

**INSTITUTO CARLOS CHAGAS**  
**MESTRADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA**

**CARACTERIZAÇÃO COMPARATIVA DE MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS  
DE HISTONAS DOS TRITRYP**

**MATHEUS FERNANDES**

**CURITIBA**

**2019**

**INSTITUTO CARLOS CHAGAS**  
**Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia**

MATHEUS FERNANDES

**CARACTERIZAÇÃO COMPARATIVA DE MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS DE  
HISTONAS DOS TRITRYP**

Dissertação que será apresentada ao Instituto Carlos Chagas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

**Orientadora:** Prof. Dra. Lyris Martins Franco de Godoy

**CURITIBA/PR**

**2019**

Fernandes, Matheus.

CARACTERIZAÇÃO COMPARATIVA DE MODIFICAÇÕES PÓS-  
TRADUCIONAIS DE HISTONAS DOS TRITRYP / Matheus Fernandes. -  
Curitiba, 2019.

VII, 66 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Carlos Chagas, Pós-Graduação em  
Biociências e Biotecnologia, 2019.

Orientadora: Lyris Martins Franco de Godoy.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Modificações pós-Traducionais. 2. Histonas. 3. TriTryp. 4. Epigenética.  
I. Título.

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus por minha vida e oportunidade de seguir com meus objetivos, sempre dando força e tranquilidade quando era necessário.

Agradeço a Lyris, que conseguiu com êxito orientar e ensinar um aluno que não tinha o conhecimento da área com toda sua paciência e competência. Sei que não foi fácil, mas quero deixar claro que você me ajudou e me ajuda a seguir esse caminho.

Agradeço também aos irmãos que fiz no instituto, Rafão e Junior. Sempre me auxiliando desde a hospedagem para a prova de mestrado, sei que posso contar com vocês sempre, não somente para assuntos acadêmicos, mas para vida.

Agradeço meus colegas de laboratório que sempre estão ali alegrando o seu dia, por mais que aquele experimento não tenha dado certo.

Agradeço ao Instituto Carlos Chagas, a Fiocruz e o programa de pós-graduação, por toda infraestrutura e apoio financeiro que nos possibilitou a realizar essa pesquisa.

Agradeço a Mary, minha esposa, com quem eu sei que passarei por muitos momentos felizes como este, e que sempre está comigo nos dias bons e também nos meus dias maus, me dando todo o suporte que preciso para seguir em frente.

E por último agradeço as pessoas que me fizeram eu chegar aqui hoje, meus heróis que sem ter muita condição conseguiram, com muito mérito, fazer eu alcançar minhas metas. Pai e mãe a pessoa que eu sou hoje é graças a criação, a educação e o amor que vocês me deram, muito obrigado.

“There are far, far better things ahead than any we leave behind.”

**C.S. Lewis**

## Resumo

O sequenciamento de genomas abriu portas para o estudo de mecanismos e patologias de origem genética. Apesar da grande importância desses estudos, está claro que a complexidade do metabolismo celular não estaria estocada somente nas bases do DNA, uma vez que a expressão gênica é um processo complexo que depende de diversos fatores, incluindo mecanismos epigenéticos. Em eucariotos, o controle epigenético da expressão gênica ocorre essencialmente com base em alterações dinâmicas da estrutura e organização da cromatina, dentre as quais destaca-se o chamado “código de histonas”, que inclui histonas variantes e modificações pós-traducionais (PTMs) de histonas. Esses mecanismos alteram a composição e conformação do nucleossomo e regulam vários aspectos do metabolismo do DNA, tais como replicação, reparo, transcrição e condensação da cromatina. Assim, drogas epigenéticas têm despertado interesse há décadas e já são utilizadas para o tratamento de várias doenças, tais como o câncer. Os protozoários parasitas da família Trypanosomatidae são causadores de diversas patologias humanas. Dentre eles, destacam-se o *Trypanosoma cruzi*, o *Trypanosoma brucei* e a *Leishmania braziliensis* (conhecidos como TriTryps), os quais são responsáveis pela doença de Chagas, doença do sono e leishmaniose, respectivamente. Apesar de possuírem controle da expressão gênica primariamente pós-transcricional, os TriTryps apresentam PTMs de histonas e outras modificações da cromatina. Essas modificações estão relacionadas à resposta dos parasitas ao estresse e a estímulos externos, mostrando-se de extrema importância na sua adaptabilidade ao ambiente, indicando que mecanismos epigenéticos também desempenham um papel importante na biologia desses organismos. O mapa global de PTMs de histonas de *T. cruzi* foi recentemente descrito pelo nosso grupo. No entanto, o número de sítios de PTMs de histonas conhecidos para os outros TriTryps ainda é muito pequeno e muito pouco se sabe sobre o papel funcional dessas modificações em tripanossomatídeos. Assim, no presente trabalho propomos realizar o mapeamento comparativo das PTMs de histonas dos TriTryps, utilizando abordagens proteômicas. Além de preencher a atual lacuna de informação e ampliar o entendimento acerca da regulação epigenética nesses organismos, os dados gerados poderão servir como base para futuras análises com ênfase em descobrir alvos para o desenvolvimento de drogas epigenéticas para tratamento dessas doenças. Neste trabalho, foram encontrados 12 tipos diferentes de PTMs de histonas, 162 sítios e 238 PTMs distribuídas entre os TriTryps. Dentro dessas, temos 54 PTMs novas descritas para *T. cruzi*, 72 PTMs novas descritas para *T. brucei* e este estudo é o primeiro a identificar PTMs para *L. braziliensis*, sendo 55 descritas até o momento. Foi encontrado também ocorrência de padrões distintos de PTMs em moléculas histonas, indicando que os TriTryps são capazes de regular modificações de histonas de forma combinatória para estabelecer estados da cromatina distintos, permitindo uma possível existência de um sofisticado código de histonas em tripanossomatídeos.

