expressão de demetilases mas com pouca significância estatística. Já no grupo *EBi3^{-/-}I* ocorreu um aumento na expressão das *TETs*, principalmente *TET1* que no controle apresentava níveis

similares a observadas em *DNMTs* e em camundongos infectados esses níveis aumentaram expressivamente. Ocorreu também em *EBi3^{-/-}* um ligeiro aumento em *DNMT3A*, apresentando diferença em relação a *DNMT1*, assim como no grupo WTI, a esquistossomose pode ter induzido o aumento da expressão desse gene independentemente do sistema imune do hospedeiro.

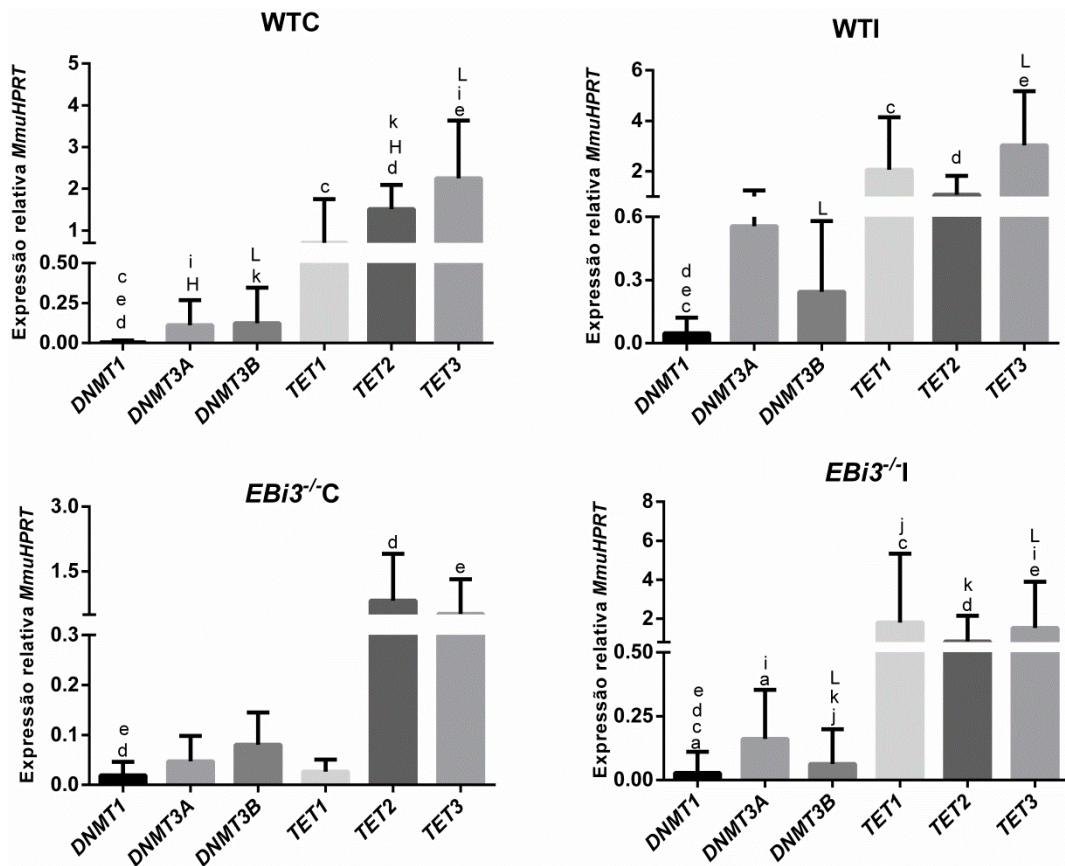


Figura 14: Comparação entre metilação e demetilação em A) WTC; B) WTI; C) *EBi3^{-/-}*-C e D) *EBi3^{-/-}*-I. *HPRT1* foi usado como gene calibrador, GraphPad Prism6 - Kruskal Wallis, pós-teste de Dunn, $p < 0,05$. Legenda: a: *DNMT1* vs. *DNMT3A*; b: *DNMT1* vs. *DNMT3B*; c: *DNMT1* vs. *TET1*; d: *DNMT1* vs. *TET2*; e: *DNMT1* vs. *TET3*; f: *DNMT3A* vs. *DNMT3B*; g: *DNMT3A* vs. *TET1*; h: *DNMT3A* vs. *TET2*; i: *DNMT3A* vs. *TET3*; j: *DNMT3B* vs. *TET1*; k: *DNMT3B* vs. *TET2*; L: *DNMT3B* vs. *TET3*; m: *TET1* vs. *TET2*; n: *TET1* vs. *TET3* e o: *TET2* vs. *TET3*.

5.2.3 Correlação entre a expressão de *DNMTs* e *TETs* e o volume ou número de granulomas

As correlações foram feitas para detectar se dano hepático causado pelo número e volume de granulomas poderia induzir uma tendência positiva ou negativa sobre a expressão de genes com funções epigenéticas no fígado do camundongo. Foi feita correlação de Spearman, com $p < 0,05$, para cada gene (*DNMT1*, *3A* e *B* e *TET1*, *2* e *3*), o valor da expressão de cada gene de um dado camundongo foi relacionado com o volume médio ou com o número dos granulomas encontrados no respectivo camundongo e foi verificado se existe alguma relação entre a alteração na expressão gênica e a dimensão do dano hepático. Podemos observar pela figura 15 que existe correlação negativa decrescente entre a expressão gênica de *DNMT1* e o número de granulomas hepáticos encontrados nas lâminas de camundongos *EBi3*⁻¹, ($R = -0,4359$) e $p < 0,0001$.

Correlação: expressão relativa de DNA metiltransferase de manutenção versus volume e número de granulomas hepáticos

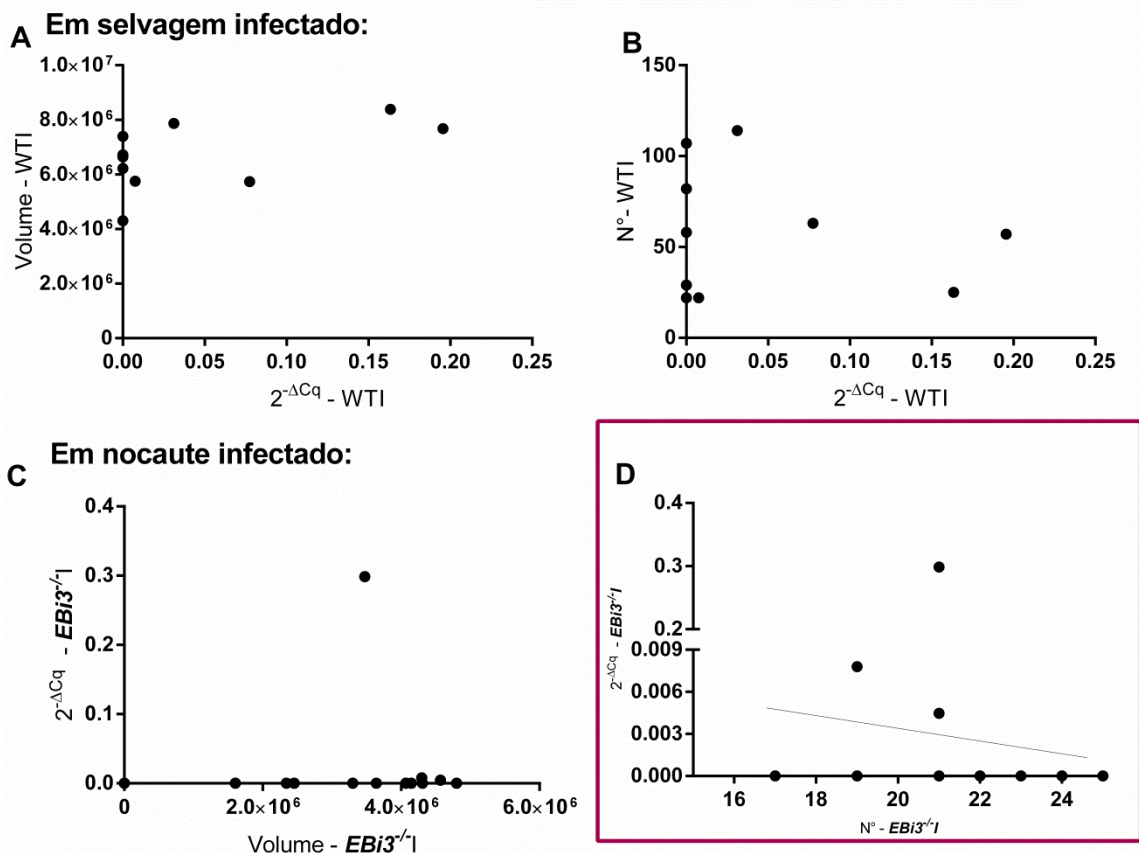


Figura 15: Correlação de Spearman entre a expressão de *DNMT1*, o volume médio dos granulomas e o número médio de granulomas dos grupos de camundongos infectados WT (letra A e B) e *EBi3*⁻¹ (letra C e D). GraphPad Prism 6, $p < 0,05$.

A análise de correlação da expressão gênica de *DNMT3A* em relação ao volume e número de granulomas hepáticos não foi estatisticamente significativa de acordo com a figura 16, com $p < 0,05$.

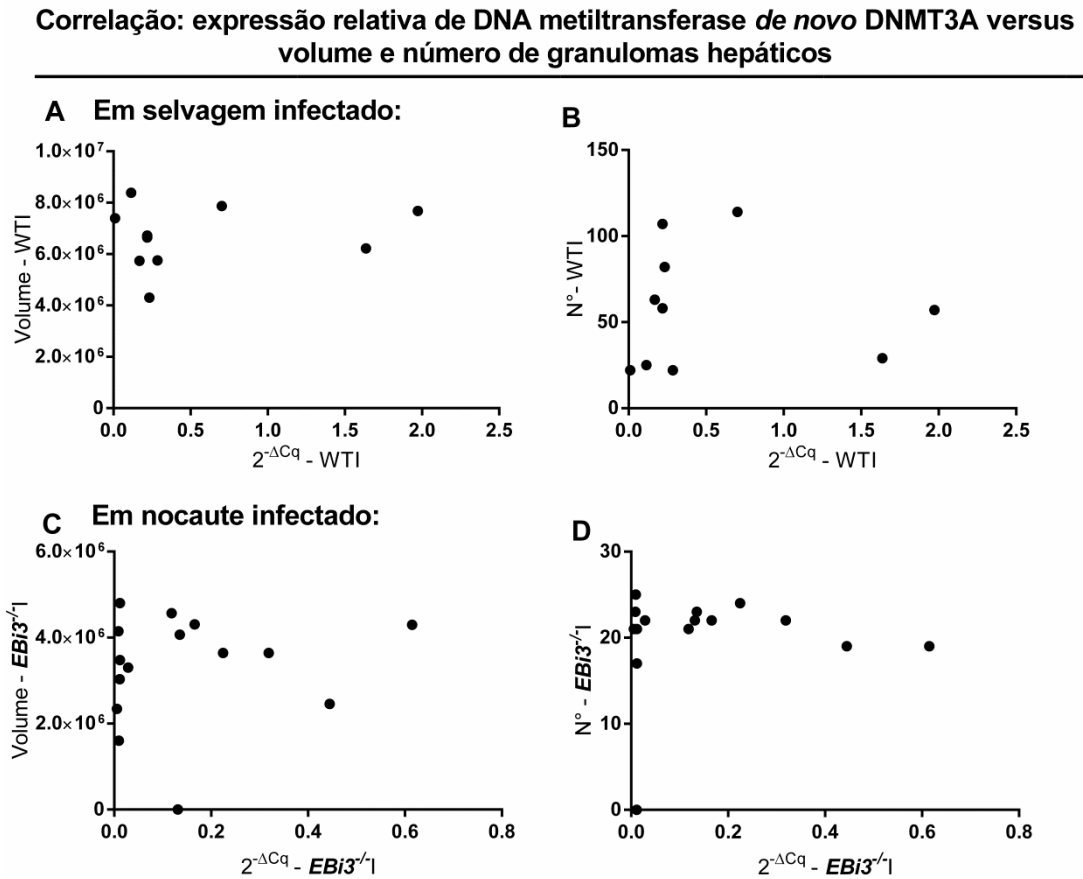


Figura 16: Correlação de Spearman entre a expressão de *DNMT3A*, o volume médio dos granulomas e o número médio de granulomas dos grupos de camundongos infectados WTI (letra A e B) e *EBi3*^{-/-} (letra C e D). GraphPad Prism 6, $p < 0,05$.

Foi feita correlação entre a expressão de *DNMT3B* e o volume e número médio dos granulomas de camundongos WTI e *EBi3*^{-/-}. Podemos observar pela figura 17 que não houve significância estatística desse gene em relação aos parâmetros parasitológicos testados.

Correlação: expressão relativa de DNA metiltransferase *de novo* DNMT3B versus volume e número de granulomas hepáticos

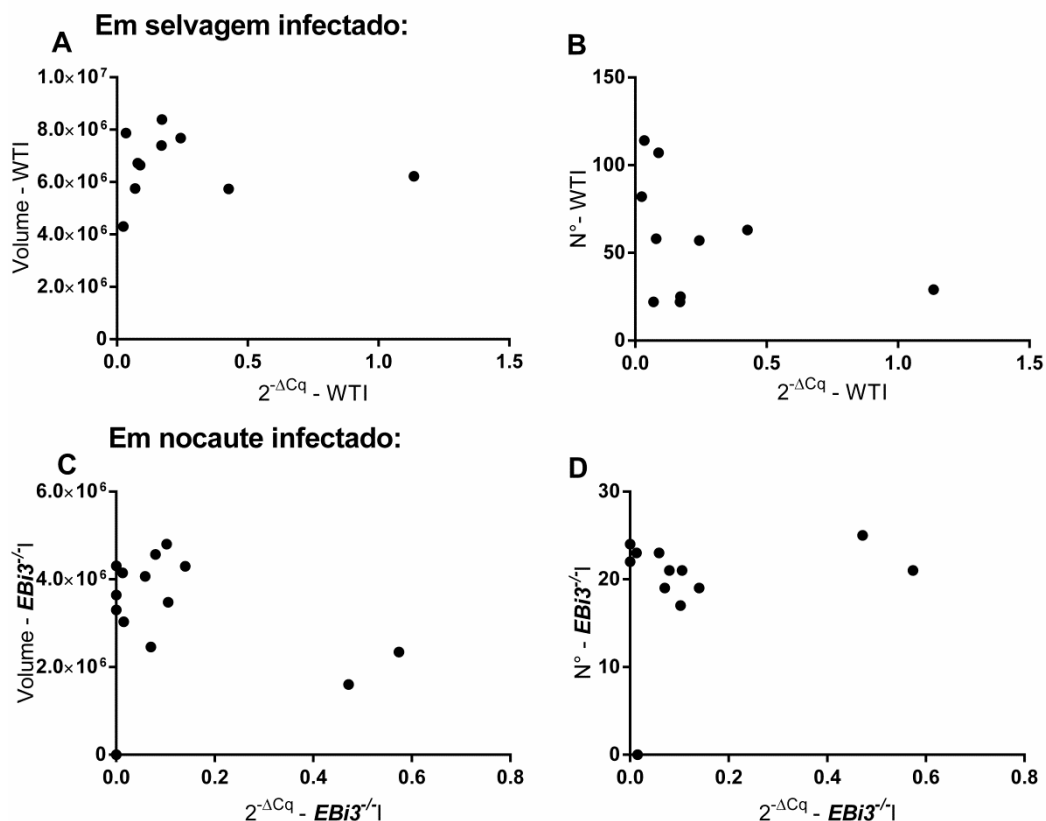


Figura 17: Correlação de Spearman entre a expressão de *DNMT3B*, o volume médio dos granulomas e o número médio de granulomas dos grupos de camundongos infectados WTI (letra A e B) e *EBi3*⁻¹ (letra C e D). GraphPad Prism 6, $p < 0,05$.

Foram feitas correlações entre a expressão dos genes relacionados à demetilação do DNA e os parâmetros parasitológicos volume e número médio dos granulomas. Considerando o gene *TET1* podemos observar que não houve correlação entre o volume médio nem entre o número médio de granulomas e o nível de expressão em camundongos em nenhum dos grupos analisados, figura 18.

Correlação: expressão relativa de DNA Demetilase TET1 versus volume e número de granulomas hepáticos

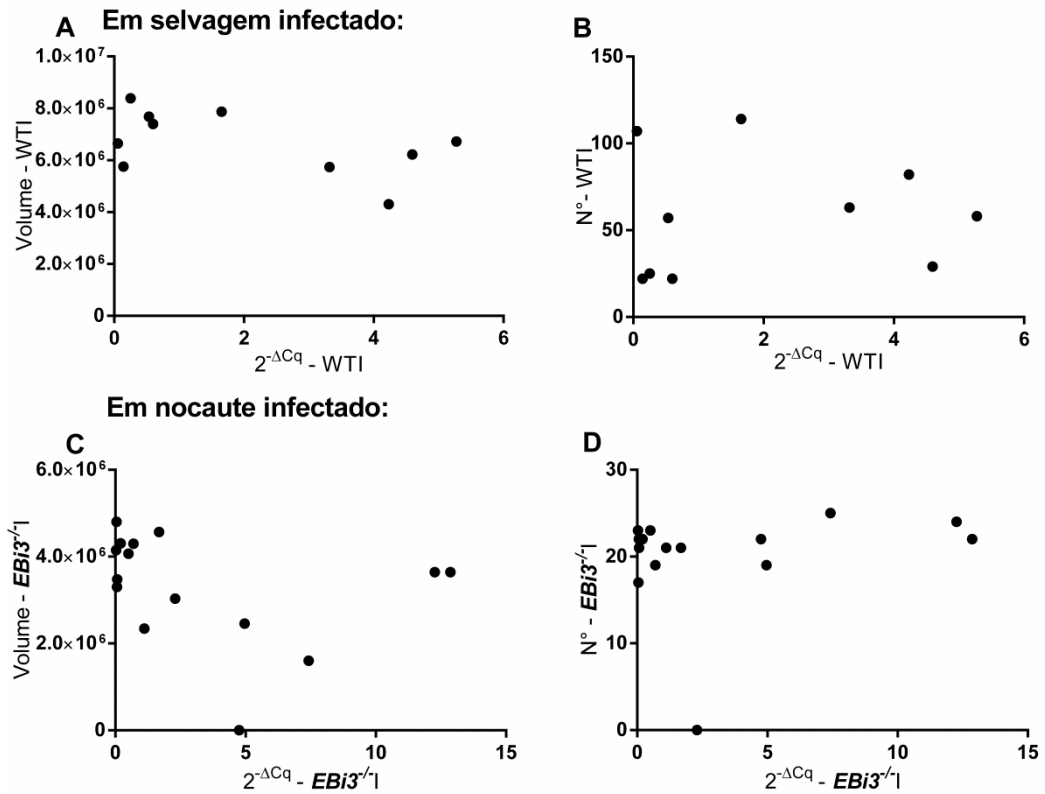


Figura 18: Correlação de Spearman entre a expressão de *TET1*, o volume médio dos granulomas e o número médio de granulomas dos grupos de camundongos infectados WTI (letra A e B) e *EBi3*^{-/-} (letra C e D). GraphPad Prism 6, $p < 0,05$.

Foi feita correlação entre a expressão de *TET2* e o volume e número médio dos granulomas de camundongos WTI e *EBi3*^{-/-}. Podemos observar pela figura 19 que não houve significância estatística desse gene em relação aos parâmetros parasitológicos testados.

Correlação: expressão relativa de DNA Demetilase TET2 versus volume e número de granulomas hepáticos

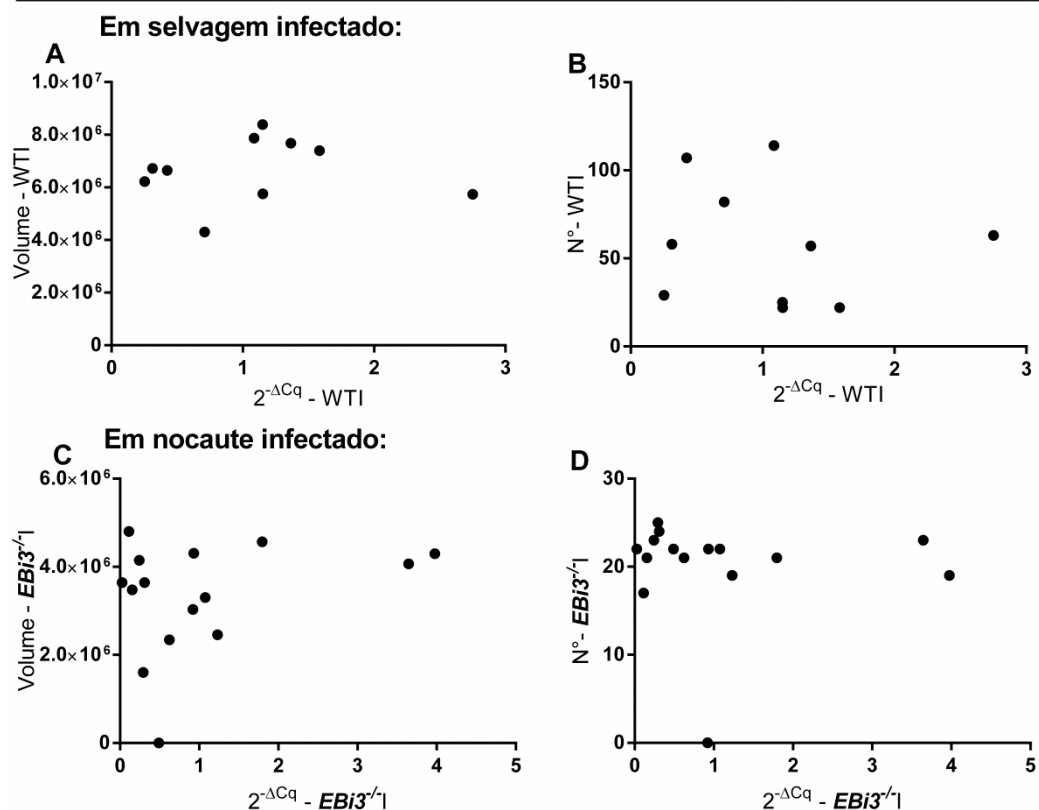


Figura 19: Correlação de Spearman entre a expressão de *TET2*, o volume médio dos granulomas e o número médio de granulomas dos grupos de camundongos infectados WTI (letra A e B) e *EBi3^{-/-}* (letra C e D). GraphPad Prism 6, $p < 0,05$.

Foi feita correlação entre a expressão de *TET3* e o volume e número médio dos granulomas de camundongos WTI e *EBi3^{-/-}*. Em relação ao gene *TET3* podemos observar que houve correlação negativa decrescente ($R = -0,5218$) entre o volume médio e o nível de expressão em camundongos *EBi3^{-/-}*, ($p = 0,0415$), figura 20.

Correlação: expressão relativa de DNA Demetilase TET3 versus volume e número de granulomas hepáticos

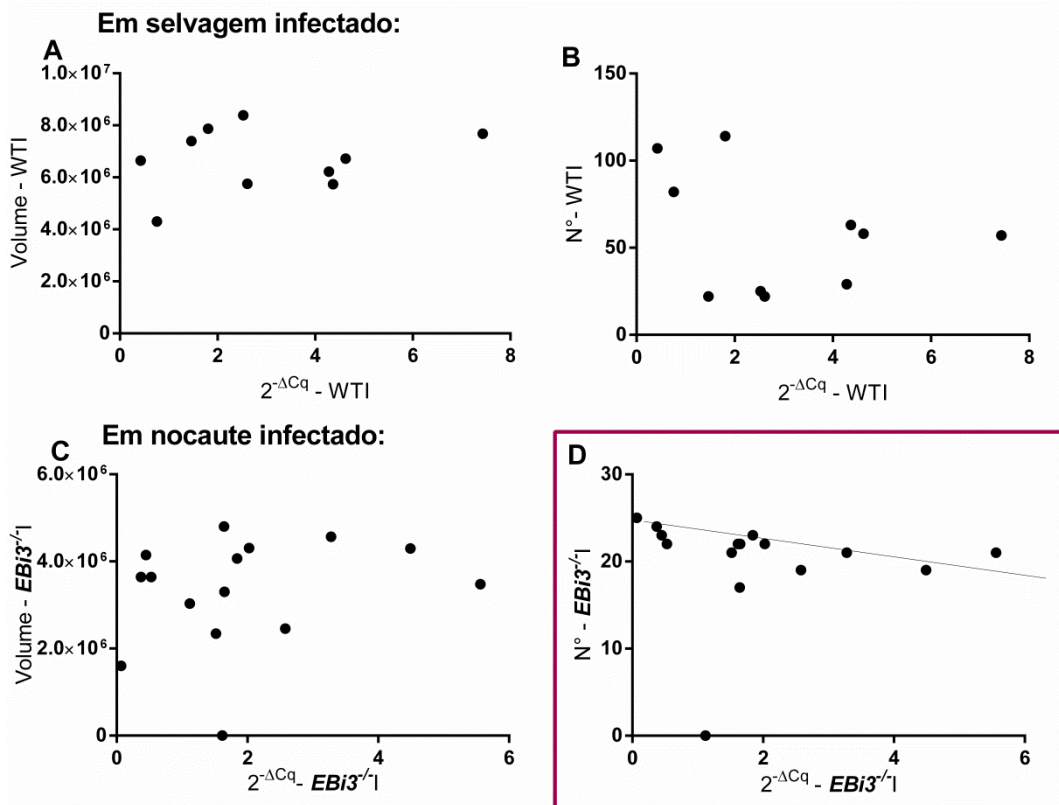


Figura 20: Correlação de Spearman entre a expressão de *TET3*, o volume médio dos granulomas e o número médio de granulomas dos grupos de camundongos infectados WTI (letra A e B) e *EBi3^{-/-}* (letra C e D). GraphPad Prism 6, $p < 0,05$.

5.2.4 Avaliação do efeito do *S. mansoni* no conteúdo de metilação do DNA (5-mC%) em fígado de camundongo C57BL/6 WT e C57BL/6 *EBi3^{-/-}*

Foi feito a quantificação da porcentagem de metilação das citosinas no DNA do fígado dos camundongos WTC, WTI, *EBi3^{-/-}C* e *EBi3^{-/-}I* por ELISA, a partir de uma curva com concentrações de DNA e porcentagens de metilação de citosinas conhecida, com auxílio de anticorpo anti-metilcitosina. Pela figura 21 podemos observar que existe uma diferença no conteúdo de metilação (5-mC) do DNA intrínseca entre os controles, o grupo *EBi3^{-/-}C* possui as citosinas do DNA mais metiladas que o grupo WTC em 1,6 vezes. Ocorreu também diferença entre os grupos *EBi3^{-/-}C* e *EBi3^{-/-}I*, em que exclusivamente em camundongos *EBi3^{-/-}* a infecção com *S. mansoni* culminou em redução nas taxas do conteúdo de metilação das citosinas (5-mC). Não houve diferença na metilação das citosinas do DNA em camundongos

WTC e WTI, não houve também diferença entre os dois grupos de camundongos infectados *EBi3^{-/-}I* e WTI.

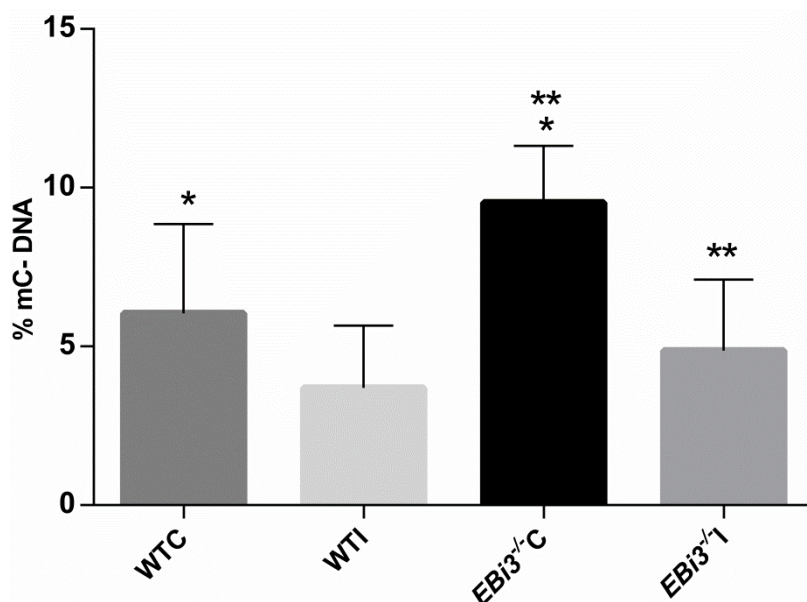


Figura 21: Conteúdo de 5-mC% no DNA do fígado de C57BL/6 WTC, WTI, *EBi3^{-/-}C* e *EBi3^{-/-}I*. Foi feito Anova one-way, $p < 0,05$, pós-teste de Tukey.

5.2.5 Expressão relativa dos miRNAs (fígado) em C57BL/6 WT e *EBi3^{-/-}* infectados e não infectados a partir de qRT-PCR

Neste trabalho analisamos a expressão do miR-31-3p no fígado dos camundongos C57BL/6 WT e *EBi3^{-/-}* infectados e não infectados, podemos observar que houve diferença estatística entre os dois grupos infectados somente para este miRNA com $p = 0,0224$. Os fígados dos camundongos WTI apresentaram uma expressão 3,3 vezes maior que a expressão encontrada nos fígados de *EBi3^{-/-}I*. Neste trabalho o miR-31-3p apresentou maiores níveis de expressão em camundongos infectados com *S. mansoni*, figura 22A.

Não foi observado diferença estatística para os miR-31-5p, 122-3p e 122-5p nas condições experimentais empregadas, figura 22B-D. miR-31-3p apresentou os seguintes valores médios de expressão: WTC, 0,04130; WTI, 0,08467; *EBi3^{-/-}C*, 0,03515 e *EBi3^{-/-}I*, 0,02531. O miR-31-5p apresentou os seguintes valores médios de expressão: WTC, 1,959; WTI, 4,644; *EBi3^{-/-}C*, 1,648 e *EBi3^{-/-}I*, 0,3859. O miR-122-3p apresentou os seguintes valores médios de expressão: WTC, 17,79; WTI, 32,59; *EBi3^{-/-}C*, 19,26 e *EBi3^{-/-}I*, 34,3. O miR-122-

5p apresentou os seguintes valores médios de expressão: WTC, 182,3; WTI, 207,7; *Ebi3*^{-/-}C, 119 e *Ebi3*^{-/-}I, 126,5. Podemos observar pela figura que a fita 5p é mais expressa em ambos miRNAs 31 e 122.

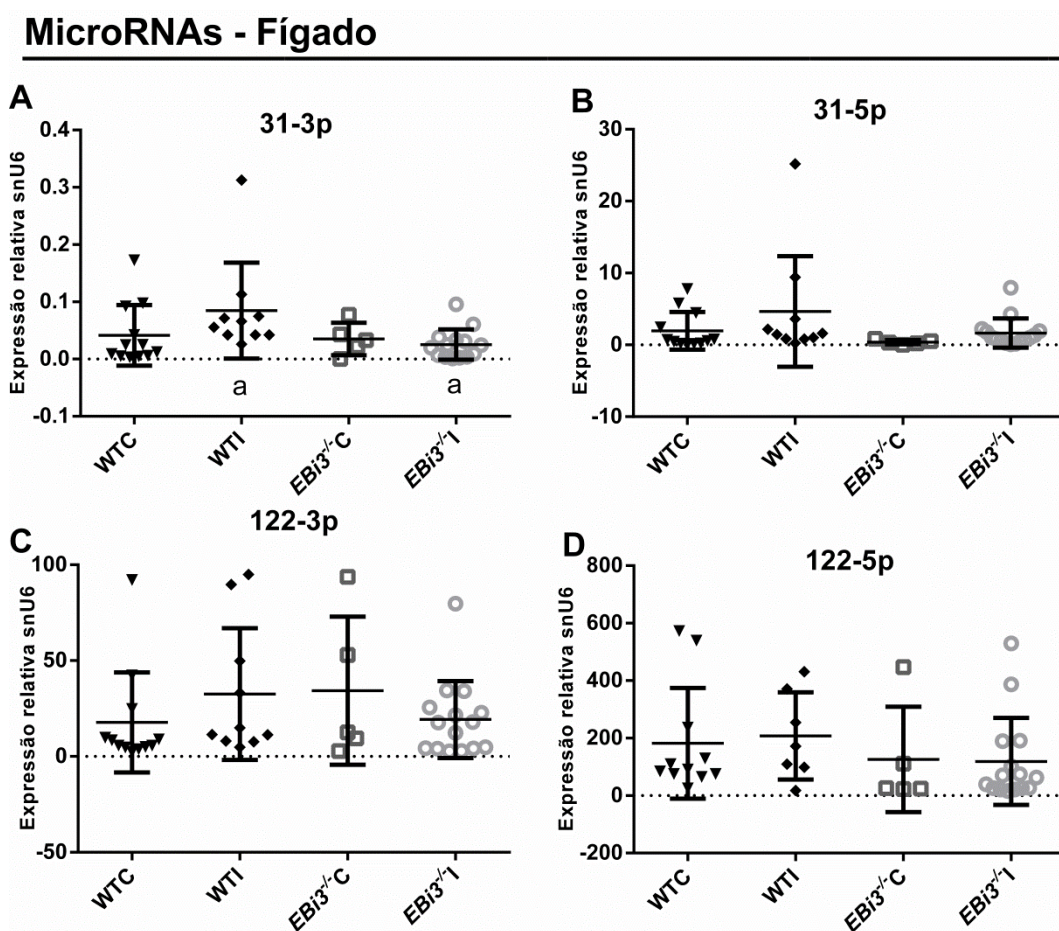


Figura 22: Expressão dos miRNAs 31-3p, 31-5p, 122-3p e 122-5p em camundongo C57BL/6 WT e *Ebi3*^{-/-} infectados com 100 cercárias. Foi utilizado snU6 como calibrador. Foi feito Kruskal-Wallis pós-teste de Dunn, $p < 0,05$.

5.2.6 Matriz de correlação entre os parâmetros parasitológicos e as expressões gênicas em WTC, WTI, *Ebi3*^{-/-}C e *Ebi3*^{-/-}I

Foi feito uma matriz de correlação comparando os parâmetros, (tais como metilação do DNA – 5-mC, expressão de alguns genes e miRNAs, dentre outros) de cada camundongo entre si. As células das tabelas referentes a p-valor estão coloridas de roxo onde existe diferença estatística entre os parâmetros (Anexo). O parâmetro expressão de *TET2* foi o que se correlacionou melhor com os outros no grupo WTC, considerando $p < 0,05$ de acordo com as tabelas 5 e 6 presentes na seção anexos. *TET2* apresentou correlação positiva com *TET3*,

miR31-3p e miR122-3p. Além disso, expressão de *TET3* se correlacionou positivamente com a expressão de *DNMT3A* e o miR31-3p também apresentou correlação positiva com o miR122-3p.

O grupo WTI apresentou menos correlações entre seus parâmetros do que o seu controle WTC. Em WTI, a expressão de *DNMT1* se correlacionou positivamente com ovos nas fezes, a expressão de miR122-5p se correlacionou negativamente com *DNMT3B* e positivamente com o número de ovos no intestino. Sendo que, ovos no fígado e no intestino se correlacionaram positivamente entre si, tabelas 7 e 8 presentes na seção anexos.

O grupo *EBi3^{-/-}C* foi o que apresentou menos correlações entre os parâmetros considerando os quatro grupos analisados. Neste grupo a expressão de *TET2* se correlacionou positivamente com a expressão de *TET3*. A expressão de *DNMT1* se correlacionou positivamente com o conteúdo de metilação (5-mC) do fígado e com a expressão do miR122-3p, tabelas 9 e 10 presentes na seção anexos.

O grupo *EBi3^{-/-}I* foi o grupo que apresentou maior número de correlações entre os parâmetros, tabelas 11 e 12 presentes na seção anexos. A expressão de *TET1* se correlacionou negativamente com *DNMT1*. *TET3* se correlacionou positivamente com *TET2*, *DNMT1*, e negativamente com o número de granulomas e com a expressão de miR31-3p e 122-3p. A expressão de *DNMT1* se correlacionou positivamente com ovos nas fezes e negativamente com a expressão de miR31-5p e 122-3p. O volume dos granulomas se correlacionou positivamente com o número de ovos nas fezes. O número de ovos no intestino se correlacionou positivamente com número de granulomas encontrados no fígado. O miR122-3p se correlacionou positivamente com número de granulomas encontrados no fígado e com a expressão do miR122-5p.

A figura 23 sumariza todas as correlações de Spearman que apresentaram significância estatística com $p < 0,05$. Podemos perceber pela figura que o grupo *EBi3^{-/-}I* foi o que apresentou maior número de correlações, nos outros grupos ocorre predominância de correlações positivas, já no grupo *EBi3^{-/-}I* ocorreu um aumento de correlações negativas entre os parâmetros analisados. Como o grupo *EBi3^{-/-}C* apresentou número similar de correlações comparando com WTC e WTI, podemos afirmar que a interação entre o sistema imune alterado com a infecção está aumentando o número de correlações observado no grupo *EBi3^{-/-}I*.

Em relação à expressão de *SmUSP22*, foi possível observar que assim como a *SmUSP7*, ocorreu uma diferença sexo-específica em que o macho é 4,6 vezes *up* regulado em relação a fêmea controle que foi perdida nos recuperados de camundongo *EBi3^{-/-}*. O macho recuperado de *EBi3^{-/-}* é 7,2 vezes *down* regulado em relação ao macho controle, figura 24C.

O gene de USPs que em *S. mansoni* mais sofreu influência do sistema imune do hospedeiro foi o *SmUSP46*. Foi possível observar diferença entre macho e fêmea controles, o macho foi 2,6 vezes *up* regulado se comparado com a fêmea. Ocorreu também diferença entre os dois grupos de fêmeas, a fêmea recuperada de *EBi3^{-/-}* foi 9,1 vezes *down* regulada comparando com a fêmea controle. Também foi possível observar diferença entre os dois grupos de machos, o macho recuperado de *EBi3^{-/-}* foi 7,4 vezes *down* regulado comparando com o macho controle. Esta USP foi a única a apresentar diferença sexo-específica entre o macho e a fêmea recuperados de camundongo *EBi3^{-/-}*, o macho recuperado de *EBi3^{-/-}* foi 3,2 vezes *up* regulado comparando com a fêmea recuperada de *EBi3^{-/-}*, figura 24D.

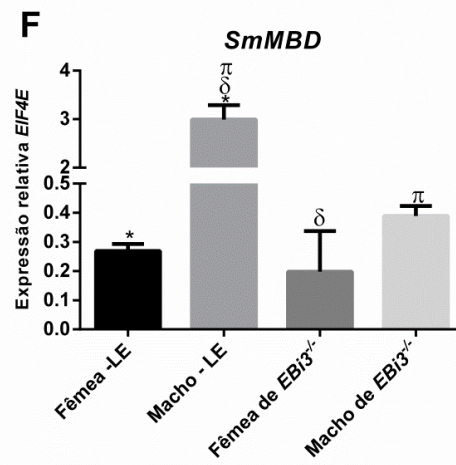
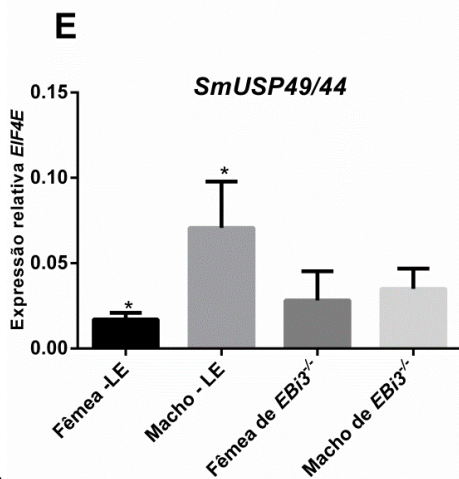
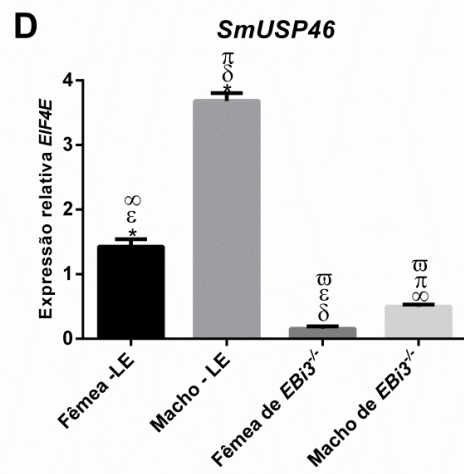
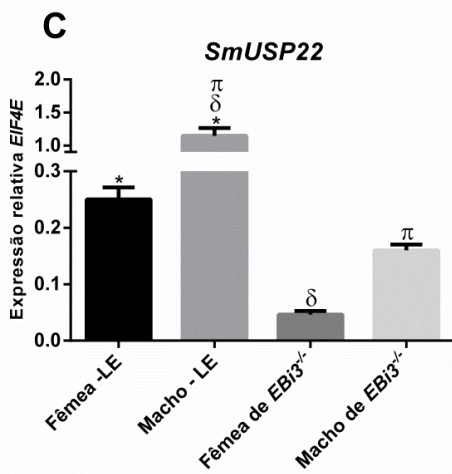
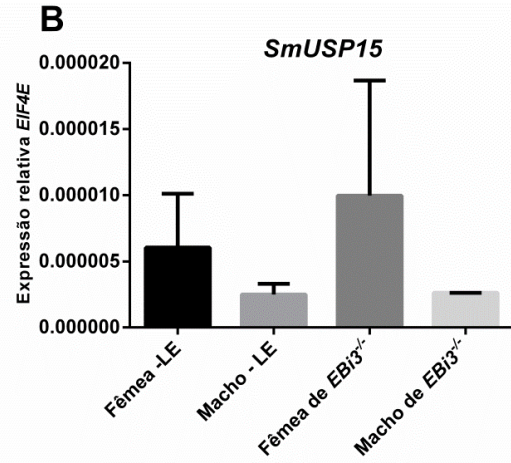
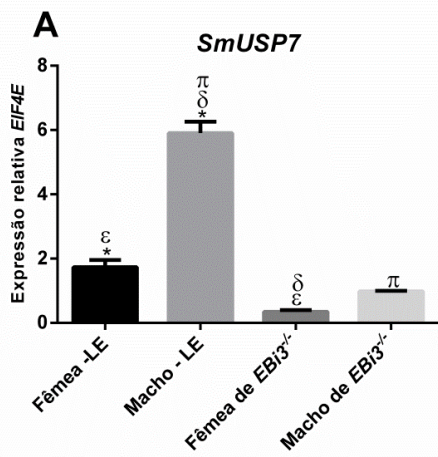
O parálogo *SmUSP49-44* apresentou diferença apenas entre fêmeas e machos do grupo controle, machos foram 4,2 vezes *up* regulados comparando com as fêmeas, essa diferença foi perdida nos parasitos recuperados de camundongo *EBi3^{-/-}*, figura 24E.

SmMBD é uma proteína *metil CpG binding domain* que neste estudo mostrou diferença de expressão sexo-específica entre fêmea e macho controles, o macho foi *up* regulado 11,1 vezes em relação a fêmea. O macho recuperado de camundongo *EBi3^{-/-}* foi *down* regulado 7,7 vezes em relação ao macho controle, figura 24F.

SmHDAC1 é uma histona deacetilase 1 que apresentou um ganho na função sexo-específica pelos parasitos recuperados de *EBi3^{-/-}*, pois a análise da expressão mostrou diferença entre fêmea recuperada de *EBi3^{-/-}* e macho recuperado de *EBi3^{-/-}*, em que a fêmea é 8,3 vezes *down* regulada comparando com o macho. Essa diferença não foi observada nos controles, isso pode configurar em uma influência causada pelo sistema imune do hospedeiro, figura 24G.

SmHDAC3 é uma histona deacetilase 3 e não apresentou qualquer significância estatística entre os grupos macho e fêmea controles e os grupos recuperados de camundongo *EBi3^{-/-}* para a expressão gênica considerando $p < 0,01$, figura 24H.