## Abstract

Sequencing of genomes has opened doors for the study of mechanisms and pathologies of genetic origin. Despite of the great importance of these studies, it is clear that the complexity of cellular metabolism would not be stored only at the bases of DNA, since gene expression is a complex process that depends on several factors, including epigenetic mechanisms. In eukaryotes, the epigenetic control of gene expression occurs essentially on the basis of dynamic changes in the structure and organization of chromatin, among which the so called "histone code", which includes variant histones and post-translational modifications (PTMs) of histones. These mechanisms alter the composition and conformation of the nucleosome and regulate various aspects of DNA metabolism, such as replication, repair, transcription, and chromatin condensation. Thus, epigenetic drugs have been of interest for decades and are already used for the treatment of various diseases, such as cancer. The parasitic protozoa of the Trypanosomatidae family are responsible for several human pathologies. Among them, we highlight *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* and a *Leishmania braziliensis* (known as TriTryps), which are responsible for Chagas disease, sleep disease and leishmaniasis, respectively. Although they have control of gene expression primarily post-transcriptional, TriTryps have histone PTMs and other chromatin modifications. These modifications are related to the response of parasites to stress and to external stimuli, proving extremely important in their adaptability to the environment, indicating that epigenetic mechanisms also play an important role in the biology of these organisms. The global histone PTM map of *T. cruzi* was recently described by our group. However, the number of known histone PTMs sites for the other TriTryps is still very small and very little is known about the functional role of these modifications in trypanosomatids. Thus, in the present work we propose to perform the comparative mapping of histone PTMs of TriTryps, using proteomic approaches. In addition to filling the current information gap and broadening the understanding of epigenetic regulation in these organisms, the data generated may serve as a basis for future analyzes with an emphasis on discovering targets for the development of epigenetic drugs for the treatment of these diseases. In this work, 12 different types of histone PTMs, 162 sites and 238 PTMs distributed among TriTryps were found. Within these, we have 54 new PTMs described for *T. cruzi*, 72 new PTMs described for *T. brucei* and this study is the first to identify PTMs for *L. braziliensis*, 55 of which are described so far. It has also been found that distinct patterns of PTMs exist in histone molecules, indicating that TriTryps are able to regulate histone modifications in a combinatorial way to establish distinct chromatin states, allowing a possible existence of a sophisticated histone code in trypanosomatids.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	4
<b>Figura 2.</b> Ciclo de vida do <i>Trypanosoma brucei</i> .....	7
<b>Figura 3.</b> Ciclo de vida da <i>Leishmania braziliensis</i> .....	9
<b>Figura 4.</b> Fluxo de trabalho utilizado para caracterização de PTMs de histonas dos TriTryps. ....	27
<b>Figura 5.</b> Perfil dos extratos enriquecidos em histonas para os TriTryps. ....	29
<b>Figura 6.</b> Bandas Excisadas para preparo das amostras das abordagens de GeLC-MS/MS.....	30
<b>Figura 7.</b> Imagem comparativa entre os cromatogramas das 3 réplicas de cada parasita provenientes da abordagem de GeLC-MS/MS com análise de bandas de histonas combinadas.....	31
<b>Figura 8.</b> Visão geral do número de PTMs encontradas nos TriTryps no presente trabalho. ....	33
<b>Figura 9.</b> PTMs identificadas neste trabalho para as histonas canônicas de <i>T. cruzi</i> .....	35
<b>Figura 10.</b> Mapa de Modificações pós-Traducionais das histonas canônicas de <i>T. cruzi</i> .....	36
<b>Figura 11.</b> PTMs identificadas neste trabalho para as histonas canônicas de <i>T. brucei</i> .....	38
<b>Figura 12.</b> Mapa de Modificações pós-Traducionais das histonas canônicas de <i>T. brucei</i> .....	39
<b>Figura 13.</b> PTMs identificadas neste trabalho para as histonas canônicas de <i>L. braziliensis</i> . ....	41
<b>Figura 14.</b> Mapa de Modificações pós-Traducionais das histonas canônicas de <i>L. braziliensis</i> .....	42
<b>Figura 15.</b> Mapa de Modificações pós-Traducionais de Histonas Variantes.....	43
<b>Figura 16.</b> PTMs identificadas neste trabalho para as histonas variantes. ....	44
<b>Figura 17.</b> Exemplos de padrões de regulação sítio específico em histonas dos TriTryps .....	45
<b>Figura 18.</b> Isoformas diferencialmente modificadas da histona H2B de <i>L. braziliensis</i> .....	46
<b>Figura 19.</b> Mapa comparativo da histona H2A de <i>T. cruzi</i> , <i>T. brucei</i> e <i>L. braziliensis</i> .....	48
<b>Figura 20.</b> Mapa comparativo da histona H2B de <i>T. cruzi</i> , <i>T. brucei</i> e <i>L. braziliensis</i> . ....	49
<b>Figura 21.</b> Mapa comparativo da histona H3 de <i>T. cruzi</i> , <i>T. brucei</i> e <i>L. braziliensis</i> . ....	50
<b>Figura 22.</b> Mapa comparativo da histona H4 de <i>T. cruzi</i> , <i>T. brucei</i> e <i>L. braziliensis</i> . ....	51

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Rendimento obtido nos extratos enriquecidos em histonas dos TriTryps.....	29
<b>Tabela 2.</b> Número de <i>missed cleavages</i> contidas nos peptídeos identificados para as histonas dos TriTryps provenientes da abordagem de GeLC-MS/MS com análise de bandas de histonas combinadas.	31
<b>Tabela 3.</b> Cobertura de sequências das histonas canônicas e variantes encontradas para os TriTryps. ....	32
<b>Tabela 4.</b> Conservações entre as PTMs de Humanos e TriTryps.....	52