SmHDAC8 é uma histona deacetilase 8 que apresentou diferença apenas entre os grupos fêmea e macho controles, que foi perdida em LE recuperada de camundongo *EBi3^{-/-}*. O macho foi 9,3 vezes *up* regulado comparando com o nível de expressão da fêmea, figura 24I.



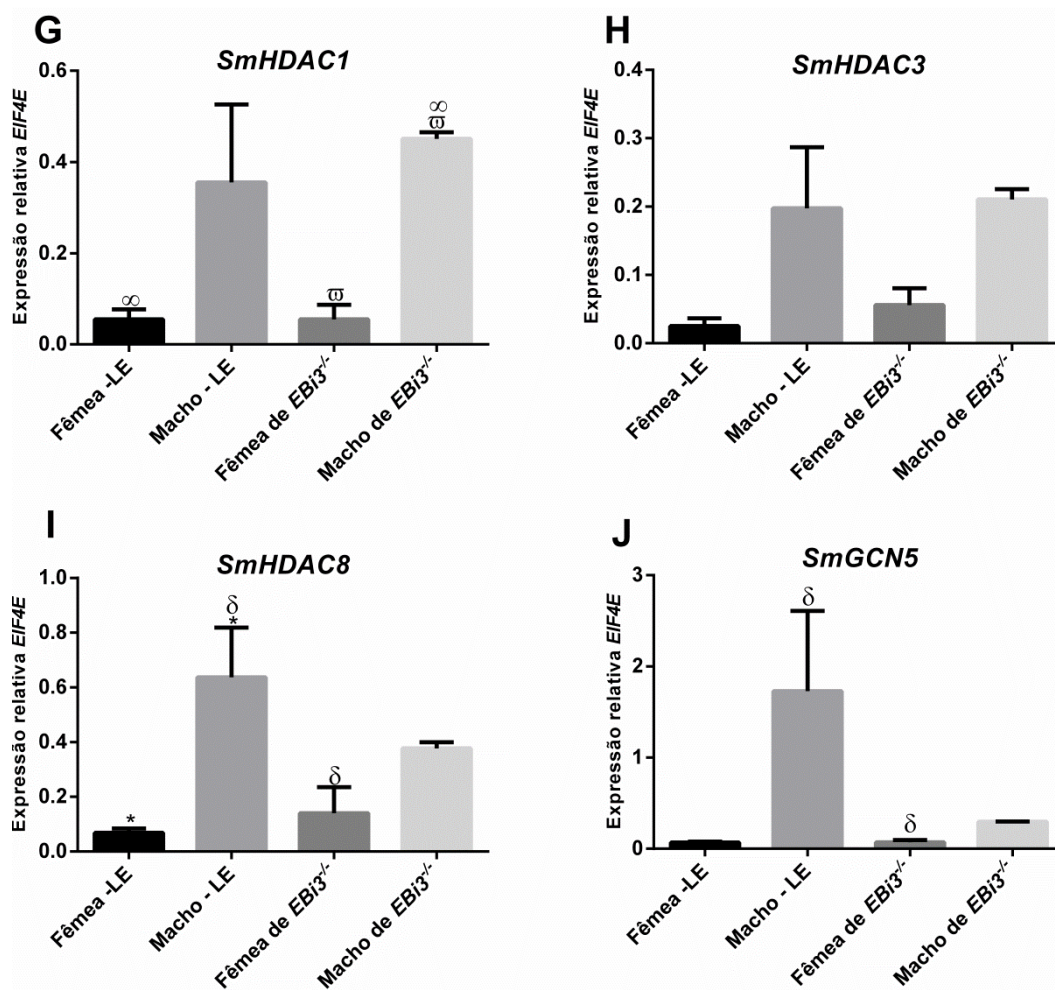


Figura 24: Expressão relativa de *USPs*, *MBD*, *HDACs* e *GCN5* em *S. mansoni* cepa LE fêmea e macho recuperados de camundongo WT, fêmea e macho de $EBi3^{-/-}$ recuperados de animal C57BL/6 $EBi3^{-/-}$, foi usado *EIF4E* como gene calibrador. Foi feito Anova One-Way pós-teste de Tukey, $p < 0,01$. ∞ Fêmea de $EBi3^{-/-}$ vs. Macho de $EBi3^{-/-}$. π Macho - LE vs. Macho de $EBi3^{-/-}$. δ Macho - LE vs. Fêmea de $EBi3^{-/-}$. ∅ Fêmea - LE vs. Macho de $EBi3^{-/-}$. ε Fêmea - LE vs. Fêmea de $EBi3^{-/-}$. * Fêmea - LE vs. Macho - LE.

A análise da expressão de *SmGCN5*, que é uma histona acetiltransferase, não apresentou significância estatística relevante, os únicos grupos que mostraram significância foram macho controle e fêmea recuperada de camundongo $EBi3^{-/-}$, figura 24J

5.3.2 Análise do conteúdo de metilação de DNA (5-mC) em *S. mansoni* recuperado de camundongos C57BL/6 WT infectado e C57BL/6 $EBi3^{-/-}$ infectado

Foi feito a quantificação da porcentagem de metilação das citosinas no DNA de *S. mansoni* recuperado de C57BL/6 WT, C57BL/6 $EBi3^{-/-}$ e de casais resistentes ao praziquantel

por ELISA, a partir de uma curva padrão com concentrações de DNA e porcentagens de metilação de citosinas conhecida, com auxílio de anticorpo anti-metilcitosina. Pela figura 25 podemos observar que existe uma diferença no conteúdo de metilação do DNA (5-mC) de *S. mansoni* macho controle em relação a todos os outros grupos analisados. O macho LE foi 7,25 vezes maior que fêmeas recuperadas de camundongo *EBi3^{-/-}*; 5,3 vezes maior que machos recuperados de camundongos *EBi3^{-/-}*; 8,29 vezes maior que fêmeas da cepa LE e 5,8 vezes maior que casais resistentes ao praziquantel.

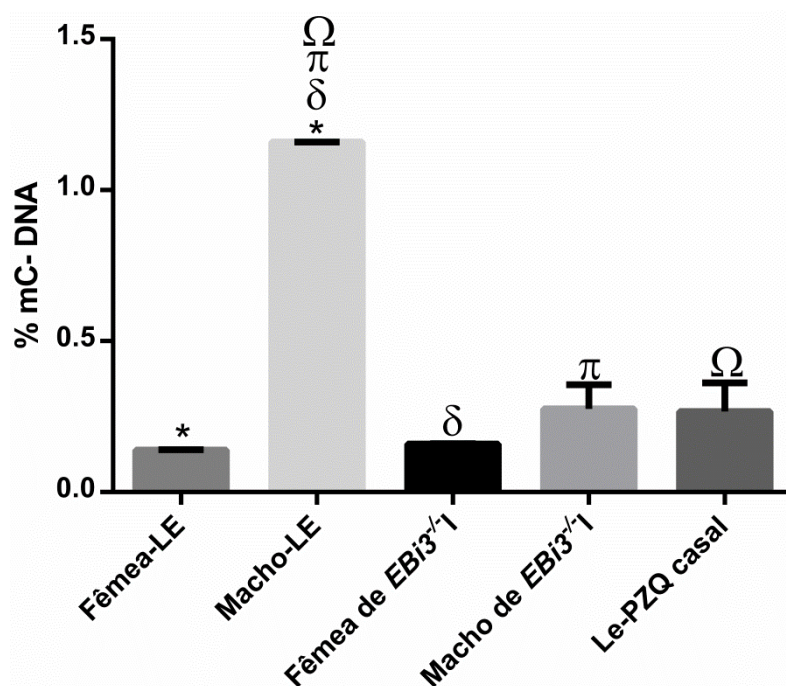


Figura 25: Conteúdo de 5-mC% no DNA de *S. mansoni* recuperado de C57BL/6 WT, C57BL/6 *EBi3^{-/-}* e casais da cepa resistente ao praziquantel. Foi feito Kruskal Wallis, $p < 0,05$, pós-teste de Dunn.

5.3.3 Expressão de miRNAs de *S. mansoni* (macho e fêmea adulto) recuperado de camundongo C57BL/6 WT e *EBi3^{-/-}* por qRT-PCR

Em nosso laboratório foram feitas análises de predição de miRNAs de *S. mansoni*, essas análises foram baseadas no conteúdo de GC na sequência de nucleotídeos do pré-miRNA, energia mínima livre da estrutura secundária do precursor de miRNA, localização no genoma e conservação entre as espécies, os miRNAs utilizados neste estudo foram identificados em um trabalho anterior usando *S. mansoni*. Foram feitas também predições dos alvos utilizando parâmetros como o conteúdo de nucleotídeos da região *seed*, estabilidade termodinâmica do par RNAm/miRNA, dentre outros, os miRNAs identificados que

apresentaram mais alvos e alvos importantes tiveram a expressão avaliada neste estudo (De Souza Gomes *et al.*, 2011)

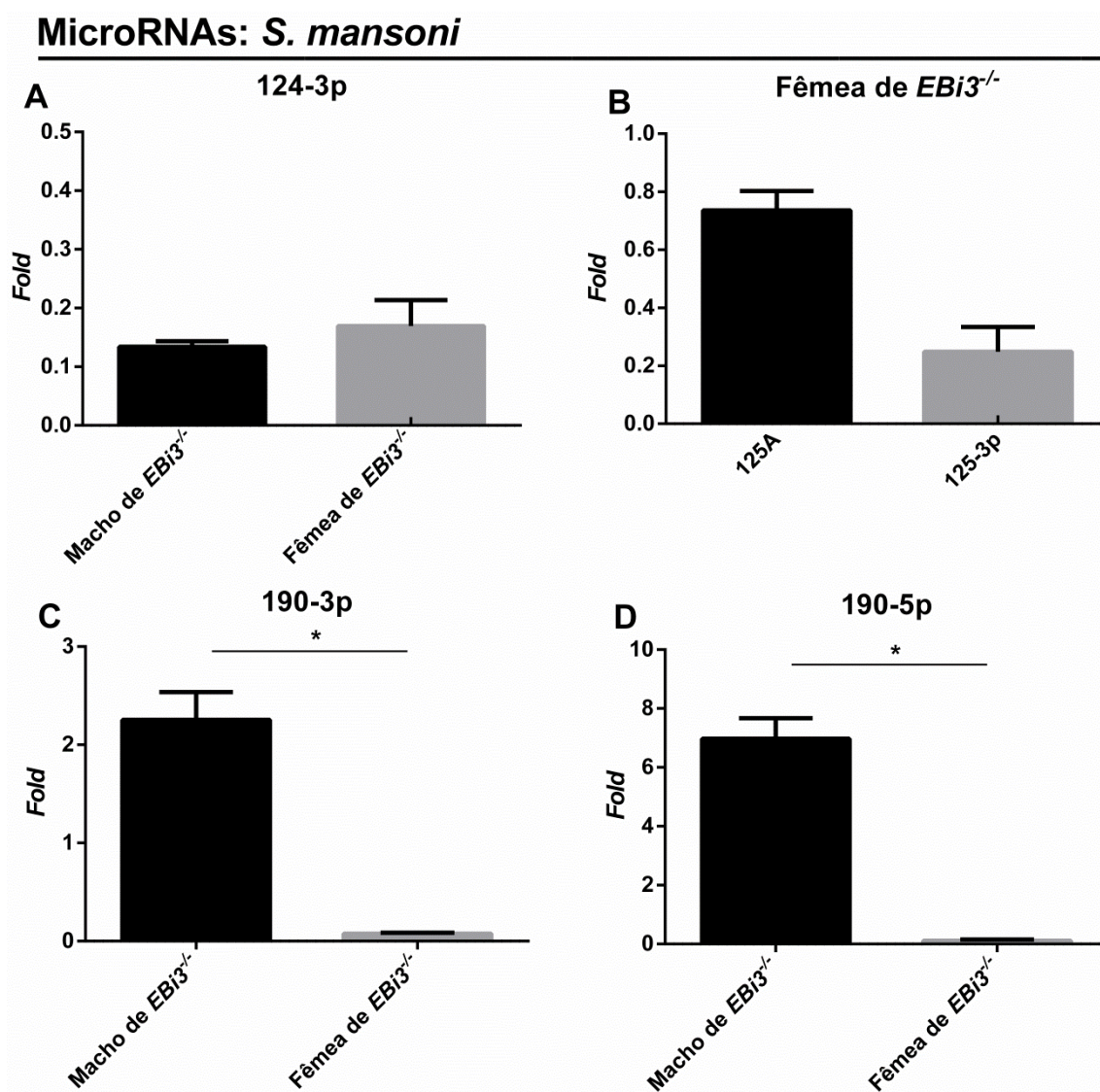


Figura 26: *Fold change* dos miRNAs 124-3p, 125A, 125-3p 190-3p e 190-5p de *S. mansoni* LE recuperado de camundongo C57BL/6 WT e *EBi3*^{-/-} infectados com 100 cercárias. Os experimentos foram feitos em triplicata de pool com no mínimo 50 parasitos por extração. Os grupos calibradores usados foram machos e fêmeas recuperados de camundongos WT, foi feito teste T, $p < 0,01$.

O miR124 3P apresentou expressão menor nos machos e fêmeas retirados dos camundongos *EBi3*^{-/-} do que os retirados de camundongos selvagem, não houve diferença estatística entre machos e fêmeas, foi feito teste T com $p < 0,01$, figura 26A. Os miR-125A e 125-3p apresentaram menor expressão em fêmeas recuperadas de camundongos *EBi3*^{-/-}, não sendo possível calcular se existe diferença entre machos e fêmeas, o *fold* dos machos não foi

possível calcular pois os machos recuperados de camundongos selvagem não expressaram esses miRNAs, figura 26B. Houve diferença estatística para miR-190-3p ($p=0,0055$) e 5p ($p=0,0033$), sendo que machos recuperados de *Ebi3*^{-/-} apresentaram maior expressão que machos recuperados de camundongos selvagem, em fêmeas ocorreu o oposto, as fêmeas recuperadas de camundongo selvagem apresentaram maior expressão que as fêmeas recuperadas do camundongo *Ebi3*^{-/-}, figura 26C e D.

5.3.4 Expressão de RNAs longos não codificantes de *S. mansoni* em fígado de C57BL/6 WTI e *Ebi3*^{-/-}I por qRT-PCR

Foi verificado se todos os lncRNAs listados na tabela eram detectados em fígados de camundongos WT e *Ebi3*^{-/-}. Comparando as expressões de WTC e WTI, podemos observar pela figura que LTR foi expresso somente em camundongos infectados com *S. mansoni*. Em WTC o RNA longo mais expresso foi o *lncRNA6* que apresentou valores milésimos assim como os demais RNAs longos que foram detectados (*lncRNA 1, 7, 8, 9, 10 e 11*), figura 27A. Os lncRNAs de *S. mansoni* detectados em fígado de camundongos WTI: LTR e *lncRNA 1, 6, 7, 8, 9, 10 e 11* e seus respectivos valores médios de expressão, 5,72; 0,008; 0,511; 0,645; 0,95; 0,021; 0,375 e 0,007, respectivamente, figura 27B. Foi verificado também que os *lncRNAs 1, 9 e 11* foram 10 vezes mais expressos em camundongos selvagens infectados do que em camundongos selvagens controle e que os *lncRNAs 6, 7, 8 e 10* foram 100 vezes mais expressos em camundongos selvagens infectados do que em camundongos selvagens controle.

Considerando *Ebi3*^{-/-}C e *Ebi3*^{-/-}I, os *lncRNAs 2, 12 e 15* foram detectados exclusivamente no grupo controle e os *lncRNAs 1, 3, 5, 9, 11 e 13* foram detectados exclusivamente no grupo infectado, figura 27C e D. Os *lncRNAs 6, 7, 8 e 14* e o retrotransposon LTR foram detectados em ambos os fígados de *Ebi3*^{-/-}C e *Ebi3*^{-/-}I. O LTR foi aproximadamente 3000 vezes mais expresso em camundongos *Ebi3*^{-/-}I do que em *Ebi3*^{-/-}C. O *lncRNA 6* foi aproximadamente 1000 vezes mais expresso em camundongos *Ebi3*^{-/-}I do que em camundongos *Ebi3*^{-/-}C. O *lncRNA 7* foi aproximadamente 200 vezes mais expresso em camundongos *Ebi3*^{-/-}I do que em camundongos *Ebi3*^{-/-}C. O *lncRNA 8* foi aproximadamente 90 vezes mais expresso em camundongos *Ebi3*^{-/-}I do que em camundongos *Ebi3*^{-/-}C. O *lncRNA 14* foi aproximadamente 100 vezes mais expresso em camundongos *Ebi3*^{-/-}I do que em camundongos *Ebi3*^{-/-}C.

Em *EBi3^{-/-}* os lncRNAs expressos no fígado foram: LTR e *lncRNA 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 13* e *14* e seus respectivos valores médios de expressão, 0,003; 0,0315; 0,001551; 0,02097; 0,01616; 0,002613; 0,01535; 0,02063; 0,00019; 0,002 e 0,002491. Os lncRNAs de *S. mansoni* apresentaram níveis de expressão maiores em camundongos WTI que em *EBi3^{-/-}*. Comparando os dois grupos infectados, o *lncRNA 10* foi expresso somente no fígado de camundongo WTI e *lncRNA 3, 13* e *14* foram expressos somente em camundongos *EBi3^{-/-}*.

É possível observar que os níveis de expressão dos lncRNAs em WTI são maiores que em *EBi3^{-/-}*, isso pode ser explicado pelo fato de haverem menos ovos de *S. mansoni* aderidos ao fígado de *EBi3^{-/-}*, assim uma menor quantidade de RNA do parasito seria extraída juntamente com os tecidos do hospedeiro definitivo. Podemos concluir com essa análise também que o repertório de lncRNAs está sendo modulado pelo sistema imune do hospedeiro, pois o conjunto de lncRNAs detectado apresenta muitas diferenças se compararmos os grupos entre si.

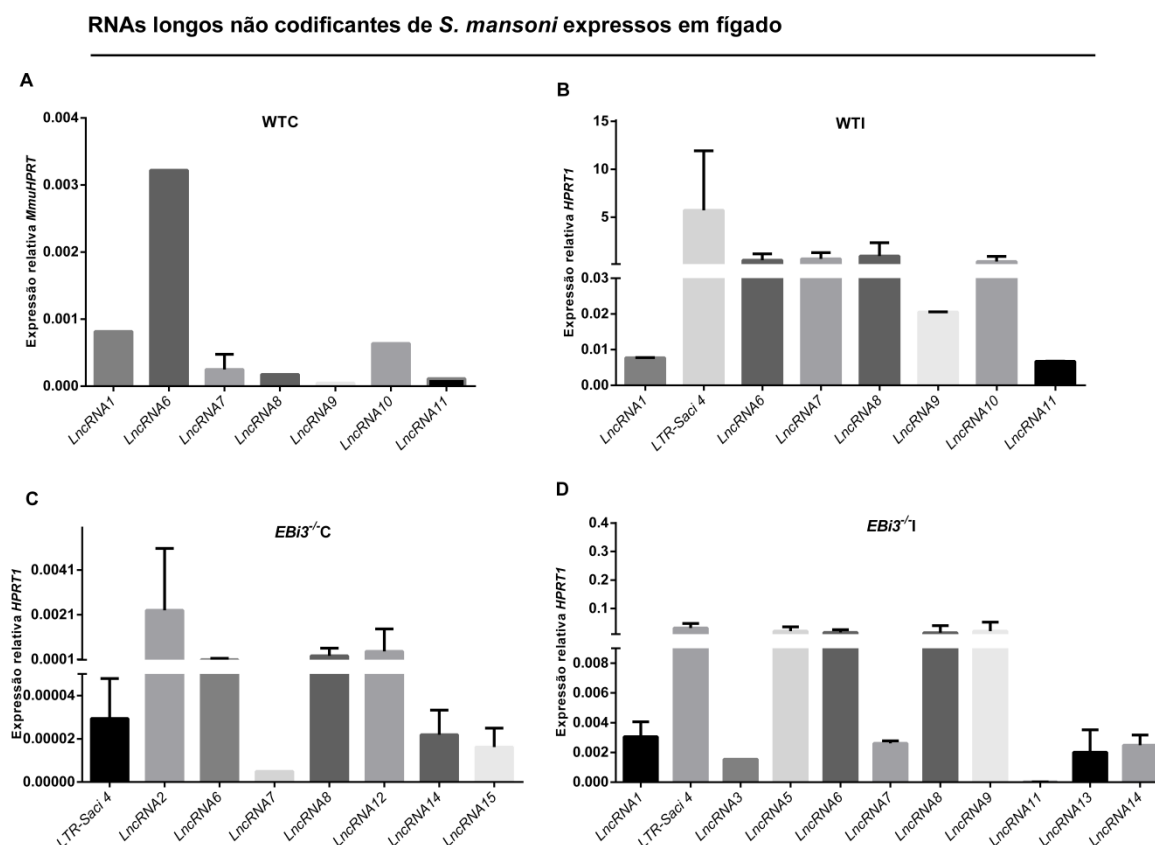


Figura 27: Expressão relativa de lncRNAs de *S. mansoni* no fígado de camundongos C57BL/6 WTC, WTI, *EBi3^{-/-}*C e *EBi3^{-/-}*I por RT-qPCR. *HPRT 1* (*Mus musculus* (mmu)-hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase 1) foi o gene usado como calibrador.

5.3.5 Detecção de lncRNAs e miRNAs de *S. mansoni* no sangue de camundongos C57BL/6 *Ebi3*^{-/-} controle e infectados

A análise de presença de lncRNAs e miRNAs de *S. mansoni* em plasma de camundongos foi feita com objetivo de selecionar possíveis biomarcadores para esquistossomose. Esse teste foi realizado de forma qualitativa a fim de detectar quantos camundongos infectados apresentavam alguma expressão desses ncRNAs e se eles eram expressos também no grupo controle. Vale ressaltar que para esse experimento foram utilizadas amostras provenientes de 5 *Ebi3*^{-/-}C e 13 *Ebi3*^{-/-}I. Pela tabela 4 podemos perceber que o único miRNA presente somente em camundongos infectados foi o miR-190-3p. Os miRNAs de *S. mansoni* testados neste estudo aparentemente são conservados com os miRNAs de *M. Musculus*, exceto o miR-190-3p.

A grande maioria dos lncRNAs não foi expressa, todos os miRNAs foram expressos pelo menos no grupo infectado. Vale ressaltar que o *lncRNA5* apresentou expressão em 1 único camundongo controle (Cq elevado - dados não mostrados), mas apresentou expressão em 10 camundongos infectados com um valor de Cq inferior (dados não mostrados). Os *lncRNAs 5 e 6* apresentaram curvas de dissociação características de ruído no grupo controle, o *lncRNA6* apresentou produtos inespecíficos nos grupos infectados e o *lncRNA 7* amplificou de forma similar em ambos grupos controle e infectado, (figura 28).

Tabela 4: Detecção de RNAs não codificantes no plasma de *Ebi3*^{-/-}C e *Ebi3*^{-/-}I

LncRNA ou miRNA	Presença em <i>Ebi3</i>^{-/-}C (N° de camundongos)	Presença em <i>Ebi3</i>^{-/-}I (N° de camundongos)
<i>LncRNA 1</i>	-	-
<i>LncRNA 2</i>	-	-
<i>LncRNA 3</i>	-	-
<i>LncRNA 4</i>	-	-
<i>LncRNA 5</i>	1	10
<i>LncRNA 6</i>	1	5
<i>LncRNA 7</i>	4	6
<i>LncRNA 8</i>	-	-
<i>LncRNA 9</i>	-	-
<i>LncRNA 10</i>	-	-
<i>LncRNA 11</i>	-	-
<i>LncRNA 12</i>	-	-
<i>LncRNA13</i>	-	-
<i>LncRNA 14</i>	-	-
<i>LncRNA 15</i>	-	-
miR-124-3p	5	6

miR-125-3p	3	6
miR-125a	5	6
miR-190-5p	2	5
miR-190-3p	-	2

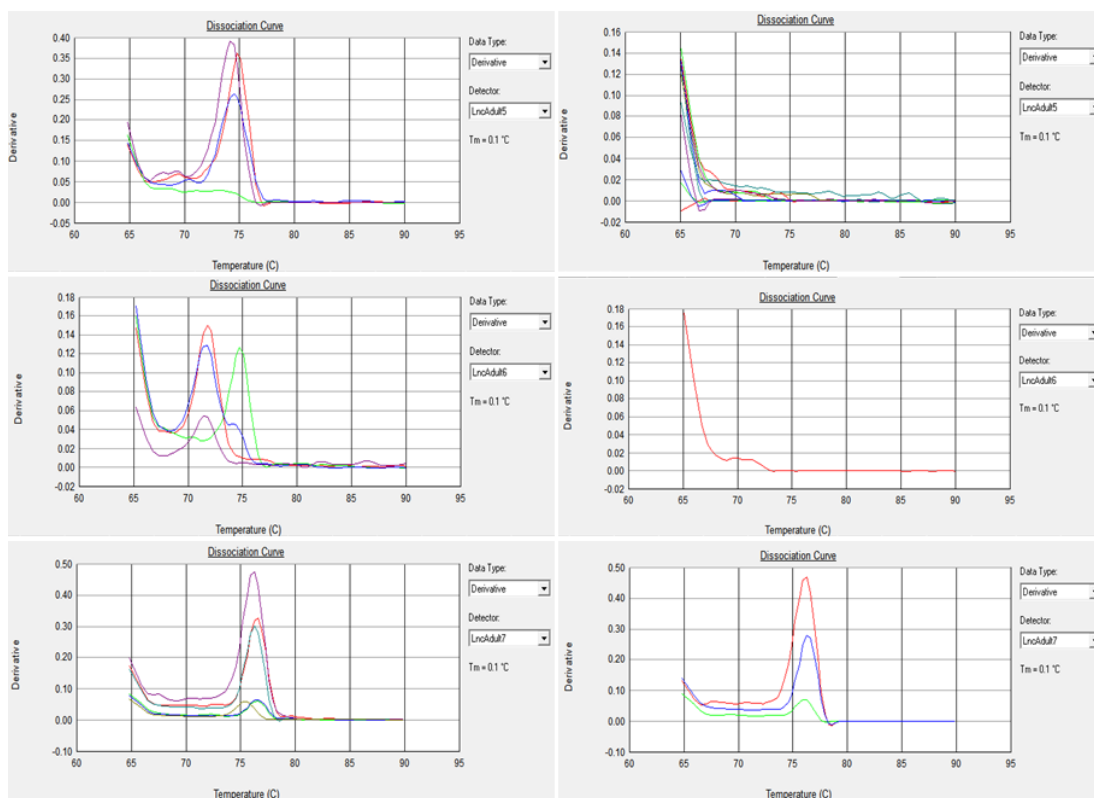


Figura 28: Curva de dissociação dos lncRNAs do plasma de camundongos C57BL/6 *EBi3^{-/-}I* e *EBi3^{-/-}C*: da esquerda para a direita em duplas estão o *lncRNA5* grupo *EBi3^{-/-}I* e *EBi3^{-/-}C*; *lncRNA6* grupo *EBi3^{-/-}I* e *EBi3^{-/-}C*; *lncRNA 7* grupo *EBi3^{-/-}I* e *EBi3^{-/-}C*. Cada cor representa uma réplica biológica.

5.4 Expressão de genes relacionados a alterações epigenéticas e proteases específicas de ubiquitina (*USPs*) em *S. mansoni* (macho e fêmea adulto) resistente ao Praziquantel

Até agora foram feitos experimentos abordando o *background* imunológico do hospedeiro definitivo sobre a interação parasito-hospedeiro. Com o intuito de explorar um pouco os aspectos epigenéticos agora alterando a cepa de *S. mansoni*, a expressão de alguns genes relacionados a funções epigenéticas foi analisada usando a cepa LE-PZQ assim como foi explorada anteriormente as taxas de metilação de 5-mC no DNA dos parasitos resistentes. A expressão de *USPs* foi analisada em cepas resistentes ao praziquantel para detectar se

ocorre também uma alteração em relação à cepa susceptível LE recuperada de camundongo WT, diferenças na expressão dessas enzimas podem estar relacionadas ao controle da renovação de proteínas conferindo maior adaptação a *S. mansoni*.

A análise da expressão de *SmUSP7* revelou que existe diferença entre macho e fêmea controles, o macho é 3,4 vezes *up* regulado em comparação com a fêmea, essa diferença foi perdida nos parasitos LE-PZQ, ou seja, uma função sexo-específica foi perdida nesses vermes. Machos LE-PZQ foram *down* regulados 8,7 vezes em relação aos machos do grupo controle, figura 29A.

O único gene em que os parasitos da cepa LE-PZQ apresentaram *up* regulação foi *SmUSP15*. Machos LE-PZQ foram *up* regulados mais de 500 vezes em relação a machos do grupo controle, porém vale ressaltar que a expressão desses grupos apresentou índices muito baixos. Houve também surgimento de diferença sexo-específica entre fêmeas LE-PZQ e machos LE-PZQ, as fêmeas foram 18,2 vezes *down* reguladas comparando com esses machos, figura 29B.

Em relação à expressão de *SmUSP22*, foi possível observar que assim como a *USP7*, ocorreu uma diferença sexo-específica em que o macho é 4,6 vezes *up* regulado em relação a fêmea controle que foi perdida na cepa LE-PZQ. Machos LE-PZQ foram *down* regulados mais de 100 vezes comparando com machos do grupo controle, figura 29C.

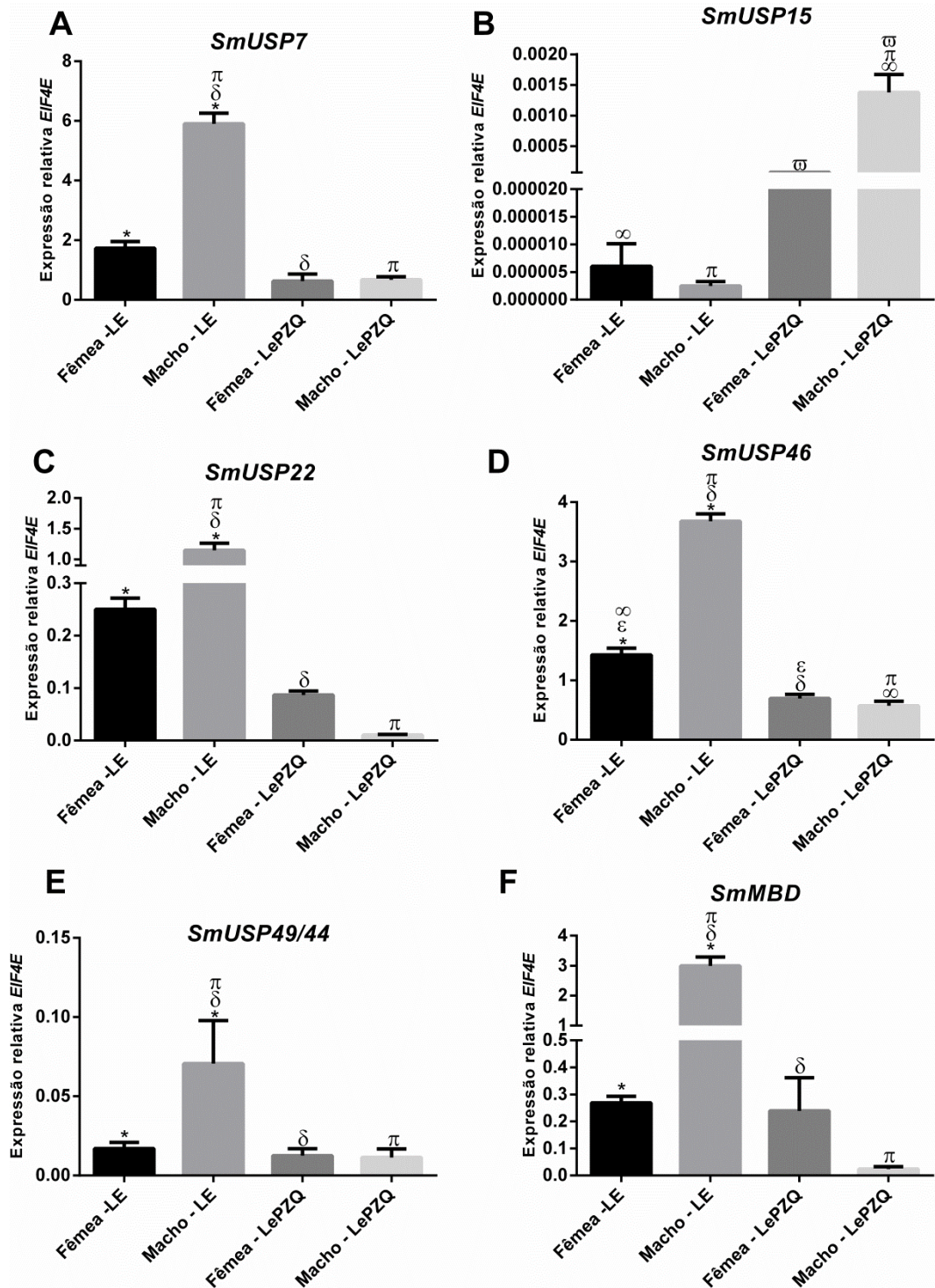
Em relação à expressão de *SmUSP46*, foi possível observar que ocorreu uma diferença sexo-específica em que o macho é 4,6 vezes *up* regulado em relação a fêmea controle que foi perdida na cepa LE-PZQ. As fêmeas LE-PZQ foram 2,1 vezes *down* regulada comparando com as fêmeas do grupo controle. Os machos LE-PZQ foram 6,4 vezes *down* regulado comparando com o macho controle, figura 29D.

O parálogo *SmUSP49/44* apresentou diferença entre fêmeas e machos do grupo controle, machos foram 4,2 vezes *up* regulados comparando com as fêmeas, essa diferença foi perdida nos parasitos LE-PZQ. Porém machos LE-PZQ foram *down* regulados 6,2 vezes comparando com machos do grupo controle, figura 29E.

SmMBD mostrou diferença de expressão sexo-específica entre fêmea e macho controles, o macho foi *up* regulado 11,1 vezes em relação a fêmea. O macho controle foi *up* regulado mais de 100 vezes comparando com o macho LE-PZQ, figura 29F.

Não foi observada qualquer significância estatística entre os grupos macho e fêmea controles e os grupos da cepa LE-PZQ para a expressão dos genes referentes à histona deacetilases *SmHDAC1*, 3 considerando $p < 0,01$, figuras 29G e H. *SmHDAC8* apresentou

diferença apenas entre os grupos fêmea e macho controles, que foi perdida na cepa LE-PZQ. O macho foi 9,3 vezes *up* regulado comparando a com o nível de expressão na fêmea, figura 29I.



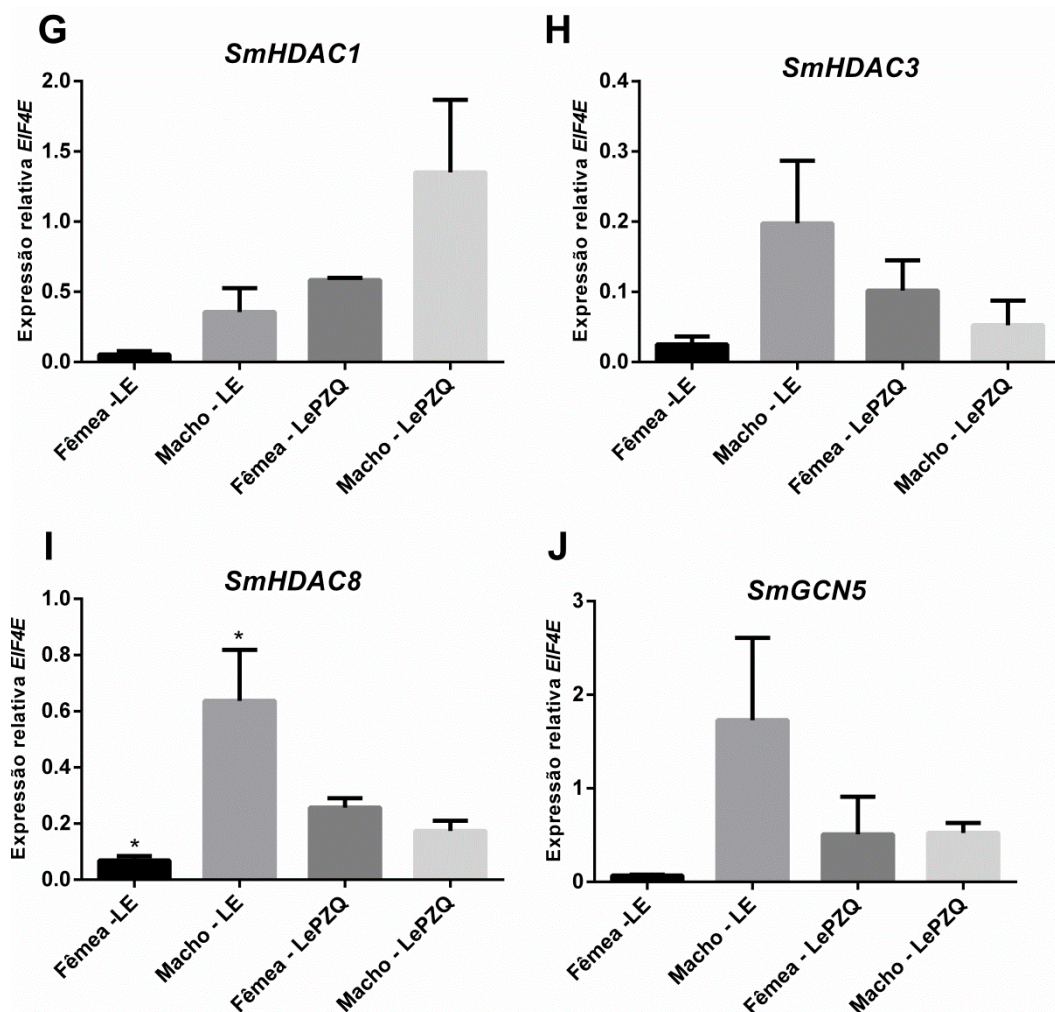


Figura 29: Expressão relativa de *USPs*, *MBD*, *HDACs* e *GCN5* em *S. mansoni* cepa LE recuperada de camundongo WT e cepa LePZQ resistente ao praziquantel, foi usado *EIF4E* como gene calibrador. Foi feito Anova One-Way pós-teste de Tukey, $p < 0,01$. ω Fêmea LePZQ vs. Macho LePZQ. π Macho - LE vs. Macho LePZQ. δ Macho - LE vs. Fêmea LePZQ. ∞ Fêmea - LE vs. Macho LePZQ. ε Fêmea - LE vs. Fêmea LePZQ. * Fêmea - LE vs. Macho - LE.

Não foi observada qualquer significância estatística entre os grupos macho e fêmea controles e os grupos da cepa LE-PZQ para a expressão do gene *SmGCN5* considerando $p < 0,01$, figura 29J.

6 Discussão

Este trabalho foi realizado a partir do modelo nocaute de EBi3 que impacta nas respostas imunes desencadeadas por IL35 e IL27, pois o EBi3 é uma proteína constituinte de ambas interleucinas (Vignali e Kuchroo, 2012). Não existem estudos que utilizem camundongos nocautes para EBi3 infectados com *S. mansoni*. Considerando a influência do IL27 durante a esquistossomose, já foi desenvolvido um estudo em que foi usado um modelo nocaute para a cadeia WSX-1 que faz parte do receptor de IL27. Nesse estudo, Shainheit *et al.* (2007) abordaram somente parâmetros imunológicos e alterações no granuloma hepático. Shainheit *et al.* (2007) investigaram a infecção crônica causada por *S. mansoni* em camundongos BL/6, como controle e *WSX-1^{-/-}* como nocaute para IL27. Em seus resultados eles observaram que o tamanho da área com fibrose e o volume dos granulomas nos camundongos nocautes era menor que nos camundongos controle, evidenciado pela coloração das lâminas com picrosírio, porém sem significância estatística, esse estudo é o único que utilizou o modelo *IL27^{-/-}*, mas com enfoque imunológico.

Considerando os parâmetros parasitológicos descritos, neste estudo não foi observado diferença estatística entre o número de parasitos totais e também não houve diferença estatística entre o número de casais encontrados no sistema porta hepático dos camundongos. Não houve diferença estatística no número de ovos estimados no intestino de camundongos WT e *EBi3^{-/-}* infectados, embora a média tenha sido maior no grupo WT. O número de granulomas e o volume dos granulomas foi maior em camundongos selvagens, indicando que a ausência de EBi3 impactou em menor dano hepático para o hospedeiro definitivo. O número de ovos estimados nas fezes também foi maior em camundongos WT, indicando maior liberação de ovos por esses animais. Houve maior desvio padrão nos parâmetros parasitológicos dos camundongos *EBi3^{-/-}*. Wolowczuk *et al.* (1999) verificaram que o número de vermes recuperados do sistema porta hepático era menor nos animais nocautes para IL7 do que em animais controle, em nosso estudo não houve diferença, a quantidade de ovos aderidos ao fígado também foi menor em animais nocaute assim como em nosso estudo.

Já foi observada por Davies *et al.* (2001) diminuição da oviposição e tamanho dos vermes em outros modelos de nocaute, como linfócitos *T CD4^{-/-}* hepáticos, além da diminuição do pareamento macho-fêmea. Estudos mais recentes detectaram que os nematóides são estimulados pela indução de algumas interleucinas. A presença de IL 5 aumentou a reprodução de nemátodes e os parasitas recuperados de camundongos *IL 5^{-/-}*

tinham tamanho de larva menor que o tamanho de larvas recuperadas do controle, concluindo assim que essa interleucina promoveu desenvolvimento e reprodução mais rápidos sem alterar outras características do parasita (Babayán *et al.*, 2010). Sendo assim, o modelo *EBi3^{-/-}* pode ter induzido diminuição da oviposição dos vermes como podemos observar nos resultados de oviposição *in vitro*, em que casais recuperados de camundongos *EBi3^{-/-}* diminuíram a taxa de oviposição após 96h. Isso explica também os resultados de ovos no fígado e nas fezes que foram menores nos camundongos *EBi3^{-/-}*, ou seja, a oviposição dos vermes recuperados de nocaute foi afetada e diminuiu, fato percebido pela menor quantidade de ovos recuperados nas fezes, fígado e na oviposição *in vitro* dos parasitos recuperados de *EBi3^{-/-}* e também por não haver diferença estatística na quantidade de vermes e casais recuperados.

Foi observado durante a análise da microscopia que os granulomas presentes em camundongos WTI possuem um formato mais definido, concêntrico do que os presentes em camundongos *EBi3^{-/-}* que parecem ser mais desorganizados, com bordas mais irregulares.

De Oliveira *et al.* (2017) mostraram que galectina 3 é importante na formação de granulomas concêntricos e na formação do processo fibrótico hepático, eles observaram também que a expressão de α -actina músculo liso e a expressão de IL4 tem correlação com o formato dos granulomas formados durante a infecção por *S. mansoni*. Já foi demonstrado que p28 que é além do EBi3 a outra subunidade constituinte do IL27, sozinho, possui função imunossupressora atuando de forma anti-inflamatória (Shimozato *et al.*, 2009). Sendo assim isso justificaria o menor dano hepático encontrados nos fígados *EBi3^{-/-}*, em que o p28 estaria sozinho e atuando dessa forma, minimizando a inflamação nos granulomas.

Amaral *et al.* (2017) propuseram um novo software para análise histológica tanto de granulomas hepáticos como intestinais, nesse estudo eles descreviam a área dos granulomas o número de eosinófilos, dentre outros parâmetros na fase aguda e na fase crônica da esquistossomose mansônica. Eles analisaram órgãos (intestino e fígado) de camundongos Swiss infectados experimentalmente e do rato d'água, capturado como modelo de infecção natural. Nesse mesmo estudo eles observaram que camundongos Swiss infectados experimentalmente apresentavam um dano hepático severo desde a fase aguda da infecção até a fase crônica, mas por outro lado eles apresentavam menor dano intestinal, esse fato foi observado pela quantidade de colágeno nos granulomas hepáticos e intestinais, e pela dimensão da área afetada. No modelo natural de infecção, com os ratos d'água capturados ocorria o oposto, o dano hepático era menor que o dano intestinal, sendo que o dano intestinal era severo.