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. Características Gerais dos TriTryps .....	1
1.2. <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	2
1.3. <i>Trypanosoma brucei</i> .....	5
1.4. <i>Leishmania</i> sp. ....	8
1.5. Epigenética.....	11
1.6. Epigenética dos TriTryps.....	15
1.7. Análise de PTMs através de Espectrometria de Massas .....	17
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
2.1. Objetivo Geral.....	19
2.2. Objetivos Específicos.....	19
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>20</b>
3.1. Cultura de células.....	20
3.2. Coleta dos Parasitas .....	20
3.3. Enriquecimento de proteínas histonas.....	20
3.4. Fracionamento das histonas .....	21
3.5. Preparo das histonas para digestão trípica em gel.....	21
3.6. Digestão trípica em gel e extração dos peptídeos .....	22
3.7. Preparo das histonas para digestão trípica em solução .....	23
3.8. Digestão trípica em solução .....	23
3.9. Purificação de Peptídeos por <i>StageTip</i> C18.....	23
3.10. Análise GelC-MS/MS .....	24
3.11. Análise de dados .....	25
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>27</b>
4.2. Caracterização de histonas e suas PTMs.....	30
4.4. Padrões combinatoriais de PTMs presentes nas histonas dos TriTryps.....	44
4.5. Expressão de isoformas diferencialmente modificadas das histonas dos TriTryps .....	46
4.6. Comparação do perfil de PTMs de histonas entre os TriTryps.....	47
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
5.1. Dados experimentais .....	53
5.3. Conservação dos sítios e abundancia de PTMs sugerem uma possível regulação epigenética .....	54

5.4. Padrões distintos de modificações, isoformas diferencialmente modificadas e histonas variantes com sítios de PTMs elevam a complexidade da cromatina .....	55
5.5. Existem Algumas Conservações com o Perfil de PTMs de Humanos.....	57
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>6. REFERENCIAS .....</b>	<b>59</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Características Gerais dos TriTryps

A família Trypanosomatidae compreende parasitas obrigatórios formados por uma única célula eucariota uniflagelar, pertencentes à classe Kinetoplastea que, em conjunto com os euglenídeos e os diplomonídeos, formam o filo Euglenozoa (Eukaryota: Excavata) (BREGLIA; SLAMOVITS; LEANDER, 2007). Os Kinetoplastida são seres eucariotos que possuem algumas estruturas convencionais, como, por exemplo, uma membrana que delimita o núcleo, os retículos endoplasmáticos liso e rugoso, o complexo de Golgi e uma mitocôndria grande única. Apresentam também um DNA mitocondrial raro, que se encontra condensado numa estrutura denominada de cinetoplasto, agrupado numa rede circular com duas formas. A primeira, os maxicírculos, codificam RNA ribossomal e de algumas proteínas da mitocôndria. Contudo, estes precisam ser traduzidos e editados para formarem RNA mensageiro (mRNA) funcional. Este processo de edição, exclusivo destes parasitas, é controlado pelo RNA guia, o qual é codificado nos minicírculos, a segunda forma de agrupamento do DNA no cinetoplasto (FAIRLAMB et al., 1978).

O gênero *Trypanosoma* apresenta espécies de ciclo biológico geralmente heteroxênico, que são transmitidos por insetos hematófagos e realizam parte de seu ciclo evolutivo em hospedeiros vertebrados, onde são encontrados na forma tripomastigota circulante e/ou amastigota. Os protozoários parasitas *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* e *Leishmania* sp. referidos como TriTryps, são os agentes causadores de condições infecciosas em mamíferos, incluindo humanos, conhecidas como doença de Chagas, doença do sono africana e leishmanioses cutânea e visceral, respectivamente, às quais afetam milhões de pessoas em países em desenvolvimento (América Central e do Sul, África subsaariana, Ásia e partes da Europa). Contudo, com a tendência das pessoas viajarem cada vez mais, seja a trabalho ou turismo, estas doenças, principalmente doença de Chagas, estão sendo encontradas em países desenvolvidos e até países que eram considerados como livres da doenças, como Japão e Austrália (PEREZ; LYMBERG; THOMPSON, 2015). Estes tripanossomatídeos são transmitidos por insetos vetores e apresentam uma variedade de formas morfológicas durante seus ciclos de vida (STEVENS, 2008), os quais envolvem a infecção de vertebrados e invertebrados e, apresentam a necessidade de adaptação fisiológica diante da mudança de ambiente, levando ao complexo processo de diferenciação celular. Essas diferenças morfológicas incluem o ponto de emergência do flagelo do corpo celular, a extensão da membrana

ondulante quando existente, a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e o formato geral da célula (SIQUEIRA, 2004).

Um fator importante na prevalência dessas doenças é a falta de recursos médicos em áreas já atingidas por fraco apoio social e economias ameaçadas. Atualmente, não existem vacinas para prevenir a propagação dessas doenças e muitos dos medicamentos disponíveis para tratamento são altamente tóxicos e requerem internação hospitalar. Nos últimos anos, novos esforços polarizaram a atenção de laboratórios em todo o mundo para combater o controle dessas doenças negligenciadas. As sequências do genoma para estes cinetoplastídeos patogênicos e, recentemente, para mais duas espécies de *Leishmania*, já foram relatadas, representando um grande passo em frente para expandir nossa compreensão de sua biologia (BERRIMAN et al., 2005; EL-SAYED et al., 2005; IVENS et al., 2006; PEACOCK et al., 2007).

### **1.2. *Trypanosoma cruzi***

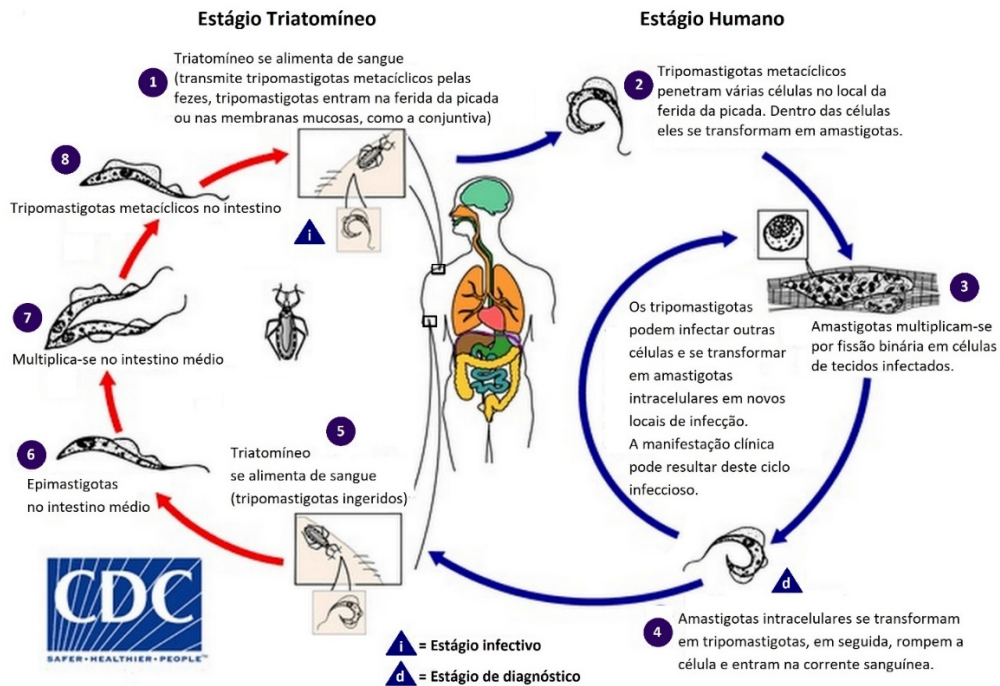
A doença de Chagas é uma infecção causada pelo parasita protozoário *Trypanosoma cruzi*. Endêmica em grandes partes da América Latina, com exceção do Caribe, essa doença nas últimas décadas tem sido cada vez mais diagnosticada em várias partes do mundo por conta de viagens e emigração em larga escala da América Latina para a América do Norte, Europa e Austrália (SCHMUNIS; YADON, 2010). Além disso, a doença de Chagas é hoje considerada uma infecção oportunista em indivíduos imunocomprometidos, incluindo aqueles com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Tanto a infecção natural aguda quanto a recrudescência da infecção, observadas em indivíduos imunocomprometidos, podem apresentar lesões cutâneas (SARTORI; SOTTO, 1999).

Entre os tripanossomatídeos, o *T. cruzi* apresenta um dos ciclos de vida mais complexos, envolvendo vários estágios de desenvolvimento encontrados nos hospedeiros vertebrados e invertebrados, bem como na corrente sanguínea e nas células hospedeiras dos vertebrados. A Figura 1 mostra uma visão geral do ciclo de vida desse protozoário. A principal forma de transmissão da Doença de Chagas na América Latina continua sendo pela forma vetorial. Os principais vetores são os insetos pertencentes à ordem Hemiptera da família Reduviidae e subfamília Triatominae, sendo as principais espécies *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus*. Esses vetores são encontrados em toda a América Latina e até mesmo no sul dos Estados Unidos, principalmente em áreas rurais (DIAZ, 2008).

Durante a alimentação por sangue de um hospedeiro mamífero infectado, o inseto vetor ingere formas tripomastigotas sanguíneas, que sofrem transformação para epimastigotas. Em 3 a 4 semanas, as formas tripomastigotas metacíclicos infectivas não-replicativas, atingem a parte final do intestino posterior do inseto e são liberados pela ampola retal nas fezes do triatomíneo durante o repasto sanguíneo (TYLER; ENGMAN, 2001). A transmissão para o novo hospedeiro ocorre quando instintivamente, ao friccionar o local da picada, permite que as fezes do barbeiro infectado entrem em contato com a corrente sanguínea, seja através das vias orais ou nasais. mucosas, conjuntiva, ou pela ferida causada na superfície da picada. Na corrente sanguínea de um mamífero, os tripomastigotas entram em uma célula hospedeira e se diferenciam em amastigotas intracelulares, que então se multiplicam por fissão binária e, finalmente, se transformam em tripomastigotas de forma sanguínea, que são liberadas quando a célula hospedeira se rompe. Esses tripomastigotas infectam células adjacentes ou disseminam-se pelos vasos linfáticos e pela corrente sanguínea e infectam novas células. Embora qualquer célula nucleada de mamífero possa ser parasitada, há uma preferência pelos parasitas por células dos sistemas cardiovascular, do retículo-endotelial, do sistema nervoso e muscular, bem como o tecido adiposo (HEMMIGE; TANOWITZ; SETHI, 2012).

Outro modo importante de transmissão é via transfusão sanguínea. Embora sendo menos comum, a doença de Chagas associada à transfusão contém uma natureza mais grave da doença, assim exigiu-se uma implementação de programas de triagem de doadores de sangue. O parasita é transmitido também, congenitamente em 1 a 10% das gestações em mulheres portadoras da doença, representando um risco inevitável de transmissão em regiões endêmicas e não-endêmicas. A gravidade da doença em neonatos com doença de Chagas congênita pode variar de aquisição assintomática a doença fulminante culminando em morte (FLORES-CHÁVEZ et al., 2008). A ingestão de alimentos ou bebidas contaminadas com tripomastigotas foi também identificada como a causa de vários surtos de doença de Chagas em grande escala. Outros modos de transmissão incluem o transplante de órgãos e o acidente de laboratório (HEMMIGE; TANOWITZ; SETHI, 2012)

**Figura 1.** Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*



Fonte: Adaptado de CDC (2015)

O inseto vetor triatomíneo infectado alimenta-se do sangue e libera tripomastigotas em suas fezes, perto do local da ferida. Tripomastigotas entram no hospedeiro vertebrado através da ferida ou através das membranas mucosas (1). Dentro do hospedeiro, os tripomastigotas metacíclicos invadem as células próximas ao local da inoculação, onde se diferenciam em amastigotas intracelulares (2). As amastigotas se multiplicam por divisão binária nas células dos tecidos infectados (3) e se diferenciam em tripomastigotas, em seguida, são liberados na circulação como tripomastigotas na corrente sanguínea (4). Tripomastigotas sanguíneos infectam diferentes células e se transformam em formas amastigotas em novos locais de infecção. O inseto torna-se infectado ao se alimentar de sangue humano ou de outro animal que contenha parasitos circulantes (5). Os tripomastigotas ingeridos se transformam em epimastigotas no intestino médio do vetor (6). Os parasitos se multiplicam e se diferenciam no intestino (7) e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos infectantes no intestino grosso (8).