Neste trabalho pode ter ocorrido como ocorreu com os camundongos de Amaral *et al.* (2017), o dano hepático foi maior que o dano intestinal, pois podemos perceber pelos nossos resultados que havia muito mais ovos aderidos no fígado que no intestino.

Neste trabalho avaliou-se a expressão de DNA metiltransferases de manutenção e *de novo*, assim como demetilases de DNA, com o objetivo de detectar se o *background* imunológico afetaria a expressão dessas enzimas e por consequência os padrões de metilação no DNA. Os resultados indicam que não houve diferença estatística entre os grupos para a expressão de *DNMT1*, sendo que esse gene apresentou níveis de expressão bem baixos, provavelmente devido às células não estarem em divisão. Houve diferença entre os camundongos WT controle e infectado para *DNMT3A* e entre os *EBi3^{-/-}* controle e infectado para *DNMT3B*.

O resultado obtido para o gene *DNMT3A* corroboram com a literatura que mostra que os genes de *DNMT3A* são frequentemente mais expressos no fígado que foi acometido por doenças do que em órgãos normais. Nesses estudos, a administração do inibidor de DNA metiltransferase 5-azadC alivia os sintomas. Um exemplo disso é a alta taxa de metilação do gene referente à septina 9 encontrada em células do fígado que apresenta regiões com fibroses. Sept-9 bloqueia a expressão de α -SMA e *Coll1a1* (colágeno tipo 1), evitando a ativação de células esteladas hepáticas (HSCs) em miofibroblastos que depositam o excesso de colágeno, Sept-9 também atua aumentando os níveis de caspase 3 ativada e outras proteínas pró-apoptóticas em HSC. No fígado sem o inibidor 5-azadC a metilação desse gene levou a deposição de colágeno (Wu *et al.*, 2017).

DNMT3B foi mais expressa no *EBi3^{-/-}* controle que no infectado, não existem dados comparativos na literatura para *EBi3^{-/-}*. Yu *et al.* (2017) detectaram que *DNMT3B* é responsável pela metilação do promotor de PTEN, sendo que em doenças que afetam o fígado como fibroses e cirroses, os níveis de expressão de *DNMT3B* aumentam. PTEN atua diminuindo a proliferação celular e inibe a ativação de células esteladas hepáticas (HSCs), que são responsáveis pelas deposições de colágeno no fígado.

Os resultados deste estudo mostram que o processo de demetilação está mais ativo que o de metilação. Liu *et al.* (2019) investigou os efeitos da toxina T2 sobre o fígado, essa toxina está presente em cereais e ela é oriunda de fungos do gênero *Fusarium*, porém eles utilizaram ratos Wistar. Nesse estudo eles perceberam que T2 estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL6, IL1 β , IL11, IL1 α , e TNF α), isso resulta em danos hepáticos e apoptoses, eles perceberam também que a expressão dessas citocinas é mediada por demetilação dos

genes codificantes dessas citocinas. Já foi verificado que em fígados com carcinoma hepatocelular ocorre demetilação do DNA genômico, essa hipometilação estava associada principalmente a regiões codificantes (Xiong *et al.*, 2019).

Watanabe *et al.* (2019) encontraram níveis de expressão de DNMTs similares aos encontrados neste estudo, porém eles usaram *GAPDH* como gene calibrador, eles observaram que *DNMT1* apresentava os menores níveis de expressão entre as DNA metiltransferases analisadas, sendo que os níveis de *DNMT3A* e *B* eram similares. Considerando os níveis de expressão das DNA demetilases, Watanabe *et al.* (2019) verificaram que *TET 3* era mais expressa, se compararmos os dados deles com este estudo, podemos perceber o mesmo ocorre nos grupos WTC e WTI, a *TET1* foi mais expressa em *EBi3^{-/-}I*, mas com níveis mais próximos de *TET3* do que de *TET2*, a *TET2* foi mais expressa em *EBi3^{-/-}C*. A *TET 2* e *3* mostraram diferenças de expressão nos grupos controle, sugerindo que existe uma alteração ligada ao modelo nocaute.

Os resultados deste trabalho mostram que a *TET3* é mais afetada pela condição experimental que as outras TETs, pois ela apresentou mais diferenças significativas entre os grupos analisados. Isso sugere que a demetilação está oscilando mais que a metilação considerando o nosso modelo de estudo. A demetilação está mais ativa que a metilação, porém os camundongos *EBi3^{-/-}* têm expressão menor de TETs que os WT. Considerando os dois grupos nocautes, a demetilação (ativação transcricional de genes) aumentou durante a infecção em *EBi3^{-/-}*, esse resultado corrobora com o resultado do conteúdo de 5-mC no DNA do fígado dos camundongos, pois a taxa de 5-mC encontrada foi maior nos camundongos *EBi3^{-/-}*. Em nossas análises de expressão gênica é possível observar que está ocorrendo um aumento na metilação do DNA em WTI comparando com WTC, pois ocorre perda de diferenças estatísticas entre TETs e DNMTs no selvagem infectado. Considerando camundongos nocautes, é possível observar que está ocorrendo aumento na demetilação do DNA, pois ocorre ganho de diferença estatística entre DNMTs e TETs comparando *EBi3^{-/-}I* com *EBi3^{-/-}C*.

Em relação ao conteúdo de 5-mC no DNA encontrado no fígado dos camundongos, a literatura reporta que em células de carcinoma hepatocelular humano são encontrados 5 – 6,5% de metilação usando o mesmo kit utilizado nesse estudo, essa proporção é similar com a proporção encontrada neste trabalho para camundongos selvagens infectados que foi em torno de 3,7% e não infectados que foi em torno de 6% (Şenyildiz *et al.*, 2016).

Neste estudo encontramos taxas para 5-mC no DNA de *S. mansoni*, os resultados deste trabalho mostram que somente os machos do grupo controle sofreram alteração no conteúdo de 5-mC no DNA comparando com os outros grupos. A cepa resistente ao praziquantel apresentou taxas de 5-mC no DNA similares as taxas encontradas em machos e fêmeas recuperados de camundongo *EBi3^{-/-}* e também com as encontradas em fêmeas provenientes de camundongos controle, nosso estudo mostra que machos são mais susceptíveis a alterações no conteúdo de 5-mC do DNA. Raddatz *et al.* (2013) realizaram análise de metilação do DNA em *S. mansoni* e não encontraram resultados que mostrassem que o DNA fosse metilado, no entanto, eles utilizaram somente vermes machos para fazer a extração e eles propõem que a enzima DNMT2, que é a única DNA metiltransferase presente no genoma de *S. mansoni*, possui atividade de metiltransferase apenas para tRNA e que esta enzima é uma metiltransferase primitiva que perdeu a função de metilar o DNA. Segundo Geyer *et al.* (2011) a metilação está relacionada com oviposição em vermes adultos e existe metilação do DNA nos outros estágios também, ele defende que talvez seja necessário o pareamento para que ocorra metilação no genoma dos parasitos adultos. Geyer *et al.* (2011) encontraram maiores quantidades de 5-mC no DNA de miracídios, ele comparou nesse estudo 5-mC do DNA em ovos, miracídio, esporocisto mãe, cercária, esquistossômulos e machos e fêmeas de 7 semanas usando a técnica de ELISA, nesse mesmo estudo eles detectaram que os machos adultos apresentaram menores taxas de 5-mC, que foi justamente o estágio que Raddatz *et al.* (2013) não detectaram metilação.

Continuando a investigação de quais parâmetros hepáticos seriam modulados em resposta a infecção e ao *background* imunológico, a expressão de alguns miRNAs foi avaliada. Estudos anteriores de Cai *et al.* (2013) mostram que miR-31 apresenta os menores níveis de expressão no fígado de camundongos infectados por *S. japonicum*, até 45 dias de infecção e este miRNA foi o que mais sofreu diminuição de expressão. As HSCs são fundamentais no desenvolvimento da deposição de colágeno no fígado durante a esquistossomose, principalmente na fase crônica da doença, De Oliveira *et al.* (2017) reportam que essas células se diferenciam em miofibroblastos são ativadas por galectina 3 que induz o aumento da expressão de pró-colágeno pelas HSC. As HSC são ativadas quando ocorre algum dano hepático, nessa ativação ocorrem alterações morfológicas, migração e produção de citocinas, dentre as citocinas produzidas, o TGF β atua regulando a produção de colágeno pela via de fosforilação de Smads. Smad3 fosforilada se liga a região promotora de

miR-31 e funciona como fator de transcrição, aumentando a expressão de miR-31 (Hu, J. *et al.*, 2015).

O miR-122 é o principal miRNA do fígado e compreende aproximadamente 70% dos miRNAs produzidos nesse órgão, o aumento da expressão desse miRNA está relacionado a dano no fígado, em várias doenças hepáticas a expressão desse miRNA aumenta. A morte celular de hepatócitos resulta na fragmentação e liberação de corpos apoptóticos na corrente sanguínea, por isso a quantidade desse miRNA circulante aumenta em camundongos e humanos que apresentam danos hepáticos, sendo utilizado como biomarcador de doenças hepáticas. O miR122 também pode ser liberado para a circulação em associação com vesículas e partículas de lipoproteína de alta densidade (Roderburg e Luedde, 2014). Esse miRNA está relacionado a diferenciação de hepatócitos, supressão tumoral, apresentando baixos níveis de expressão em carcinoma hepatocelular (Thakral e Ghoshal, 2015).

O miR-122 foi testado neste estudo também porque inibe alvos que promovem a fosforilação de STAT3, sendo que, já foi descrito também que a diferenciação de células B e T aumenta na presença de EBi3 por meio de STAT3. O miR-122 inibe o STAT3 indiretamente, e esse transdutor de sinal e ativador da transcrição faz parte da resposta gerada por EBi3, nesse caso a resposta do IL27 seria afetada pois ele utiliza o STAT1 e 3 (Ma *et al.*, 2019). Neste trabalho foi observado que existe correlação negativa entre esse miR-122-3p e os genes de metilases e demetilases (*DNMT1* e *TET3*) e com o número de granulomas encontrados no fígado de camundongos *EBi3^{-/-}*. Em WTI o miR-122-5p correlacionou negativamente com ovos no intestino e *DNMT3B*. Podemos perceber que a diminuição da fita 3p nos *EBi3^{-/-}* I pode ter sido ocasionada pela ausência de EBi3, visto que um de seus alvos (STAT3) está subutilizado (Ma *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2019). Em WTI as duas fitas de miR-122 apresentam níveis maiores de expressão pois devem estar atuando na regulação das vias em que EBi3 participa. Em *EBi3^{-/-}C* o miR-122-3p se correlacionou positivamente com a expressão de *DNMT1*, indicando que essa associação pode ser intrínseca da infecção no modelo nocaute pois em *EBi3^{-/-}I* a correlação é negativa. Em WTC o miR-122-3p exibiu correlações positivas com as expressões dos genes de demetilases (*TET2*) e com o miR-31-3p. Os miRNAs que fazem parte do mesmo pré-miRNA, miR-122-3p e 5p também se correlacionaram positivamente em *EBi3^{-/-}I*, o que é esperado visto que sua molécula precursora possui estrutura de grampo comportando as duas moléculas.

Nos grupos WTC, WTI e *EBi3^{-/-}I*, os miRNAs possuem correlação negativa com as DNMTs isso mostra que essas enzimas podem estar metilando a sequência desses miRNAs no

genoma e assim diminuindo sua expressão. TETs apresentaram correlação positiva entre elas, o que é esperado pois essas enzimas atuam sinergicamente. Em *EBi3^{-/-}* ocorreu correlação negativa entre DNMTs e TETs, nesse caso as DNA metil transferases podem estar silenciando os genes/região promotora das TETs. Em WTC e *EBi3^{-/-}* ocorreu correlação positiva, a alta expressão de TETs pode ter demetilado o gene de DNMTs por oxidação levando a ativação transcricional.

Neste estudo ocorreram correlações positivas entre os parâmetro parasitológicos, como número de ovos no intestino, número de granulomas no fígado e ovos nas fezes, o que era esperado por cerca de 50% dos ovos permanecerem nos órgãos do hospedeiro (Neves, 1992).

Machos solitários apresentam diferenças na expressão de vários genes em relação a pareados, um exemplo disso é a diminuição da quantidade de transcritos para folistatina, que age como inibidor na via do TGF β , essa via é responsável pela produção de ovos e regulação da mitose na fêmea. Machos pareados também apresentam diferenças de expressão de genes envolvidos na via de biossíntese de catecolaminas, a dopamina possui grande importância durante o pareamento (Leutner *et al.*, 2013). A fêmea só se torna sexualmente madura após o pareamento com o macho e esse evento afeta a transcrição de vários genes em quantidade e classificação. Fêmeas pareadas apresentam diferenças na expressão de genes relacionados a tráfico de vesículas, metabolismo de DNA, atividade transportadora e antioxidante, transdução de sinais, dentre outros, porém existem genes que não sofrem alterações de expressão em vermes solitários e pareados, esses genes estão relacionados a funções essenciais para a sobrevivência do parasito, estes apresentam funções estruturais, catalíticas, que codificam para proteínas de ligação, dentre outros (Fitzpatrick e Hoffmann, 2006).

Existe somente um trabalho do nosso grupo sobre a caracterização de enzimas deubiquitinadoras que verifica a expressão de USPs (uma subfamília de DUBs) em *S. mansoni* (Pereira *et al.*, 2015). Ubiquitinação é uma das modificações pós-traducionais que ocorre em histona H2B e em menor frequência em histona H2A, a ubiquitinação está envolvida em vários processos celulares como endocitose, reparo de DNA, degradação de proteínas via proteassoma, dentre outros (Darwin, 2009).

SmUSP7 (Smp_089180) é uma proteína presente no núcleo, o gene que codifica essa proteína está presente no cromossomo 1. Analisando todos os estágios *SmUSP7* apresenta maiores níveis de expressão em verme adulto. A sequência de aminoácidos de USP7 indica a existência de quatro domínios conservados em relação à ortólogos (UCH, USPT, USP7 e MATH), comparando com as sequências das outras USPs analisadas neste estudo, é a que

possui mais domínios, podendo apresentar mais funções (Pereira *et al.*, 2015), por isso esse gene é o que apresenta maior nível de expressão, independentemente do grupo e por ter muitas funções também foi um dos genes que apresentaram expressão mais alterada. *SmUSP7* foi *down* regulada em machos de LE-PZQ, isso indica que um possível mecanismo de resistência pode ter reprimido a expressão desse gene. Machos e fêmeas recuperados de *EBi3*^{-/-} também foram *down* regulados, podemos inferir que o sistema imune do hospedeiro afetou a expressão desse gene. USP 7 possui expressão de ortólogos similar, aos níveis encontrados neste estudo, variando de 2,5 a 4 em tecido da região cervical humana (Su *et al.*, 2018).

SmUSP15 (Smp_128770) está presente no cromossomo 2, possui níveis similares de expressão de verme adulto e esquistossômulos. Este gene foi o único *up* regulado em LE-PZQ, principalmente devido ao aumento da expressão nos machos resistentes. Os machos e fêmeas usados neste trabalho foram obtidos por separação de casais, esse processo é lento e como descrito anteriormente, pode afetar a expressão de vários genes, isso justifica a diferença de expressão observada em *SmUSP15* em relação à Pereira *et al.* (2015). O ortólogo de USP 15 em *Oryza sativa* apresenta níveis de expressão similares com as encontradas neste estudo, os autores analisaram a expressão em sementes, bainha, raízes, dentre outras partes e observaram que a expressão variava de 0,02 a 0,15 dependendo da região (Shi *et al.*, 2019). Outros autores analisaram a expressão de USP 15 em células HEK293T em um estudo sobre o efeito negativo dessa USP sobre a expressão de *RIG-I* (ácido retinóico induzível - I), e verificaram que os níveis estavam abaixo de 1, usando o gene calibrador *INFB1* (Zhang *et al.*, 2015).

SmUSP22 (Smp_074400) está presente no cromossomo 6, possui maiores níveis de expressão em esquistossômulos do que cercárias e adultos. Machos LE-PZQ e recuperados de foram *down* regulados, isso pode indicar menor participação de complexos de ativação transcricional nesses parasitos, visto que *SmUSP22* é constituinte do complexo SAGA (Espinosa, 2008). Verificou a expressão de USP 22 em pacientes normais e com câncer do epitélio do ovário, em paciente normais os níveis variavam de 0,5 a 2,5 usando *GAPDH* como gene calibrador (Ji *et al.*, 2015). Células-tronco embrionárias requerem aumento na expressão de USP 22 e apresentam expressão desse gene em torno de 0,8 a 1,2 usando *ELF1* como gene calibrador (Sussman *et al.*, 2013). Os resultados do nosso estudo mostram que esse gene está *down* regulado nos vermes recuperados de camundongo *EBi3*^{-/-} porém os vermes controle apresentam níveis similares aos níveis encontrados em ortólogos.

SmUSP46 (Smp_000710) codifica para uma proteína nuclear, possui níveis de expressão maiores em esquistossômulos de 3h do que em esquistossômulos de 24h, cercárias e vermes adultos. Machos e fêmeas LE-PZQ e LE recuperado de *EBi3^{-/-}* foram *down* regulados indicando maior degradação de proteínas via lisossomo (Kowalski *et al.*, 2011). *SmUSP49-44* (Smp_123630) está presente no cromossomo 3, possui níveis maiores de expressão no estágio de cercária, machos LE-PZQ foram *down* regulados. Em um estudo que quantificou algumas USPs provenientes do vírus da hepatite C dentro de células hepáticas foi observado que a *USP46* era a mais expressa seguida da *USP44*, *USP7* e por ultimo *USP15* (Kusakabe *et al.*, 2019), em nossos experimentos a *USP7* foi a mais expressa e a *USP15* a menos expressa.

De modo geral os machos foram mais afetados quanto a expressão de *SmUSPs* tanto na cepa resistente ao praziquantel como nos parasitos recuperados de camundongos *EBi3^{-/-}*. Como as fêmeas ficam dentro do canal ginecóforo elas ficam mais protegidas da ação do Praziquantel e podem não ter sofrido tantas alterações como os machos, visto que a indução da resistência desses parasitos é realizada pela administração de concentrações crescentes da droga. Vale ressaltar que o proteassoma está bem mais expresso em machos do que em fêmeas por isso os machos estão sendo mais afetados do que fêmeas visto que essas enzimas competem com o proteassoma, em fêmeas ocorre maior atividade lisossomal de degradação e interessante a *SmUSP46* que está envolvida em degradação lisossomal foi estatisticamente significativa em fêmeas (Zhang, M. *et al.*, 2013). O tratamento com inibidores do proteassoma afeta o tegumento de *S. mansoni*, principalmente em machos, isso pode ajudar a explicar as alterações na expressão das USPs na cepa resistente ao praziquantel, pois segundo alguns estudos essa droga afeta canais de cálcio presentes no tegumento dos parasitos (Pinto-Almeida *et al.*, 2015; Morais *et al.*, 2017).

Os níveis de expressão de expressão de *SmMBD* caíram principalmente em machos nos parasitos recuperados de camundongos *EBi3^{-/-}*, esse resultado reforça o resultado do conteúdo de metilação no DNA de *S. mansoni*, visto que a proteína MBD está associada a regiões de DNA metilado e a taxa de metilação encontrada nos machos recuperados de *EBi3^{-/-}* foi menor que a taxa presente nos machos controle. Além disso, as fêmeas apresentaram níveis similares de expressão de *SmMBD* assim como de metilação. O casal LE-PZQ apresentou taxas similares de metilação do DNA com a fêmea controle e ao macho e fêmea recuperados de *EBi3^{-/-}*, esse mesmo fenômeno ocorreu também com a expressão de *SmMBD*, não foi verificado diferença sexo-específica entre os resistentes e o casal macho e fêmea

resistentes apresentaram diferença no conteúdo de metilação do DNA comparando com machos controle.

MBD, proteína de ligação ao metil CpG, é uma proteína que faz parte do complexo NuRD (nucleossomo remodelagem e deacetilase) juntamente com as HDACs e apresenta funções de repressão da cromatina, MBD2 e 3 estão presentes em invertebrados (Clapier e Cairns, 2009). Segundo Geyer *et al.* (2011) MBD e DNMT2 funcionam como um complexo de silenciamento e são corregulados em todos os estágios do ciclo de vida do parasito, sendo mais expressos nas fases presentes dentro do hospedeiro intermediário. Os níveis de expressão encontrados por esses autores diferem dos encontrados neste estudo para *SmMBD*, isso pode ser devido a termos usado machos e fêmeas separados e nos experimentos de Geyer *et al.* (2011) foram usados casais. Pode ser que o pareamento dos parasitos seja necessário para a expressão de *SmDNMT2* na fase de adulto, visto que não foi verificada expressão deste gene neste estudo e Geyer *et al.* (2011) verificou uma diminuição na quantidade e amadurecimento dos ovos quando a enzima DNMT era inibida.

Acetilação e deacetilação de histonas são modificações pós-traducionais bem estudadas em *S. mansoni*, neste trabalho a expressão dos genes responsáveis por essas modificações foi verificada com objetivo de comparação e verificação da reprodutividade em nossos parasitos. HATs acetilam resíduos de lisina da cauda N-terminal do centro das histonas, a acetilação de histonas via HATs anula a carga positiva das lisinas e reduz a compactação da cromatina, diminuindo a interação com o DNA, isso faz com que a transcrição seja aumentada (Maciel *et al.*, 2004; Carneiro *et al.*, 2009). *SmCBP1* (Smp_105910) é uma HAT, *Creb binding protein 1* nuclear, o gene que codifica esta proteína está presente no cromossomo 3 de *S. mansoni*. Existe em *S. mansoni*, CBP2 que também é uma HAT e apresenta níveis de expressão maiores que CBP1, porém foi utilizado CBP1 por a capacidade dessa enzima em interagir com receptores nucleares ser conhecida. Os níveis de expressão desse gene são maiores no estágio de cercária, porém não foi expressa pelos vermes utilizados nesse estudo (Bertin *et al.*, 2006).