Quanto às implicações clínicas da doença de Chagas, há duas fases. A fase aguda, etapa inicial da doença, caracteriza-se por um conjunto de manifestações de intensidade variada. Em geral, devido aos sucessivos ciclos de invasão celular, multiplicação parasitária e liberação, há um grande número de parasitas presentes na corrente sanguínea. Um dos primeiros sinais clínicos agudos é o sinal de Romaña, ocorre quando a deposição de fezes contaminadas atinge o saco conjuntival, ou então o chagoma, no local em que ocorre a inoculação na pele, que são decorrentes do processo inflamatório inespecífico. Ainda ocorrem sintomas como febre, mal-estar, astenia, cefaleia, comprometimento cardíaco; como miocardite, pericardite, endocardite aguda ou

taquicardia, podendo ocorrer também lesões discretas no sistema digestório (NETO; AMATO; SABBAGA, 1997). Contudo, a maior parte das pessoas que foram infectadas, logo após a fase aguda, passam por uma redução nos sinais e sintomas de infecção, e os níveis de parasitemia caem assim como os anticorpos para os antígenos de *T. cruzi* (CHENG et al., 2007).

Dentro da fase crônica há duas formas de manifestação, a assintomática, ou indeterminada, onde o paciente chagásico pode viver décadas, levando uma vida normal. Todavia, esta forma pode evoluir para uma fase sintomática, na qual a parasitemia torna-se muito baixa, gerando mudanças associadas, principalmente, ao aparelho cardiocirculatório e digestivo. Os principais sintomas desta fase são referentes a doenças do músculo cardíaco, onde os batimentos cardíacos tornam-se arrítmicos, há perda da capacidade de bombeamento cardíaco e cardiomegalia. Demais sintomas característicos deste aspecto clínico podem ser manifestações no sistema digestivo, como o aumento do esôfago e do intestino grosso, que causam bloqueios de deglutição, engasgos e dor abdominal (NEVES et al., 2011).

### **1.3. *Trypanosoma brucei***

Os ramos que agrupam as espécies de *T. brucei* causam a tripanossomíase Africana humana (TAH) e animal (TAA), responsáveis por condições infecciosas que, em alguns casos, trazem danos agressivos a mamíferos, incluindo humanos e animais de interesse agropecuário. A principal característica dos tripanosomas africanos é a variação antigênica, que permite que os patógenos escapem das respostas imunes por troca contínua de proteínas de superfície (DEITSCH; LUKEHART; STRINGER, 2009).

Os tripanosomas africanos (*Trypanosoma* spp.) são protozoários transmitidos por vetores que realizam repasto sanguíneo, da família Glossinidae, que sobrevivem em seus hospedeiros pela substituição periódica de uma monocamada de glicoproteínas de superfície variantes (VSG) que protegem a superfície do parasita contra células efectoras de defesa do hospedeiro (PAYS, 2005). O *Trypanosoma brucei* é o agente causador da tripanossomíase Africana humana (ou “doença do sono”) e os mecanismos de expressão e substituição dinâmica de VSG nesta espécie são um sistema modelo de variação antigênica, bem como um exemplo clássico da evolução adaptativa na interface hospedeiro-patógeno (JAMONNEAU et al., 2012).

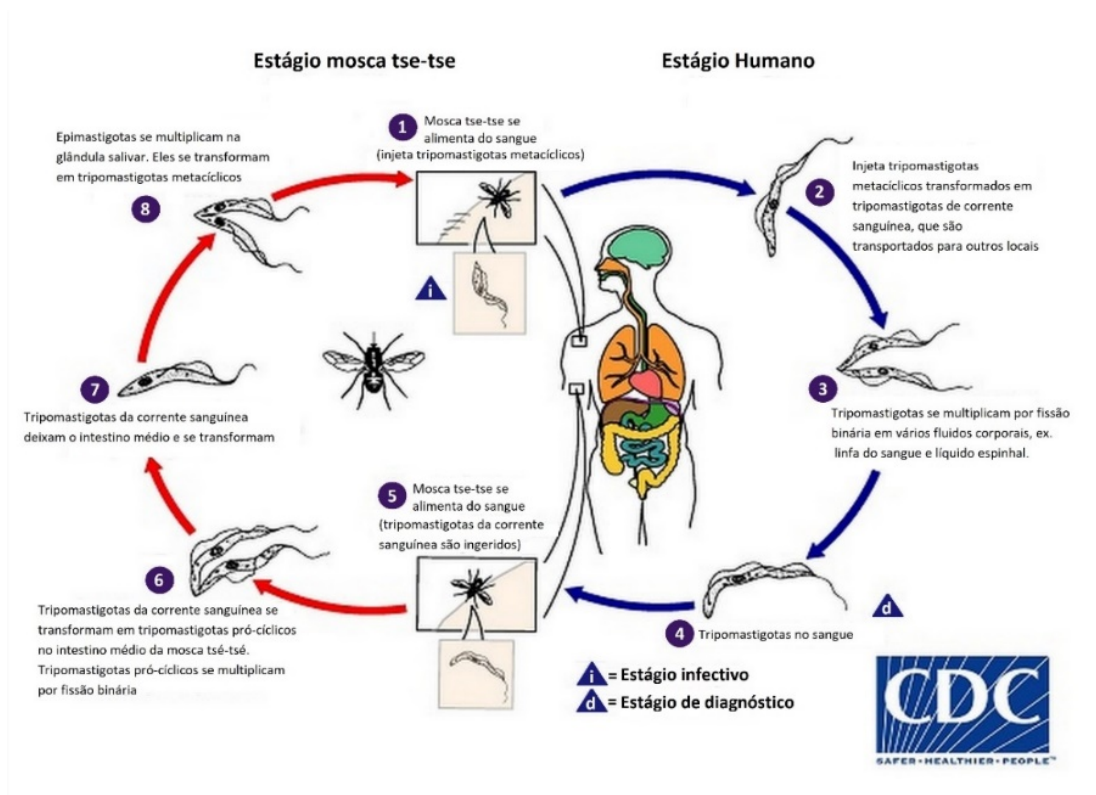
A Tripanossomíase Africana Humana é uma doença tropical negligenciada que ocorre na África Subsaariana, dentro dos limites distributivos de seu vetor, mosca tsé-tsé. Existem duas

formas da doença conhecidas. A forma lenta, causada pelo *Trypanosoma brucei gambiense*, é encontrada na África Ocidental e Central. A forma progressiva, mais rápida, causada por *T. b. rhodesiense*, é encontrada na África Oriental e Austral (BÜSCHER et al., 2017). As manifestações clínicas da Tripanossomíase Africana Humana dependem de fatores como: subespécie do parasita, resposta do hospedeiro e estágio da doença. Variações de virulência e patogenicidade foram atribuídas a diferentes cepas de parasitas. Ambas as formas da doença geralmente levam à morte se não forem tratadas, embora portadores saudáveis e auto cura já tenham sido descritos para a TAH *gambiense* (HORN; MCCULLOCH, 2010).

O parasita é transmitido entre hospedeiros mamíferos pela mosca tsé-tsé, *Glossina* sp. (Figura 1). Durante o período em que está na corrente sanguínea, a superfície extracelular do parasita é revestida por uma monocamada de glicoproteínas ancoradas ao GPI (glicosilfosfoglicano) denominada de VSG (do inglês, “*Variant Surface Glycoprotein*”). A constituição dessa cobertura proteica é de  $10^7$  cópias de uma única proteína VSG. Essas proteínas variantes possuem dois domínios, sendo um N-terminal, com forma de bastonete, que apresenta na superfície da célula as sequências variáveis que expõem ao hospedeiro os epítomos reconhecidos. A sequência terminal deste domínio é extremamente variável entre as diferentes VSG, motivo pelo qual representam o principal escape desse parasita das células de defesa. Por outro lado, o domínio C-terminal, que tem como função a ancoragem ao GPI, possui sua sequência de aminoácidos mais conservada (PAYS, 2006).



**Figura 2.** Ciclo de vida do *Trypanosoma brucei*



Fonte: CDC (2018)

Durante a alimentação pelo sangue do hospedeiro mamífero, uma mosca tsé-tsé infectada (gênero *Glossina*) injeta tripomastigotas metacíclicos no tecido da pele. Os parasitas entram no sistema linfático e passam para a corrente sanguínea (1). Dentro do hospedeiro, eles se transformam em tripomastigotas da corrente sanguínea (2), são transportados para outros locais do corpo, alcançam outros fluidos do sangue (por exemplo, linfa, líquido espinhal) e continuam a replicação por fissão binária (3). Todo o ciclo de vida dos tripanossomas africanos é representado pelos estágios extracelulares. A mosca tsé-tsé é infectada com tripomastigotas da corrente sanguínea quando se alimenta do sangue de um hospedeiro mamífero infectado (4, 5). No intestino médio da mosca, os parasitas se transformam em tripomastigotas pró-cíclicos, multiplicam-se por fissão binária (6), deixam o intestino médio e se transformam em epimastigotas (7). Os epimastigotas atingem as glândulas salivares da mosca e continuam a multiplicação por fissão binária (8).

Há um repertório de centenas de genes VSGs, com um único local de transcrição ativo, sempre no final de um cromossomo imediatamente adjacente ao telômero, que foram descritos no genoma do parasita (HORN; MCCULLOCH, 2010). A novaVSG que será expressa e irá tornar-se ativa deve ser copiada para o locus do transcrito único por processos de reparo do DNA. Além disso, um novo gene VSG pode ser ativado por um mecanismo de exclusão alélica. Este é um

processo coordenado de transcrição que não produz alterações detectáveis na sequência do DNA, e mantém a expressão singular. Com isso, permite uma comutação estocástica contínua de genes VSGs em altas taxas por geração de células, dependendo das condições de crescimento do parasita (HORN, 2014).

O papel do VSG como um “revestimento celular” protetor é ativado na glândula salivar da mosca tsé-tsé (antes de infectar o hospedeiro humano), funcionando durante o ciclo infeccioso dos mamíferos e sendo inativado quando retorna ao intestino médio do vetor. Os parasitas de corrente sanguínea expressam apenas uma camada de VSG por vez. Sob pressão para expressar um VSG diferente, um gradiente repressivo se estende da extremidade do cromossomo, desligando o local de expressão ativo da VSG. O silenciamento desse local de expressão faz com que os parasitas passem da forma proliferativa (estágio de corrente sanguínea) para a forma não-proliferativa, como uma pré-adaptação para a vida no inseto (HORN; MCCULLOCH, 2010).