SmGCN5 (Smp_070190) é uma HAT, Controle Geral não Reprimido 5, presente no núcleo, o gene que codifica esta proteína está presente no cromossomo 4 de *S. mansoni*, possui maiores níveis de expressão na fase de esquistossômulos (Maciel *et al.*, 2004). Segundo Maciel *et al.* (2004) machos no estágio de verme adulto possuem maior expressão que fêmeas adultas, isso corrobora com os resultados encontrados neste estudo. A expressão de CBP1 e de GCN5 em maior escala está diretamente relacionada com o desenvolvimento

normal de ovos e do aparelho reprodutor das fêmeas. 10% do RNAm de fêmeas adultas é representado pela proteína Smp 14, que é a principal proteína da casca do ovo, GCN5 e CBP1 acetilam o promotor de Smp14 aumentando a transcrição desse gene. A inibição de histona acetiltransferase tanto por RNAi como por inibidor enzimático em fêmeas acarreta má formação dos ovos, como espinho lateral anormal, casca descontínua, fissurada, com invaginações, além disso as fêmeas apresentam um ovário reduzido (Carneiro *et al.*, 2014).

Não houve diferença significativa na expressão de *SmGCN5* na cepa LE-PZQ nem na cepa controle. Em parasitos recuperados de camundongo *Ebi3^{-/-}* a fêmea apresentou um nível de expressão menor que culminou em diferença estatística entre machos controle e fêmea recuperada de *Ebi3^{-/-}*. Esses resultados sugerem que não houve alterações na acetilação de histonas induzida pelo sistema imune do hospedeiro nem induzida pelo desenvolvimento da resistência.

SmHDAC (histona deacetilase) 1, 3 e 8 possui mecanismo catalítico Zn^{2+} dependente. A *HDAC1* é uma proteína nuclear (Smp_005210), o gene que codifica esta proteína está localizado no cromossomo 1, apresenta maiores níveis de expressão em verme adulto. A *SmHDAC3* (Smp_093280) é uma proteína nuclear, o gene que codifica para esta proteína está localizado no cromossomo 5, possui maiores níveis de expressão no estágio de esquistossômulos. A *SmHDAC8* (Smp_091990) pode ocorrer tanto no núcleo como no citoplasma, o gene que codifica essa proteína está presente no cromossomo 1, assim como os genes que codificam para as histonas, apresenta maiores níveis de expressão em verme adulto. HDAC 8 é conservada em platelmintos e tem sido estudada para alvo de drogas, além de ser a HDAC mais expressa em todos os estágios do ciclo de vida do *S. mansoni* (Oger *et al.*, 2008; Anderson *et al.*, 2017; Guidi *et al.*, 2018). De acordo com Oger *et al.* (2008), que foram os autores que identificaram os genes das HDACs em *S. mansoni*, a *SmHDAC8* é mais expressa que a 1 e também que a 3 em todos os estágios de *S. mansoni* exceto esquistossômulo, eles também observaram que a expressão de *SmHDAC1*, 3 e 8 em fêmeas, cercárias e miracídios era maior que machos.

Neste trabalho não foi possível observar diferença estatística entre os parasitos macho e fêmea controle comparando com os parasitos resistentes ao praziquantel em relação à expressão de *SmHDACs*. Foi possível observar que existe uma diferença sexo-específica na expressão gênica de *SmHDAC8* no grupo controle que foi perdida na cepa resistente, a cepa LE-PZQ apresenta os níveis de expressão similares entre machos e fêmeas, isso pode estar ligado a aquisição de resistência nos machos LE-PZQ pois neles houve uma redução que

provavelmente culminou na perda dessa diferença. Essa mesma diferença sexo-específica de *SmHDAC8* presente no grupo controle também foi perdida nos parasitos recuperados de camundongo *EBi3^{-/-}*. Interessantemente, os parasitos recuperados de *EBi3^{-/-}* apresentaram diferença sexo-específica na expressão de *SmHDAC1*, que não ocorreu nos parasitos do grupo controle, isso mostra que os parasitos se adaptaram ao sistema imune do hospedeiro alterando a expressão de alguns genes aqui avaliados.

Já foi descrito primeiramente por Oger *et al.* (2008) que a *SmHDAC1* está envolvida no silenciamento de genes, eles observaram que a expressão de *NF-kB* foi aumentada quando havia inibidores de histona deacetilase (TSA) e também, a expressão foi aumentada em mutantes modificados para dois resíduos de histidina que é responsável por coordenar o átomo de Zn^{2+} no sítio ativo (H176/177A). O principal foco de estudo de *SmHDACs* têm sido em relação a inibição dessas enzimas, pois já foi descrito que essa inibição culmina em morte de esquistossômulos e adultos, relatando uma possível aplicação como tratamento da esquistossomose mansônica (Dubois *et al.*, 2009). Posteriormente o uso de inibidores de HDACs afetou a motilidade dos parasitos e a expressão de vários genes destacando genes relacionados à replicação e reparo do DNA (Anderson *et al.*, 2017).

Anteriormente foi detectado que *S. mansoni* possui um complexo de ribonucleoproteínas relacionado à resistência a drogas, o *Major Vault*, e que cepas resistentes tanto pareadas como desapareadas possuem maior expressão dessas *Vaults* (Reis *et al.*, 2014). Existe diversidade genética entre as populações de *S. mansoni*, porém essas variações não têm sido detectadas pelo sequenciamento do genoma, sugerindo que uma grande parte da resistência ocorre por influência epigenética (Cosseau *et al.*, 2017).

Foram utilizados machos e fêmeas separados também nos experimentos de expressão de miRNAs de *S. mansoni*, pois é sabido que existem diferenças na expressão gênica entre os sexos, existem miRNAs que são sexo específicos, exclusivos do cromossomo W, sendo que já foi descrito que a proporção de H3K27me, marca de heterocromatina facultativa, é maior em fêmeas adultas do que em machos adultos (De Souza Gomes *et al.*, 2011; Picard *et al.*, 2016).

Pouco se sabe sobre a importância dos lncRNAs durante infecções parasitárias. Foi relatado que o *Toxoplasma gondii* tem a capacidade de controlar através de suas enzimas lncRNA dos hospedeiros que seriam instrumentais para desencadear adequadamente a resposta imune (Menard *et al.*, 2018). Já em vermes parasitas ocorre principalmente a regulação positiva de lncRNAs durante a infecção por *Echinococcus granulosus*. No mesmo estudo, eles analisaram os alvos desses lncRNAs e fatores de transcrição que regulam a

expressão desses lncRNAs, observando que as vias relacionadas a processos inflamatórios e proliferação de células isoladas do baço foram afetadas (Yu *et al.*, 2018).

Um estudo anterior encontrou altos níveis de expressão do retrotransposon LTR em *S. mansoni* adulto resistente ao praziquantel e suscetível ao praziquantel e níveis comparáveis para lncRNAs (Oliveira *et al.*, 2018). Como os fígados dos animais infectados contêm ovos, a expressão dos lncRNAs de *S. mansoni* encontrados nos fígados pode ser devido à extração do RNA dos ovos juntamente com o RNA do fígado do camundongo infectado (ao invés da liberação de lncRNA nos tecidos do hospedeiro).

Também foi relatado que o lncRNA com o código LINC02394 codificado por *S. mansoni* estava sendo super expresso em adultos de *S. mansoni* (Vasconcelos *et al.*, 2017). O lncRNA humano LINC02394 foi encontrado em pacientes com hepatocarcinoma, isso mostra que existe conservação de *S. mansoni* e os lncRNAs humanos indicando uma possível conservação de *S. mansoni* e lncRNAs de camundongos (Xu *et al.*, 2018). A liberação de lncRNA codificado por parasita nos tecidos do hospedeiro pode ocorrer durante o processo da doença, pois todos os lncRNAs avaliados no fígado já haviam sido previamente validados nos estágios de *S. mansoni* que interagem de alguma forma com o hospedeiro definitivo, no caso cercária, esquistossômulos, adultos e ovos (Oliveira *et al.*, 2018).

Alguns lncRNAs foram estudados como indicadores de tumores malignos, incluindo osteossarcoma (Li *et al.*, 2017), tumores hepáticos (Wang *et al.*, 2019) e inflamação (Yarani *et al.*, 2018). lncRNAs normalmente têm baixos níveis de expressão e também são comumente afetados em condições adversas, como doenças (Quinn e Chang, 2015). Outra vantagem do uso de lncRNAs em ferramentas de diagnóstico é sua estabilidade. Os lncRNAs são estáveis por até 48 h e essa estabilidade pode estar relacionada à sua localização no genoma, com os lncRNAs intrônicos sendo menos estáveis do que os de origem intergênica (Clark *et al.*, 2012). O fato de as estruturas dos lncRNAs serem mais conservadas do que suas sequências de nucleotídeos significa que os lncRNAs têm outra vantagem sobre os miRNAs, ou seja, seus mecanismos de ação não dependem apenas do pareamento de bases, como no caso dos miRNAs (Diederichs, 2014).

Foi feito um ensaio preliminar qualitativo para detecção de miRNAs e lncRNAs de *S. mansoni* no plasma de camundongos *EBi3^{-/-}*, visando um futuro uso deles como biomarcadores. Neste ensaio foi possível detectar todos os miRNAs testados tanto no controle como no infectado, exceto o miR-190-3p, que foi encontrado somente no infectado. É possível que esses miRNAs sejam conservados no camundongo e no parasito. Em relação aos

lncRNAs, o *lncRNA 5*, *6* e *7* foram detectados no plasma de *EBi3^{-/-}*, vale ressaltar que esses lncRNAs não foram os mais expressos no fígado. Segundo Oliveira *et al.* (2018) o *lncRNA 5* tem por alvo a subunidade beta 1 do proteossoma, *lncRNA 6* tem por alvo a U3 ribonucleoproteína nucleolar e o *lncRNA 7* a cadeia E da ATP sintase e histona putativa H2A.

Samoil *et al.* (2018) identificaram os miR-190-5p e 3p, miR-124-3p, miR-125A, dentre outros, ele usou gradiente de sacarose para purificar vesículas secretadas por *S. mansoni*, confirmou a presença das vesículas por microscopia eletrônica e western blot, usando anticorpos comuns em vesículas secretórias (anti-enolases e anti-HSP). Nesse mesmo estudo eles analisaram as proteínas constituintes das vesículas secretadas por *S. mansoni* e encontraram talin, que faz ancoragem de integrinas no citoesqueleto, ele reforçou a ideia de que essas proteínas contribuem desse modo com a sinalização dentro das vesículas secretórias de *S. mansoni* no plasma, sabe-se que o miR-190 é oriundo da região intrônica do talin.

Dados anteriores não publicados do nosso laboratório mostram que miR124 3P possui vários alvos em RNAm de proteínas importantes de *S. mansoni*, tais como chaperonas DNAj (Smp_068230), proteína de polaridade celular (Smp_082810.1), proteínas vesiculares (Smp_051080), miosinas da musculatura do parasito (Smp_103000.1, Smp_103000.2) e outras. Estes mesmos dados mostram também que miR125A possui alvos em RNAm de proteínas do citoesqueleto (Smp_173320), ciclinas (Smp_076560.1), liases (Smp_056370), tirosina cinases específica envolvida na produção de ovos (Smp_136300), entre outros alvos. O miR190 possui as duas fitas funcionais, o miR190 3P possui alvos no RNAm de proteínas de mitocôndria (Smp_184440, Smp_184550, Smp_110870), chaperonas (Smp_062420.1), proteínas transmembrana (Smp_078750.2), proteínas da musculatura (Smp_031770.15), já o miR190 5P possui alvos no RNAm de subunidade alfa 6 do proteossoma (Smp_130110), enzima conjugadora de Nedd8 (Smp_027370), proteína secretada do ovo (Smp_180320.1), transportador de fosfato sódio dependente (Smp_171630), entre outros (De Souza Gomes *et al.*, 2011).

LncRNAs e miRNAs exossomais têm sido explorados intensamente pois podem ser internalizados por células distantes das células de origem, sendo facilitadores na comunicação entre os tecidos, mas além disso podem alterar respostas imunes e auxiliar parasitos no processo de adaptação ao hospedeiro. Nesse sentido muitos estudos tem objetivado o uso dessas moléculas para fins terapêuticos e diagnósticos, principalmente estudos relacionados ao câncer (Dragomir *et al.*, 2018). Nosso objetivo foi verificar se 15 lncRNAs previamente identificados no laboratório poderiam ser secretados por *S. mansoni*, foram detectados 3

lncRNAs no plasma. Alguns trabalhos como o que Samoil *et al.* (2018) usou para recuperar miRNAs do soro, utilizam técnicas específicas para isolamento dos exossomas durante a extração, a adequação dessas técnicas talvez facilite a detecção de mais lncRNAs candidatos dentre os previamente identificados.

Em conjunto, os resultados sugerem que O sistema imunológico do hospedeiro pode influenciar a expressão gênica e a quantidade de ovos produzidos pelo parasita, o que, nesse caso, levou a uma infecção menos intensa. O hospedeiro, por sua vez, reage a esse padrão de infecção modulando a expressão de genes responsáveis pela metilação e demetilação do DNA, que podem interferir na regulação transcricional de vários genes, alterando a gravidade da doença.

Neste estudo, a ausência de IL27 por nocaute de EBi3 pode ter desencadeado uma diminuição no IFN γ e uma diminuição no volume de granulomas, uma vez que essa citocina é importante na fase aguda da esquistossomose para manutenção do processo inflamatório ao longo do granuloma. O impacto da IL35 deve ser mais evidente na fase crônica da esquistossomose mansoni, na qual há um aumento na resposta imune regulatória, uma vez que IL35 tem uma forte função anti-inflamatória/reguladora. O hospedeiro reagiu a esse padrão mais suave de infecção e modulou a expressão de genes responsáveis por alterações no estado da cromatina, o que pode interferir na regulação transcricional de vários genes.

7 Conclusões

Neste trabalho foi realizada a avaliação de alguns parâmetros epigenéticos usando o modelo *EBi3^{-/-}* que foram associados a parâmetros parasitológicos durante a infecção por *S. mansoni*. Foi possível perceber que existem diferenças significativas na infecção em C57BL/6 *EBi3^{-/-}*, a ausência de *Epstein-Barr virus induced gene 3* acarretou menor dano hepático fato evidenciado pela análise morfométrica dos granulomas e menor postura de ovos aparente pelo parasito pela quantidade de ovos no fígado e nas fezes. No modelo C57BL/6 *EBi3^{-/-}* existe maiores taxas de metilação do DNA devido à detecção de 5-mC por ELISA e devido a menor expressão de TETs nesses grupos. Podemos concluir também que os parasitos também sofreram alterações na expressão de vários genes, ocorreu diminuição na expressão das USPs. A diminuição da metilação em parasitos recuperados de C57BL/6 *EBi3^{-/-}* foi corroborada com a diminuição na expressão de *MBD*. Foi possível detectar miRNAs e lncRNAs no soro dos camundongos, isso abre perspectivas para o desenvolvimento de novas ferramentas terapêuticas e de diagnóstico.

Com essas análises, foi possível perceber que o parasita se comporta de maneira diferente em resposta ao sistema imunológico do hospedeiro. Os genes de compactação/descompactação da cromatina são alterados em *S. mansoni*, o que reflete na quantidade de ovos produzidos que foram detectados no fígado e nas fezes dos camundongos. Como analisamos a expressão de genes epigenéticos em *S. mansoni*, é provável que as diferenças observadas influenciem a expressão de outros genes parasitas. Outros estudos já observaram que cercárias exibem variabilidade significativa de sobrevivência, dependendo da linhagem de camundongo usada, além disso as vacinas contra a esquistossomose até agora demonstraram pouca eficácia. Talvez a capacidade de adaptação do parasita ao sistema imunológico do hospedeiro, desencadeando um perfil de infecção diferente, como mostrado neste estudo, seja um dos fatores que dificultem a descoberta de uma vacina eficiente se compararmos controles com nocautes abrindo novas perspectivas epigenéticas em relação a interação parasito-hospedeiro na infecção por *S. mansoni*.

8 Perspectivas

- MS do extrato de proteínas nucleares em fígado de camundongos e de *S. mansoni* visando análise de modificação pós-traducional;
- Citometria de fluxo para análise comparativa do perfil imunológico dos camundongos nocaute versus selvagens infectados;
- Análise de MET e MEV de *S. mansoni* recuperado de C57BL/6 *EBi3^{-/-}*.

9 Referências

AMARAL, K. B. et al. Histological assessment of granulomas in natural and experimental *Schistosoma mansoni* infections using whole slide imaging. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p. e0184696, 2017. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184696> >.

AMBROSI, C.; MANZO, M.; BAUBEC, T. Dynamics and Context-Dependent Roles of DNA Methylation. **Journal of Molecular Biology**, v. 429, n. 10, p. 1459-1475, 2017/05/19/2017. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283617300839> >.

ANDERSON, L. et al. Histone deacetylase inhibition modulates histone acetylation at gene promoter regions and affects genome-wide gene transcription in *Schistosoma mansoni*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 4, p. e0005539, 2017. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005539> >.

ANDERSON, S. et al. Formation of Multinucleated Giant Cells in the Mouse Lung Is Promoted in the Absence of Interleukin-12. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 20, n. 3, p. 371-378, 1999. Disponível em: < <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1165/ajrcmb.20.3.3317> >.

ARONSON, J. K.; FERNER, R. E. Biomarkers-A General Review. **Current protocols in pharmacology**, United States, v. 76, p. 9.23.1-9.23.17, 2017. ISSN 1934-8290. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28306150> >.

ARTIS, D. et al. Cutting Edge: Early IL-4 Production Governs the Requirement for IL-27-WSX-1 Signaling in the Development of Protective Th1 Cytokine Responses following *Leishmania major* Infection. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 8, p. 4672-4675, 2004. Disponível em: < <https://www.jimmunol.org/content/jimmunol/172/8/4672.full.pdf> >.

BABAYAN, S. A. et al. Filarial Parasites Develop Faster and Reproduce Earlier in Response to Host Immune Effectors That Determine Filarial Life Expectancy. **PLOS Biology**, v. 8, n. 10, p. e1000525, 2010. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000525> >.

BACH SVITLANA, V.; HEGDE ASHOK, N. **The proteasome and epigenetics: zooming in on histone modifications**. *Biomolecular Concepts*. 7: 215 p. 2016.

BERTIN, B. et al. *Schistosoma mansoni* CBP/p300 has a conserved domain structure and interacts functionally with the nuclear receptor SmFtz-F1. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 146, n. 2, p. 180-191, 2006/04/01/ 2006. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166685105003634> >.

BIAN, E.-B. et al. New advances of DNA methylation in liver fibrosis, with special emphasis on the crosstalk between microRNAs and DNA methylation machinery. **Cellular Signalling**, v. 25, n. 9, p. 1837-1844, 2013/09/01/ 2013. ISSN 0898-6568. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0898656813001423> >.

BINDA, O. et al. Trimethylation of histone H3 lysine 4 impairs methylation of histone H3 lysine 9: Regulation of lysine methyltransferases by physical interaction with their substrates. **Epigenetics**, v. 5, n. 8, p. 767-775, 2010. ISSN 1559-2294 1559-2308. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3052887/> >.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

CAI, P. et al. MicroRNA-Gene Expression Network in Murine Liver during *Schistosoma japonicum* Infection. **PLoS ONE**, San Francisco, USA, v. 8, n. 6, p. e67037, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3692539/> >.

CARNEIRO, V. C. et al. Epigenetic Changes Modulate Schistosome Egg Formation and Are a Novel Target for Reducing Transmission of Schistosomiasis. **PLOS Pathogens**, v. 10, n. 5, p. e1004116, 2014. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004116> >.

CARNEIRO, V. C. et al. The extracellular release of *Schistosoma mansoni* HMGB1 nuclear protein is mediated by acetylation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 390, n. 4, p. 1245-1249, 2009/12/25/ 2009. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X09021202> >.

CHEN, L.-L. Linking Long Noncoding RNA Localization and Function. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 9, p. 761-772, 2016. ISSN 0968-0004. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.07.003> >. Acesso em: 2019/02/27.

CLAPIER, C. R.; CAIRNS, B. R. The Biology of Chromatin Remodeling Complexes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, n. 1, p. 273-304, 2009. Disponível em: < <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.biochem.77.062706.153223> >.

CLARK, M. B. et al. Genome-wide analysis of long noncoding RNA stability. **Genome research**, v. 22, n. 5, p. 885-898, 2012. ISSN 1549-5469 1088-9051. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22406755>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC3337434/> >.

COLE, A. J.; CLIFTON-BLIGH, R.; MARSH, D. J. Histone H2B monoubiquitination: roles to play in human malignancy. **Endocrine-Related Cancer**, v. 22, n. 1, p. T19-T33, February

1, 2015 2015. Disponível em: < <http://erc.endocrinology-journals.org/content/22/1/T19.abstract> >.

CORNELISSEN, T. et al. The deubiquitinase USP15 antagonizes Parkin-mediated mitochondrial ubiquitination and mitophagy. **Human Molecular Genetics**, v. 23, n. 19, p. 5227-5242, 2014. ISSN 0964-6906. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddu244> >.

COSSEAU, C. et al. (Epi)genetic Inheritance in *Schistosoma mansoni*: A Systems Approach. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 4, p. 285-294, 2017. ISSN 1471-4922. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492216302240> >.

COUTO, F. F. et al. *Schistosoma mansoni*: a method for inducing resistance to praziquantel using infected *Biomphalaria glabrata* snails. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 153-157, 2011. ISSN 0074-0276. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762011000200006&nrm=iso >.

DARWIN, K. H. Prokaryotic ubiquitin-like protein (Pup), proteasomes and pathogenesis. **Nat Rev Micro**, v. 7, n. 7, p. 485-491, 2009. ISSN 1740-1526. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2148> >.

DAVIES, S. J. et al. Modulation of Blood Fluke Development in the Liver by Hepatic CD4+ Lymphocytes. **Science**, v. 294, n. 5545, p. 1358, 2001. Disponível em: < <http://science.sciencemag.org/content/294/5545/1358.abstract> >.

DE BIE, P.; ZAAROR-REGEV, D.; CIECHANOVER, A. Regulation of the Polycomb protein RING1B ubiquitination by USP7. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 400, n. 3, p. 389-395, 2010/09/24/ 2010. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X10015925> >.

DE OLIVEIRA, F. L. et al. Galectin-3, histone deacetylases, and Hedgehog signaling: Possible convergent targets in schistosomiasis-induced liver fibrosis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, p. e0005137, 2017. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005137> >.

DE SOUZA GOMES, M. et al. Genome-wide identification of novel microRNAs and their target genes in the human parasite *Schistosoma mansoni*. **Genomics**, v. 98, n. 2, p. 96-111, 2011. ISSN 0888-7543. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0888754311001315> >.

DEVERGNE, O. et al. A novel interleukin-12 p40-related protein induced by latent Epstein-Barr virus infection in B lymphocytes. **Journal of virology**, v. 70, n. 2, p. 1143-1153, 1996.

ISSN 0022-538X 1098-5514. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8551575>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC189923/> >.

DIEDERICHS, S. The four dimensions of noncoding RNA conservation. **Trends in Genetics**, v. 30, n. 4, p. 121-123, 2014. ISSN 0168-9525. Disponível em: <
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.01.004> >. Acesso em: 2019/04/01.

DRAGOMIR, M.; CHEN, B.; CALIN, G. A. Exosomal lncRNAs as new players in cell-to-cell communication. **Translational cancer research**, v. 7, n. Suppl 2, p. S243-S252, 2018. ISSN 2218-676X 2219-6803. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30148073>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6107076/> >.

DUBOIS, F. et al. Histone deacetylase inhibitors induce apoptosis, histone hyperacetylation and up-regulation of gene transcription in *Schistosoma mansoni*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 168, n. 1, p. 7-15, 2009/11/01/ 2009. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166685109001601> >.

DUPONT, C.; ARMANT, D. R.; BRENNER, C. A. Epigenetics: Definition, Mechanisms and Clinical Perspective. **Seminars in reproductive medicine**, v. 27, n. 5, p. 351-357, 2009. ISSN 1526-8004 1526-4564. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2791696/> >.

EDWARDS, J. R. et al. DNA methylation and DNA methyltransferases. **Epigenetics & Chromatin**, v. 10, n. 1, p. 23, May 08 2017. ISSN 1756-8935. Disponível em: <
<https://doi.org/10.1186/s13072-017-0130-8> >.

Epigenetic biomarker development. **Epigenomics**, v. 1, n. 1, p. 99-110, 2009. Disponível em: < <https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/epi.09.6> >.

ESPINOSA, J. M. Histone H2B ubiquitination: the cancer connection. **Genes & development**, v. 22, n. 20, p. 2743-2749, 2008. ISSN 0890-9369 1549-5477. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18923072>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC2751279/> >.

FAESEN, ALEX C.; LUNA-VARGAS, MARK P. A.; SIXMA, TITIA K. The role of UBL domains in ubiquitin-specific proteases. **Biochemical Society Transactions**, v. 40, n. 3, p. 539-545, 2012.

FAGERBERG, L. et al. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 13, n. 2, p. 397-406, 2014. ISSN 1535-9484 1535-9476. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24309898>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3916642/> >.

FITZPATRICK, J. M.; HOFFMANN, K. F. Dioecious *Schistosoma mansoni* express divergent gene repertoires regulated by pairing. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 10, p. 1081-1089, 2006/09/01/ 2006. ISSN 0020-7519. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751906002360> >.

FNEICH, S. et al. Epigenetic origin of adaptive phenotypic variants in the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. **Epigenetics & Chromatin**, v. 9, n. 1, p. 27, 2016. ISSN 1756-8935. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/s13072-016-0076-2> >.

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 Pathogens**, v. 14, n. 6, p. e1007107, 2018. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007107> >.

GEYER, K. K. et al. Cytosine methylation regulates oviposition in the pathogenic blood fluke *Schistosoma mansoni*. v. 2, p. 424, 2011. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms1433> >.

GUIDI, A. et al. Identification of novel multi-stage histone deacetylase (HDAC) inhibitors that impair *Schistosoma mansoni* viability and egg production. **Parasites & vectors**, v. 11, n. 1, p. 668-668, 2018. ISSN 1756-3305. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30587243>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6307185/> >.

HAGGLUND, R. et al. Herpes simplex virus 1-infected cell protein 0 contains two E3 ubiquitin ligase sites specific for different E2 ubiquitin-conjugating enzymes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 2, p. 631-636, January 22, 2002 2002. Disponível em: < <http://www.pnas.org/content/99/2/631.abstract> >.

HALL, A. O.; SILVER, J. S.; HUNTER, C. A. The immunobiology of IL-27. **Adv Immunol**, v. 115, p. 1-44, 2012. ISSN 1557-8445 (Electronic) 0065-2776 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22608254> >.

HAN, J. et al. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. **Genes & Development**, v. 18, n. 24, p. 3016-3027, 2004. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC535913/> >.

HANDY, D. E.; CASTRO, R.; LOSCALZO, J. Epigenetic Modifications: Basic Mechanisms and Role in Cardiovascular Disease. **Circulation**, v. 123, n. 19, p. 2145-2156, 2011. ISSN 0009-7322 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3107542/> >.

HOFFMAN, W. A.; A POXS, J. **The Sedimentation-Concentration Method In Schistosomiasis mansoni**. 1934.

HOY, A. M. et al. Parasite-Derived MicroRNAs in Host Serum As Novel Biomarkers of Helminth Infection. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 2, p. e2701, 2014. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002701> >.

HU, J. et al. The role of the miR-31/FIH1 pathway in TGF- β -induced liver fibrosis. **Clinical Science**, v. 129, n. 4, p. 305-317, 2015.

HU, L. et al. Structural insight into substrate preference for TET-mediated oxidation. **Nature**, v. 527, n. 7576, p. 118-122, 2015. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature15713> >.

J A EICHHORN, P. et al. **USP15 stabilizes TGF-beta receptor I and promotes oncogenesis through the activation of TGF-beta signaling in glioblastoma**. 2012. 429-35.

JANKOVIC, D. et al. **Schistosome-Infected IL-4 Receptor Knockout (KO) Mice, in Contrast to IL-4 KO Mice, Fail to Develop Granulomatous Pathology While Maintaining the Same Lymphokine Expression Profile1**. 1999. 337-42.

JL, M. et al. Ubiquitin specific protease 22 promotes cell proliferation and tumor growth of epithelial ovarian cancer through synergy with transforming growth factor β 1. **Oncology reports**, Greece, v. 33, n. 1, p. 133-140, 2015. ISSN 1791-2431. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25369910> >.

KAMDEM, S. D. et al. Host Regulators of Liver Fibrosis During Human Schistosomiasis. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 2781-2781, 2018. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30546364>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6279936/> >.

KOWALSKI, J. R.; DAHLBERG, C. L.; JUO, P. The deubiquitinating enzyme USP-46 negatively regulates the degradation of glutamate receptors to control their abundance in the ventral nerve cord of *C. elegans*. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 31, n. 4, p. 1341-1354, 2011. ISSN 0270-6474 1529-2401. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3084541/> >.

KUSAKABE, S. et al. USP15 Participates in Hepatitis C Virus Propagation through Regulation of Viral RNA Translation and Lipid Droplet Formation. **Journal of virology**, v. 93, n. 6, p. e01708-18, 2019. ISSN 1098-5514 0022-538X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30626683>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6401473/> >.

LEUTNER, S. et al. Combinatory Microarray and SuperSAGE Analyses Identify Pairing-Dependently Transcribed Genes in *Schistosoma mansoni* Males, Including Follistatin. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 11, p. e2532, 2013. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002532> >.

LI, M. et al. Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. **Nature**, v. 416, n. 6881, p. 648-653, 2002. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature737> >.

LI, X. et al. The deubiquitination enzyme USP46 functions as a tumor suppressor by controlling PHLPP-dependent attenuation of Akt signaling in colon cancer. **Oncogene**, v. 32, n. 4, p. 471-478, 2013. ISSN 0950-9232 1476-5594. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3371166/> >.

LI, X. et al. Tet proteins influence the balance between neuroectodermal and mesodermal fate choice by inhibiting Wnt signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 51, p. E8267-E8276, 2016. Disponível em: < <https://www.pnas.org/content/pnas/113/51/E8267.full.pdf> >.

LI, Z. et al. Application of Long Noncoding RNAs in Osteosarcoma: Biomarkers and Therapeutic Targets. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 4, p. 1407-1419, 2017. ISSN 1015-8987. Disponível em: < <https://www.karger.com/DOI/10.1159/000479205> >.

LIU, A. et al. DNA methylation is involved in pro-inflammatory cytokines expression in T-2 toxin-induced liver injury. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, England, v. 132, p. 110661-110661, 2019. ISSN 1873-6351. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31279042> >.

LIU, S. et al. Genome-wide identification and characterization of a panel of house-keeping genes in *Schistosoma japonicum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 182, n. 1, p. 75-82, 2012/03/01/ 2012. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166685112000023> >.

MA, N. et al. Ebi3 promotes T- and B-cell division and differentiation via STAT3. **Molecular Immunology**, v. 107, p. 61-70, 2019/03/01/ 2019. ISSN 0161-5890. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589018305947> >.

MACIEL, L. F. et al. Weighted Gene Co-Expression Analyses Point to Long Non-Coding RNA Hub Genes at Different *Schistosoma mansoni* Life-Cycle Stages. **Frontiers in Genetics**, v. 10, n. 823, 2019-September-12 2019. ISSN 1664-8021. Disponível em: < <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2019.00823> >.

MACIEL, R. D. M. et al. *Schistosoma mansoni* histone acetyltransferase GCN5: linking histone acetylation to gene activation. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 133, n. 1, p. 131-135, 2004/01/01/ 2004. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166685103002603> >.

MARCO, A. et al. Sex-Biased Expression of MicroRNAs in *Schistosoma mansoni*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 9, p. e2402, 2013. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002402> >.

MAYER, K. D. et al. Cutting Edge: T-bet and IL-27R Are Critical for In Vivo IFN- γ Production by CD8 T Cells during Infection. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 2, p. 693-697, 2008. Disponível em: < <https://www.jimmunol.org/content/jimmunol/180/2/693.full.pdf> >.

MCKERROW, J.; SALTER, J. Invasion of skin by *Schistosoma cercariae*. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 5, p. 193-195, 2002. ISSN 1471-4922. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02309-7](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02309-7) >. Acesso em: 2019/03/25.

MCMANUS, D. P. et al. Schistosomiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 13, 2018/08/09 2018. ISSN 2056-676X. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0013-8> >.

MENARD, K. L. et al. *Toxoplasma gondii* Manipulates Expression of Host Long Noncoding RNA during Intracellular Infection. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 15017, 2018/10/09 2018. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33274-5> >.

MENINGHER, T. et al. Schistosomal MicroRNAs Isolated From Extracellular Vesicles in Sera of Infected Patients: A New Tool for Diagnosis and Follow-up of Human Schistosomiasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 215, n. 3, p. 378-386, 2017. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiw539> >.

MORAIS, E. R. et al. Effects of proteasome inhibitor MG-132 on the parasite *Schistosoma mansoni*. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p. e0184192, 2017. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184192> >.

MORAN-SALVADOR, E.; MANN, J. Epigenetics and Liver Fibrosis. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v. 4, n. 1, p. 125-134, ISSN 2352-345X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcmgh.2017.04.007> >. Acesso em: 2017/11/07.

NEVES, D. P. Parasitologia humana. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, p. 288-288, 1992. ISSN 0036-4665. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46651992000400018&nrm=iso >.

NISHIDA, H. et al. Histone H3 acetylated at lysine 9 in promoter is associated with low nucleosome density in the vicinity of transcription start site in human cell. **Chromosome Research**, v. 14, n. 2, p. 203-211, 2006/03/01 2006. ISSN 1573-6849. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s10577-006-1036-7> >.

NOGI, T. et al. A Novel Biological Activity of Praziquantel Requiring Voltage-Operated Ca²⁺ Channel β Subunits: Subversion of Flatworm Regenerative Polarity. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 6, p. e464, 2009. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000464> >.

OGER, F. et al. The class I histone deacetylases of the platyhelminth parasite *Schistosoma mansoni*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 377, n. 4, p. 1079-1084, 2008. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X08020858> >.

OLIVEIRA, V. F. et al. Identification of 170 New Long Noncoding RNAs in *Schistosoma mansoni*. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 9, 2018. Disponível em: < <https://doi.org/10.1155/2018/1264697> >.

PEARCE, E. J. et al. Th2 response polarization during infection with the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. **Immunological Reviews**, v. 201, n. 1, p. 117-126, 2004. ISSN 1600-065X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00187.x> >.

PEREIRA, R. V. et al. Ubiquitin-specific proteases are differentially expressed throughout the *Schistosoma mansoni* life cycle. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 349, 2015/06/26 2015. ISSN 1756-3305. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-0957-4> >.

PERRIN, C. et al. *Schistosoma mansoni* Mucin Gene (SmPoMuc) Expression: Epigenetic Control to Shape Adaptation to a New Host. **PLOS Pathogens**, v. 9, n. 8, p. e1003571, 2013. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003571> >.

PFLANZ, S. et al. IL-27, a Heterodimeric Cytokine Composed of EB13 and p28 Protein, Induces Proliferation of Naive CD4⁺ T Cells. **Immunity**, v. 16, n. 6, p. 779-790, 2002. ISSN

1074-7613. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00324-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00324-2) >. Acesso em: 2019/08/19.

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 Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 9, p. e0004930, 2016. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004930> >.

PINTO-ALMEIDA, A. et al. The Role of Efflux Pumps in *Schistosoma mansoni* Praziquantel Resistant Phenotype. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. e0140147, 2015. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140147> >.

PINTO-ALMEIDA, A. et al. Morphological Characteristics of *Schistosoma mansoni* PZQ-Resistant and -Susceptible Strains Are Different in Presence of Praziquantel. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 594, 2016. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4844704/> >.

PROTASIO, A. V. et al. MiR-277/4989 regulate transcriptional landscape during juvenile to adult transition in the parasitic helminth *Schistosoma mansoni*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, CA USA, v. 11, n. 5, p. e0005559, 2017. ISSN 1935-2727 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5459504/> >.

QUEIROZ, F. R. et al. Differential expression of small RNA pathway genes associated with the *Biomphalaria glabrata*/*Schistosoma mansoni* interaction. **PLoS ONE**, v. 12, n. 7, p. e0181483, 2017. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181483> >.

QUINN, J. J.; CHANG, H. Y. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, p. 47, 2015. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/nrg.2015.10> >.

RADDATZ, G. et al. Dnmt2-dependent methylomes lack defined DNA methylation patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 21, p. 8627-8631, May 21, 2013. Disponível em: < <http://www.pnas.org/content/110/21/8627.abstract> >.

REIS, E. V. et al. Characterisation of major vault protein during the life cycle of the human parasite *Schistosoma mansoni*. **Parasitology International**, v. 63, n. 1, p. 120-126, 2014/02/01/ 2014. ISSN 1383-5769. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383576913001657> >.

RODERBURG, C.; LUEDDE, T. Circulating microRNAs as markers of liver inflammation, fibrosis and cancer. **Journal of Hepatology**, v. 61, n. 6, p. 1434-1437, 2014/12/01/ 2014. ISSN 0168-8278. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168827814005169> >.

ROQUIS, D. 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> >.

ROQUIS, D. 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://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007066> >.

SAMOIL, V. et al. Vesicle-based secretion in schistosomes: Analysis of protein and microRNA (miRNA) content of exosome-like vesicles derived from *Schistosoma mansoni*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 3286, 2018/02/19 2018. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21587-4> >.

SAÚDE, M. D. **Vigilância da esquistossomose mansoni**. TRANSMISSÍVEIS, D. D. V. D. D. Brasília, DF: Site: www.saude.gov.br/svs. 3: 1-146 p. 2017.

ŞENYILDIZ, M. et al. Alteration on global and gene-specific DNA methylation and global histone modifications in HepG2 cells in response to BPA. **Journal of Pharmacy of Istanbul University**, v. 46, p. 97-114, 2016.

SHAINHEIT, M. G. et al. Disruption of Interleukin-27 Signaling Results in Impaired Gamma Interferon Production but Does Not Significantly Affect Immunopathology in Murine Schistosome Infection. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 6, p. 3169-3177, 2007. ISSN 0019-9567 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1932859/> >.

SHI, C. et al. Ubiquitin Specific Protease 15 Has an Important Role in Regulating Grain Width and Size in Rice. **Plant physiology**, v. 180, n. 1, p. 381-391, 2019. ISSN 1532-2548

0032-0889. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30796160>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6501108/> >.

SHIMOZATO, O. et al. The secreted form of p28 subunit of interleukin (IL)-27 inhibits biological functions of IL-27 and suppresses anti-allogeneic immune responses. **Immunology**, v. 128, n. 1 Suppl, p. e816-e825, 2009. ISSN 1365-2567

0019-2805. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19740343>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2753920/> >.

SMITHERS, S. R.; TERRY, R. J. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. **Parasitology**, v. 55, n. 4, p. 695-700, 1965. ISSN 0031-1820. Disponível em: <

<https://www.cambridge.org/core/article/infection-of-laboratory-hosts-with-cercariae-of-schistosoma-mansoni-and-the-recovery-of-the-adult-worms/F9C2A9D32AE12B2199C229042B6EBDFC> >.

STADECKER, M. J. et al. The immunobiology of Th1 polarization in high-pathology schistosomiasis. **Immunological Reviews**, v. 201, n. 1, p. 168-179, 2004. ISSN 1600-065X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00197.x> >.

SU, D. et al. Ubiquitin-specific protease 7 sustains DNA damage response and promotes cervical carcinogenesis. **The Journal of clinical investigation**, v. 128, n. 10, p. 4280-4296, 2018. ISSN 1558-8238 0021-9738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30179224>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6159995/> >.

SUSSMAN, R. T. et al. The epigenetic modifier ubiquitin-specific protease 22 (USP22) regulates embryonic stem cell differentiation via transcriptional repression of sex-determining region Y-box 2 (SOX2). **The Journal of biological chemistry**, v. 288, n. 33, p. 24234-24246, 2013. ISSN 1083-351X 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23760504>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3745368/> >.

THAKRAL, S.; GHOSHAL, K. miR-122 is a Unique Molecule with Great Potential in Diagnosis, Prognosis of Liver Disease, and Therapy Both as miRNA Mimic and Antimir. **Current gene therapy**, v. 15, n. 2, p. 142-150, 2015. ISSN 1566-5232

1875-5631. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4439190/> >.

TROTMAN, L. C. et al. Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression. **Cell**, v. 128, n. 1, p. 141-156, 2007. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1855245/> >.

VAN DER HORST, A. et al. **FOXO4 transcriptional activity is regulated by monoubiquitination and USP7/HAUSP**. 2006. 1064-1073.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, v. 3, n. 7, p. RESEARCH0034-RESEARCH0034, 2002. ISSN 1474-760X

1465-6906. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12184808>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC126239/> >.

VASCONCELOS, E. J. R. et al. The *Schistosoma mansoni* genome encodes thousands of long non-coding RNAs predicted to be functional at different parasite life-cycle stages. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 10508, 2017/09/05 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10853-6> >.

VIGNALI, D. A. A.; KUCHROO, V. K. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. **Nature Immunology**, v. 13, n. 8, p. 722-728, 2012/08/01 2012. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/ni.2366> >.

WANG, Y. et al. MIR210HG predicts poor prognosis and functions as an oncogenic lncRNA in hepatocellular carcinoma. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 111, p. 1297-1301, 2019/03/01/ 2019. ISSN 0753-3322. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332218379459> >.

WATANABE, K. et al. Emergence of the Dedifferentiated Phenotype in Hepatocyte-Derived Tumors in Mice: Roles of Oncogene-Induced Epigenetic Alterations. **Hepatology Communications**, v. 3, n. 5, p. 697-715, 2019. ISSN 2471-254X. Disponível em: < <https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/hep4.1327> >.

WHO. Department of control of neglected tropical diseases - **Schistosomiasis and soil transmitted helminthiases: number of people treated in 2017**. Weekly epidemiological record. 50: 12 p. p. 2018.

WILSON, R. et al. *Schistosoma mansoni*: the activity and development of the schistosomulum during migration from the skin to the hepatic portal system. 1978. 57-73.

WOLOWCZUK, I. et al. Infection of Mice Lacking Interleukin-7 (IL-7) Reveals an Unexpected Role for IL-7 in the Development of the Parasite *Schistosoma mansoni*. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 8, p. 4183-4190, 1999. ISSN 0019-9567 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC96723/> >.

WU, Y. et al. Methylation of Septin9 mediated by DNMT3a enhances hepatic stellate cells activation and liver fibrogenesis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 315, p. 35-49, 2017/01/15/ 2017. ISSN 0041-008X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X16303738> >.

WYCE, A. et al. H2B Ubiquitylation Acts as a Barrier to Ctk1 Nucleosomal Recruitment Prior to Removal by Ubp8 within a SAGA-Related Complex. **Molecular Cell**, v. 27, n. 2, p. 275-288, 2007. ISSN 1097-2765. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S109727650700367X> >.

XIA, L. et al. Daily Variation in Global and Local DNA Methylation in Mouse Livers. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. e0118101, 2015. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118101> >.

XIONG, L. et al. Aberrant enhancer hypomethylation contributes to hepatic carcinogenesis through global transcriptional reprogramming. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 335-335, 2019. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30659195>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6338783/> >.

XU, H. et al. Serum Exosomal Long Noncoding RNAs "ENSG00000258332.1" and "LINC00635" for the Diagnosis and Prognosis of Hepatocellular Carcinoma. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 27, n. 6, p. 710-716, 2018. Disponível em: < <http://cebp.aacrjournals.org/content/cebp/27/6/710.full.pdf> >.

XU, H. et al. MicroRNA-122 supports robust innate immunity in hepatocytes by targeting the RTKs/STAT3 signaling pathway. **eLife**, v. 8, p. e41159, 2019/02/08 2019. ISSN 2050-084X. Disponível em: < <https://doi.org/10.7554/eLife.41159> >.

YANG, J. et al. Epstein-Barr virus-induced gene 3 negatively regulates IL-17, IL-22 and RORgamma t. **European journal of immunology**, v. 38, n. 5, p. 1204-1214, 2008. ISSN 0014-2980 1521-4141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18412165>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2989250/> >.