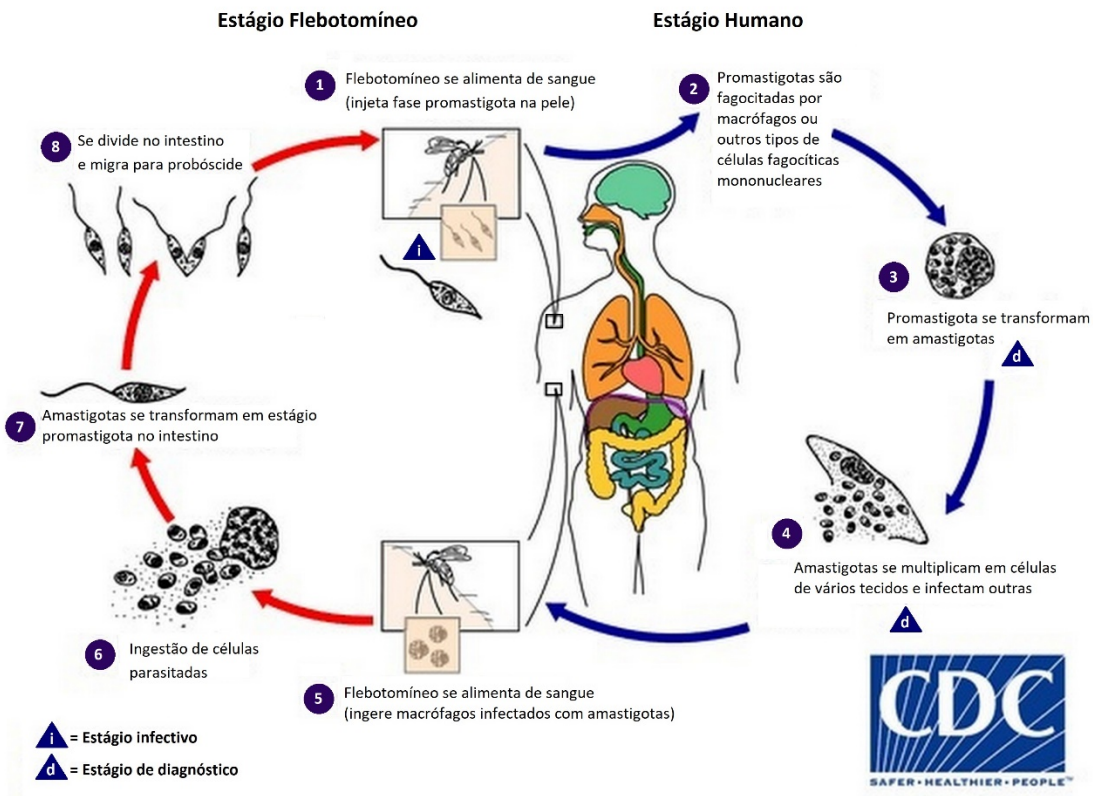
Não está completamente claro como ocorre o silenciamento. Entretanto, já é sabido que o remodelamento da cromatina desencadeia o silenciamento para iniciar a mudança do desempenho do parasita de forma proliferativa para não-proliferativa. O sucesso deste evento depende da função de uma histona metiltransferase DOT1B, juntamente com a atenuação da expressão produzida em algumas VSG ESAGs (do inglês “*expression sites associated genes*”) (HERTZ-FOWLER et al., 2008). Além disso, foi proposto que alguns ESAGs poderiam funcionar como “sensores” que deixam os tripanossomas se tornarem quiescentes quando o local de expressão é desligado (BATRAM et al., 2014).

#### **1.4. *Leishmania* sp.**

A leishmaniose é uma doença tropical e subtropical causada por um parasita intracelular transmitido aos seres humanos pela picada da mosca da areia, principalmente *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (Europa, Norte da África, Oriente Médio, Ásia e parte da América do Sul). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a Leishmaniose é considerada uma das sete doenças tropicais mais graves e representa um problema crítico de saúde mundial, apresentando um amplo espectro de manifestações clínicas potencialmente fatais. As características clínicas variam dependendo das características do parasita e dos aspectos genéticos do hospedeiro, que determinam a eficácia da resposta imune. De acordo com as manifestações clínicas, pode ser

dividida em cutânea, mucosa e visceral ou kala-azar. O ciclo de vida (Figura 3) desse parasita se completa em dois hospedeiros, sendo um vetor (mosca da areia) e o outro permanente (mamífero), como os outros do grupo TriTryp (TORRES-GUERRERO et al., 2017).

**Figura 3.** Ciclo de vida da *Leishmania braziliensis*



Fonte: CDC (2013)

A leishmaniose é transmitida pela picada de flebotomíneos fêmeas infectados. Os flebótomos injetam o estágio infeccioso (ou seja, promastigotas) de sua probóscide durante sua alimentação por sangue (1). Promastigotas que atingem a ferida de punção são fagocitados por macrófagos (2) e outros tipos de células fagocíticas mononucleares. Promastigotas se transformam dentro das células no estágio tecidual do parasita (ou seja, amastigotas) (3), que se multiplica por divisão simples e procede para infectar outras células fagocíticas mononucleares (4). Parasita, hospedeiro e outros fatores vão definir se a infecção se torna sintomática e se a leishmaniose resulta em cutânea ou visceral. Os flebótomos são infectados pela ingestão de células infectadas durante sua alimentação (5, 6). Nos flebótomos, os amastigotas se transformam em promastigotas, no intestino (7) (no intestino grosso para organismos *Leishmaniose* do subgênero *Viannia*; no intestino médio para organismos do subgênero *Leishmania*), e migram para a probóscide (8).

A leishmaniose tegumentar (LT) é um dos principais problemas parasitários de saúde no Brasil, em que as principais espécies de *Leishmania* associadas a esta doença são *Leishmania braziliensis*, *L. naiffi*, *L. shawi*, *L. lainsoni*, e *L. amazonensis*. Destes, a *L. braziliensis* é a espécie predominante nas regiões do Brasil onde a LT é endêmica, com baixa prevalência no estado do Amazonas. A transmissão de *L. braziliensis* está associada à presença de animais domésticos, os quais estão implicados como potenciais reservatórios. É transmitido por diversas espécies de flebotomíneos, incluindo *Lutzomyia intermedia*, *L. whitmani* e *L. wellcomei* (DE OLIVEIRA; BRODSKYN, 2012).

Outra espécie muito importante no território brasileiro é a *L. amazonenses*, identificada em diferentes regiões do Brasil. Esse parasita é capaz de induzir úlceras cutâneas, incluindo leishmaniose cutânea difusa (LCD), considerada uma forma rara da LT, tendo sido descritos somente 350 casos na literatura mundial. *L. amazonensis* apresenta como principais espécies de vetores associadas à sua transmissão os flebotomíneos das espécies *L. flaviscutellata* e *L. olmeca* e os reservatórios naturais são roedores e marsupiais. Interações parasita-hospedeiro podem levar a uma série de eventos que culminam em manifestações clínicas; as formas clínicas de LT variam devido a essa complexidade. No Brasil, a LT pode se apresentar como uma lesão única (LCL, leishmaniose cutânea localizada) que pode ser imperceptível ou discreta e pode ser curada espontaneamente (DE OLIVEIRA; BRODSKYN, 2012).