YARANI, R. et al. The emerging role of lncRNAs in inflammatory bowel disease. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 50, n. 12, p. 161, 2018/12/06 2018. ISSN 2092-6413. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0188-9> >.

YU, A. et al. Microarray analysis of long non-coding RNA expression profiles in monocytic myeloid-derived suppressor cells in *Echinococcus granulosus*-infected mice. **Parasites & vectors**, v. 11, n. 1, p. 327-327, 2018. ISSN 1756-3305. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29848344>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5977751/> >.

YU, F. et al. HOTAIR Epigenetically Modulates PTEN Expression via MicroRNA-29b: A Novel Mechanism in Regulation of Liver Fibrosis. **Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 25, n. 1, p. 205-217, 2017. ISSN 1525-0024 1525-0016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28129115>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5363197/> >.

ZHANG, H. et al. Ubiquitin-specific Protease 15 Negatively Regulates Virus-induced Type I Interferon Signaling via Catalytically-dependent and -independent Mechanisms. **Scientific**

reports, v. 5, p. 11220-11220, 2015. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26061460>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4650652/> >.

ZHANG, J. et al. Interleukin-35 in immune-related diseases: protection or destruction. **Immunology**, v. 157, n. 1, p. 13-20, 2019. ISSN 1365-2567 0019-2805. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30681737>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6459776/> >.

ZHANG, M. et al. Proteomic Analysis of Tegument-Exposed Proteins of Female and Male *Schistosoma japonicum* Worms. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 11, p. 5260-5270, 2013/11/01 2013. ISSN 1535-3893. Disponível em: < <https://doi.org/10.1021/pr400476a> >.

ZHANG, Z. et al. USP49 deubiquitinates histone H2B and regulates cotranscriptional pre-mRNA splicing. **Genes & Development**, v. 27, n. 14, p. 1581-1595, 2013. ISSN 0890-9369 1549-5477. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3731547/> >.

ZHU, L. et al. MicroRNAs Are Involved in the Regulation of Ovary Development in the Pathogenic Blood Fluke *Schistosoma japonicum*. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 2, p. e1005423, 2016. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005423> >.

10 Anexos

Tabela 5: Coeficiente da matriz de correlação de Spearman $p < 0,05$ – WTC

Coeficiente	<i>TET1</i>	<i>TET2</i>	<i>TET3</i>	<i>DNMT1</i>	<i>DNMT 3A</i>	<i>DNMT 3B</i>	5mC	miR 31-3p	miR 31-5p	miR 122-3p	miR 122-5p
<i>TET1</i>		-0,056	0,2238	0,1169	0,3566	-0,4799	0,35	0,03	-0,06	-0,14	-0,29
<i>TET2</i>	-0,056		0,6014	0,3041	0,4895	0,3608	0,06	0,63	0,56	0,67	-0,31
<i>TET3</i>	0,2238	0,6014		-0,2261	0,8181	0,0736	0,25	0,38	0,12	0,36	-0,18
<i>DNMT1</i>	0,117	0,3041	-0,2261		-0,1949	0,1875	-0,43	0,4	0,36	0,36	-0,19
<i>DNMT 3A</i>	0,3566	0,4895	0,8181	-0,1949		-0,021	0,34	0,41	-0,07	0,38	-0,19
<i>DNMT 3B</i>	-0,4799	0,3608	0,0736	0,1875	-0,021		-0,54	0,07	-0,06	0,11	-0,24
5mC	0,3497	0,0559	0,2518	-0,4289	0,3427	-0,5429		-0,15	0,24	0,03	-0,09
miR31-3p	0,028	0,6294	0,3776	0,3977	0,4056	0,07005	-0,15		0,49	0,74	-0,09
miR31-5p	-0,056	0,5594	0,1189	0,3587	-0,0699	-0,063	0,23	0,5		0,52	-0,47
miR 122-3p	-0,1399	0,6783	0,3636	0,3587	0,3776	0,1086	0,03	0,74	0,52		-0,28
miR 122-5p	-0,2872	-0,3082	-0,1751	-0,1875	-0,1891	-0,2368	-0,09	-0,09	-0,47	-0,28	

Tabela 6: p- valor da matriz de correlação de Spearman $p < 0,05$ – WTC

p- valor	<i>TET1</i>	<i>TET2</i>	<i>TET3</i>	<i>DNMT1</i>	<i>DNMT 3A</i>	<i>DNMT 3B</i>	5mC	miR 31-3p	miR 31-5p	miR 122-3p	miR 122-5p
<i>TET1</i>		0,8692	0,4851	0,7206	0,25596	0,1132	0,27	0,94	0,87	0,67	0,36
<i>TET2</i>	0,8692		0,0428	0,3365	0,1098	0,2479	0,87	0,03	0,06	0,02	0,32
<i>TET3</i>	0,4851	0,0428		0,2864	0,00186	0,8214	0,43	0,23	0,72	0,25	0,58
<i>DNMT1</i>	0,7206	0,3365	0,2864		0,3365	0,5582	0,08	0,2	0,25	0,25	0,34
<i>DNMT 3A</i>	0,256	0,1098	0,0019	0,3365		0,9432	0,28	0,19	0,83	0,23	0,55
<i>DNMT 3B</i>	0,1132	0,2479	0,8214	0,5582	0,9432		0,07	0,83	0,84	0,74	0,45
5mC	0,2662	0,8692	0,4203	0,0757	0,2762	0,06911		0,65	0,46	0,92	0,77
miR31-3p	0,9388	0,0323	0,2276	0,2016	0,1928	0,8294	0,65		0,1	0,008	0,76
miR31-5p	0,8692	0,0629	0,716	0,2531	0,8346	0,8387	0,46	0,1		0,089	0,13
miR 122-3p	0,6673	0,0185	0,2464	0,2531	0,2276	0,7366	0,92	0,008	0,09		0,37
miR 122-5p	0,3568	0,3218	0,5764	0,337	0,5462	0,4464	0,77	0,76	0,13	0,37	

Tabela 7: Coeficiente da matriz de correlação de Spearman $p < 0,05$ – WTI

Coeficiente	TET 1	TET 2	TET 3	DNMT 1	DNMT 3A	DNMT 3B	volume	Ovos fígado	Ovos intestino	número	5mC	Ovos fezes	miR 31-3p	miR 31-5p	miR 122-3p	miR 122-5p
TET1		-0,36	0,358	-0,343	0,067	0,0545	-0,273	-0,345	-0,2	0,1824	0,35	-0,15	-0,1	0,36	-0,1	0,2
TET2	-0,36		0,152	0,5883	-0,321	0,1879	0,0667	-0,151	-0,00606	-0,31	0,13	0,45	-0,0	0,04	0,03	-0,2
TET3	0,358	0,152		0,472	0,297	0,503	0,0909	-0,393	-0,1273	-0,2553	0,21	0,274	0,07	0,6	0,18	-0,3
DNMT1	-0,34	0,588	0,472		0,1616	0,2909	0,4331	0,252	0,4332	-0,0648	-0,0	0,785	-0,1	-0,1	-0,4	-0,0
DNMT 3A	0,067	-0,32	0,297	0,1616		-0,0181	-0,0667	-0,054	0,00606	0,2371	-0,61	0,012	-0,2	0,2	-0,02	-0,05
DNMT 3B	0,055	0,188	0,503	0,2909	-0,018		0,1030	-0,491	-0,4061	-0,3404	-0,15	-0,16	-0,5	-0,04	-0,18	-0,73
volume	0,103	0,273	-0,58	-0,148	-0,527	-0,551		0,261	0,2606	0,0669	0,39	0,188	0,12	-0,2	-0,3	0,56
Ovos fígado	-0,35	-0,15	-0,393	0,2521	-0,055	-0,491	0,2848		0,8303	0,4316	-0,01	0,359	0,03	-0,51	-0,32	0,64
Ovos intestino	-0,2	-0,01	-0,127	0,4332	0,0061	-0,4061	0,6727	0,830		0,2796	-0,05	0,474	0,29	-0,27	-0,32	0,79
número	0,182	-0,31	-0,26	-0,065	0,2371	-0,3404	-0,1033	0,432	0,2796		-0,18	0,277	-0,4	-0,50	-0,48	0,31
5mC	0,345	0,127	0,212	-0,006	-0,612	-0,151	-0,2	-0,006	-0,05454	-0,1763		0,334	0,27	0,21	0,07	0,15
Ovos fezes	-0,15	0,449	0,274	0,7847	0,0122	-0,158	0,2918	0,359	0,4742	0,2774	0,33		0,09	-0,21	-0,4	0,23
miR31-3p	-0,14	-0,01	0,067	-0,084	-0,176	-0,4788	0,4424	0,03	0,2969	-0,3526	0,27	0,091		0,51	0,55	0,42
miR31-5p	0,357	0,042	0,6	-0,136	0,2	-0,0424	-0,1636	-0,515	-0,2727	-0,5046	0,21	-0,21	0,51		0,77	0,01
miR 122-3p	-0,12	0,03	0,176	-0,356	-0,0181	-0,1757	-0,2485	-0,321	-0,3212	-0,4802	0,07	-0,43	0,55	0,77		-0,1
miR 122-5p	0,202	-0,18	-0,257	-0,039	-0,049	-0,734	0,3181	0,642	0,7951	0,3129	0,15	0,227	0,42	0,01	-0,1	

Tabela 8: p- valor da matriz de correlação de Spearman $p < 0,05$ – WTI

p-valor	TET 1	TET 2	TET 3	DNMT 1	DNMT 3A	DNMT 3B	volume	Ovos fígado	Ovos intestino	número	5mC	Ovos fezes	miR 31-3p	miR 31-5p	miR 122-3p	miR 122-5p
TET1		0,312	0,313	0,246	0,8651	0,8916	0,4483	0,33	0,5837	0,6128	0,33	0,66	0,71	0,31	0,76	0,57
TET2	0,313		0,682	0,0802	0,3679	0,6073	0,8651	0,682	1	0,3707	0,73	0,19	1	0,92	0,95	0,6
TET3	0,313	0,682		0,1716	0,4069	0,144	0,8113	0,263	0,733	0,4616	0,56	0,44	0,87	0,07	0,63	0,45
DNMT1	0,246	0,08	0,172		0,6604	0,4144	0,2147	0,483	0,2147	0,7063	0,86	0,01	0,69	0,58	0,23	0,72
DNMT 3A	0,865	0,368	0,407	0,6603		0,9729	0,8651	0,892	1	0,506	0,07	0,98	0,63	0,58	0,97	0,87
DNMT 3B	0,892	0,607	0,144	0,4144	0,9729		0,785	0,155	0,2475	0,3236	0,68	0,65	0,17	0,92	0,63	0,02
volume	0,785	0,448	0,089	0,5546	0,1231	0,1049		0,469	0,4697	0,8568	0,26	0,6	0,76	0,51	0,47	0,1
Ovos fígado	0,33	0,682	0,263	0,4827	0,8916	0,1548	0,4271		0,005	0,2125	1	0,31	0,95	0,13	0,37	0,05
Ovos intestino	0,584	1	0,733	0,2147	1	0,2475	0,0389	0,005		0,4309	0,89	0,17	0,41	0,45	0,37	0,01
número	0,613	0,371	0,462	0,7063	0,506	0,3236	0,765	0,213	0,4309		0,61	0,43	0,31	0,14	0,16	0,37
5mC	0,33	0,733	0,56	0,8555	0,0667	0,6821	0,5837	1	0,8916	0,6128		0,34	0,45	0,56	0,87	0,69
Ovos fezes	0,663	0,194	0,441	0,0114	0,9804	0,6491	0,4112	0,307	0,1686	0,4309	0,34		0,8	0,55	0,2	0,52
miR31-3p	0,707	1	0,865	0,6875	0,6321	0,1663	0,2044	0,946	0,4069	0,306	0,45	0,8		0,13	0,1	0,23
miR31-5p	0,313	0,918	0,073	0,5805	0,5837	0,9184	0,6567	0,133	0,4483	0,1351	0,56	0,55	0,13		0,01	0,98
miR 122-3p	0,759	0,946	0,632	0,2305	0,9729	0,6321	0,4918	0,368	0,3679	0,1567	0,87	0,199	0,10	0,01		0,75
miR 122-5p	0,573	0,598	0,449	0,7163	0,8703	0,0167	0,3679	0,05	0,008	0,3729	0,69	0,52	0,23	0,98	0,75	

Tabela 9: Coeficiente da matriz de correlação de Spearman $p < 0,05$ – $Ebi3^{-/-}C$

Coeficiente	<i>TET1</i>	<i>TET2</i>	<i>TET3</i>	<i>DNMT1</i>	<i>DNMT 3A</i>	<i>DNMT 3B</i>	5mC	miR 31-3p	miR 31-5p	miR 122-3p	miR 122-5p
<i>TET1</i>		-0,1	-0,1	-0,2052	-0,3	0	-0,1	0,1	0,5	-0,3	-0,1
<i>TET2</i>	-0,1		1	0,66689	0,9	0,9	0,7	-0,7	0,7	0,6	-0,5
<i>TET3</i>	-0,1	1		0,66689	0,9	0,9	0,7	-0,7	0,7	0,6	-0,5
<i>DNMT1</i>	-0,2052	0,6689	0,66689		0,66689	0,30779	0,98	-0,15	0,67	0,97	0,15
<i>DNMT 3A</i>	-0,3	0,9	0,9	0,66689		0,7	0,6	-0,4	0,6	0,7	-0,6
<i>DNMT 3B</i>	0	0,9	0,9	0,30779	0,7		0,4	-0,9	0,5	0,2	-0,6
5mC	-0,1	0,7	0,7	0,97468	0,6	0,4		-0,3	0,7	0,9	0,2
miR31-3p	0,1	-0,7	-0,7	-0,1539	-0,4	-0,9	-0,3		-0,2	0	0,3
miR31-5p	0,5	0,7	0,7	0,66689	0,6	0,5	0,7	-0,2		0,6	-0,3
miR 122-3p	-0,3	0,6	0,6	0,97468	0,7	0,2	0,9	0	0,6		0,1
miR 122-5p	-0,1	-0,5	-0,5	0,1539	-0,6	-0,6	0,2	0,3	-0,3	0,1	

Tabela 10: p- valor da matriz de correlação de Spearman $p < 0,05$ – $EBi3^{-/-}C$

Coefficiente	<i>TET1</i>	<i>TET2</i>	<i>TET3</i>	<i>DNMT1</i>	<i>DNMT 3A</i>	<i>DNMT 3B</i>	5mC	miR 31-3p	miR 31-5p	miR 122-3p	miR 122-5p
<i>TET1</i>		0,95	0,95	0,6	0,68333	1,05	0,95	0,95	0,45	0,68	0,95
<i>TET2</i>	0,95		0,01667	0,26667	0,08333	0,08333	0,23	0,23	0,23	0,35	0,45
<i>TET3</i>	0,95	0,01667		0,26667	0,08333	0,08333	0,23	0,23	0,23	0,35	0,45
<i>DNMT1</i>	0,6	0,26667	0,26667		0,26667	0,6	0,03	0,73	0,27	0,03	0,83
<i>DNMT 3A</i>	0,683	0,08333	0,08333	0,26667		0,23333	0,35	0,52	0,35	0,23	0,35
<i>DNMT 3B</i>	1,05	0,08333	0,08333	0,6	0,23333		0,52	0,08	0,45	0,78	0,35
5mC	0,95	0,23333	0,23333	0,03333	0,35	0,51667		0,68	0,23	0,08	0,78
miR31-3p	0,95	0,23333	0,23333	0,73333	0,51667	0,08333	0,68		0,78	1,05	0,68
miR31-5p	0,45	0,23333	0,23333	0,26667	0,35	0,45	0,23	0,78		0,35	0,68
miR 122-3p	0,683	0,35	0,35	0,03333	0,23333	0,78333	0,08	0,35	0,35		0,95
miR 122-5p	0,95	0,45	0,45	0,83333	0,35	0,35	0,78	0,68	0,68	0,95	

Tabela 11: Coeficiente da matriz de correlação de Spearman $p < 0,05 - EBi3^{-1}$

Coeficiente	TET 1	TET 2	TET 3	DNMT 1	DNMT 3A	DNMT 3B	volume	Ovos-fígado	Ovos-intestino	número	5mC	Ovos-fezes	miR 31-3p	miR 31-5p	miR 122-3p	miR 122-5p
TET1		-0,043	-0,37	-0,18	0,379	-0,113	-0,475	0,209	-0,0018	0,174	0,15	-0,41	0,24	0,25	0,06	0,45
TET2	-0,043		0,529	0,22	0,382	0,091	0,1036	-0,179	-0,172	-0,178	0,1	0,045	-0,13	0,03	-0,3	-0,12
TET3	-0,37	0,529		0,7	0,393	0,233	0,3393	-0,166	-0,195	-0,522	-0,2	-0,02	-0,6	-0,4	-0,6	-0,3
DNMT1	-0,18	0,217	0,7		0,181	0,439	0,3089	-0,37	-0,063	-0,33	0,27	0	-0,5	-0,2	-0,2	0,01
DNMT 3A	0,38	0,382	0,39	0,181		-0,36	0,2214	0,091	-0,177	-0,042	-0,4	0,091	-0,34	-0,01	-0,35	-0,03
DNMT 3B	-0,113	0,091	0,23	0,439	-0,36		-0,051	-0,451	-0,095	-0,336	0,31	0,109	0,21	-0,03	-0,01	-0,09
volume	-0,62	0,254	0,43	0,35	0,068	0,102		-0,229	0,025	-0,205	0,07	0,633	-0,1	0,03	0,08	-0,2
Ovos fígado	0,21	-0,18	-0,17	-0,367	0,091	-0,451	-0,0947		0,163	0,331	-0,2	-0,29	0,03	0,18	-0,01	0,39
Ovos intestino	-0,002	-0,17	-0,19	-0,063	-0,177	-0,095	0,0053	0,163		0,614	0,25	0,063	0,14	-0,06	0,2	0,32
número	0,174	-0,18	-0,52	-0,33	-0,042	-0,336	-0,146	0,331	0,614		0,23	0,008	0,12	0,31	0,52	0,31
5mC	0,146	0,096	-0,25	0,271	-0,396	0,306	-0,096	-0,202	0,248	0,23		0,001	0,39	0,15	0,39	0,25
Ovos fezes	-0,41	0,045	-0,02	0	0,091	0,109	0,6133	-0,29	0,063	0,0079	0,01		0,29	-0,03	0,03	-0,38
miR31-3p	0,241	-0,14	-0,55	-0,47	-0,338	0,215	-0,2788	0,03	0,142	0,1152	0,38	0,286		0,07	0,1	0,1
miR31-5p	0,25	0,032	-0,4	-0,171	-0,011	-0,033	0,0964	0,184	-0,063	0,306	0,15	-0,035	0,07		0,79	0,71
miR 122-3p	0,064	-0,3	-0,6	-0,184	-0,346	-0,015	0,125	-0,013	0,198	0,516	0,39	0,025	0,1	0,79		0,53
miR 122-5p	0,445	-0,12	-0,29	0,012	-0,032	-0,087	-0,1448	0,394	0,319	0,306	0,25	-0,382	0,1	0,71	0,53	

Tabela 12: p- valor da matriz de correlação de Spearman $p < 0,05 - EBi3^{-/I}$

p-valor	<i>TET 1</i>	<i>TET 2</i>	<i>TET 3</i>	<i>DNMT 1</i>	<i>DNMT 3A</i>	<i>DNMT 3B</i>	volume	Ovos fígado	Ovos intestino	número	5mC	Ovos fezes	miR 31-3p	miR 31-5p	miR 122-3p	miR 122-5p
<i>TET1</i>		0,883	0,174	0,0374	0,1649	0,641	0,0759	0,451	0,992	0,533	0,6	0,065	0,38	0,37	0,82	0,09
<i>TET2</i>	0,883		0,045	0,442	0,1607	0,748	0,7144	0,517	0,534	0,49	0,73	0,875	0,61	0,91	0,27	0,66
<i>TET3</i>	0,175	0,045		0,0007	0,1485	0,402	0,2161	0,546	0,479	0,041	0,37	0,708	0,04	0,14	0,02	0,28
<i>DNMT1</i>	0,037	0,442	0,001		0,5143	0,113	0,2681	0,001	0,116	0,001	0,33	0,031	0	0,04	0,04	0,2
<i>DNMT 3A</i>	0,165	0,161	0,149	0,514		0,165	0,4266	0,746	0,521	0,843	0,14	0,745	0,21	0,97	0,21	0,91
<i>DNMT 3B</i>	0,641	0,748	0,402	0,113	0,165		0,8087	0,078	0,681	0,164	0,27	0,695	0,44	0,86	0,91	0,76
volume	0,016	0,361	0,116	0,202	0,812	0,719		0,412	0,929	0,464	0,81	0,011	0,68	0,92	0,77	0,48
Ovos fígado	0,451	0,517	0,546	0	0,746	0,078	0,7309		0,562	0,228	0,47	0,294	0,92	0,51	0,96	0,15
Ovos intestino	0,992	0,534	0,479	0,116	0,521	0,681	0,9873	0,562		0,015	0,37	0,823	0,61	0,82	0,48	0,25
número	0,533	0,49	0,041	0	0,843	0,164	0,5635	0,228	0,015		0,41	0,978	0,68	0,27	0,04	0,27
5mC	0,602	0,734	0,375	0,335	0,145	0,267	0,7337	0,47	0,372	0,409		0,973	0,15	0,58	0,16	0,36
Ovos fezes	0,065	0,875	0,708	0,031	0,745	0,695	0,0175	0,294	0,823	0,978	0,97		0,3	0,9	0,93	0,16
miR31-3p	0,384	0,614	0,035	0	0,214	0,438	0,3087	0,917	0,613	0,683	0,15	0,302		0,81	0,72	0,73
miR31-5p	0,368	0,913	0,145	0,0396	0,974	0,8597	0,7337	0,511	0,825	0,267	0,58	0,902	0,81		0,00	0,00
miR 122-3p	0,822	0,271	0,02	0,0359	0,206	0,911	0,6575	0,965	0,478	0,049	0,16	0,929	0,72	0,00		0,04
miR 122-5p	0,098	0,664	0,284	0,2015	0,906	0,757	0,5997	0,146	0,246	0,268	0,36	0,16	0,73	0,00	0,04	