Ulcerações múltiplas podem também, estar presentes, comprometendo as áreas mucosas (LM, leishmaniose mucosa). O LM é importante, principalmente na América do Sul por ser causado principalmente por *L. braziliensis*, embora a *L. amazonensis* também tenha sido implicada (COSTA et al., 1986). Geralmente, as lesões iniciam na mucosa nasal e se espalham para a mucosa oral e faríngea, laringe e pele do nariz e lábios<sup>1</sup>. As lesões da mucosa bucal geralmente produzem sintomas que vão desde simples desconforto e dor leve ou odinofagia (dor durante a deglutição) até caquexia em casos extremos; este último é observado apenas nos casos em que a lesão envolve a totalidade da faringe, laringe (com rouquidão) e esôfago (com disfagia). No início da doença, há infiltração da mucosa com ulcerações superficiais; mais tarde, quando as úlceras estão bem desenvolvidas, suas bordas têm aparência necrótica e são rasgadas e separadas. A úvula, os pilares do teto do palato e as amígdalas podem ser destruídos. Devido às infecções sobrepostas, os linfonodos regionais podem ser infartados e se tornarem dolorosos. Quando a infecção é na

cavidade nasal, pode ocorrer atrofia das conchas nasais e destruição do septo cartilaginoso com mau cheiro e, em casos extremos, pode causar a morte (DE OLIVEIRA; BRODSKYN, 2012).

Outra forma grave da doença é a leishmaniose visceral (LV) também conhecida como kala-azar (febre negra), uma condição infecciosa febril que se espalha em grande parte do sul e leste da Ásia (principalmente na Índia e na China), grande parte da África, do Mediterrâneo (afetando crianças e adultos) e da América do Sul (em maior parte crianças são afetadas). É causada por *L. donovani* (Índia e África Oriental), *L. infantum* (região do Mediterrâneo) e *L. chagasi*, *L. amazonensis* e *L. tropica* na América do Sul (DESJEUX, 2004; GUERIN et al., 2002). O período de incubação é de 3 a 8 meses. A população em risco inclui crianças em idade pré-escolar e indivíduos imunocomprometidos e subnutridos. Ela se manifesta por linfadenopatia (uma condição em que os nódulos linfáticos ficam com tamanho, consistência ou número anormais, geralmente inchaço), hepatomegalia (aumento anormal do volume do fígado), esplenomegalia (aumento anormal do volume do baço), palidez, anemia, leucopenia (diminuição da taxa sanguínea de leucócitos), trombocitopenia (redução do número de plaquetas no sangue), febre, sudorese noturna, fraqueza, anorexia, diminuição da força física, pigmentação cutânea e perda de peso, que podem progredir rapidamente em semanas ou meses. Além disso, crianças afetadas apresentam diarreia crônica característica e retardo de crescimento (DE OLIVEIRA; BRODSKYN, 2012).

Semelhante a outros micróbios e parasitas, os tripanossomatídeos desafiam o sistema imunológico e induzem uma resposta no hospedeiro. Esta interação parasita-hospedeiro pode produzir uma resposta de hiperinfecção, ou uma resposta imune exacerbada que ameaça a vida do hospedeiro. Para ser bem-sucedido, o parasita precisa balancear seu comportamento entre estes dois extremos, para que assim consiga evitar a morte do hospedeiro e ainda driblar as respostas do sistema imunológico. Os métodos de escape da ativação do sistema imunológico que os tripanossomatídeos desenvolveram, foi devido o resultado do tempo e períodos compartilhados com os seres humanos ao longo de sua evolução há muitos milhões de anos (CNOPS; MAGEZ; DE TREZ, 2015).

## **1.5. Epigenética**

A descoberta marcante da estrutura de fita dupla do DNA (WATSON; CRICK, 1953), foi seguida de avanços notáveis na elucidação do “dogma central” da biologia molecular, que consiste

na transferência da informação genética contida no DNA para RNA e na sua posterior tradução em proteínas (CRICK, 1970). Mais de meio século após, embora esse dogma central continue sendo o princípio norteador da expressão gênica, está claro que elementos adicionais são necessários para explicar as interações do ambiente com o genoma, os quais são cruciais para a modulação da expressão gênica e das funções celulares em resposta a uma variedade de estímulos (CHEN et al., 2017). Em 1942, Waddington determinou como epigenética, as mudanças ocorridas no fenótipo de um organismo sem que seu genótipo fosse modificado (WADDINGTON, 1942). Com o aumento da tecnologia e desenvolvimento de novas técnicas de análises, podemos afirmar esses mecanismos epigenéticos propostos a décadas atrás, expressam o resultado da interação do organismo com o ambiente, sem que o DNA seja alterado, somente pela adaptação e remodelamento da cromatina (CHEN et al., 2017).

Em eucariotos o DNA nuclear é organizado e compactado por um complexo macromolecular denominado de cromatina, formado pela associação de proteínas com o DNA. Essa compactação, leva a formação dos cromossomos, que é o último nível de organização do material genético. Os nucleossomos são as unidades funcionais da cromatina, formado por um core de proteínas histonas (dois dímeros H2A-H2B e um tetrâmero H3-H4), DNA e uma histona ligante, também chamada de H1, que mantém a estabilidade do complexo e auxilia na compactação. As histonas são proteínas carregadas positivamente, devido a abundância de resíduos polares positivos como as lisinas e argininas, e assim interagem por uma complementariedade de cargas com o DNA, mantendo o complexo em equilíbrio. Aproximadamente 80% do DNA genômico é empacotado nos nucleossomos, e os 20% restantes estão contidos nas regiões de ligação entre nucleossomos vizinhos (CHEN et al., 2017).

A natureza nucleossomica per se tem caráter inibitório, visto que a interação DNA-histona, evita que outros complexos ligantes ao material genético se aderem a fita de DNA. Assim, há uma regulação da acessibilidade de regiões genômicas específicas, como por exemplo as de transcrição (regiões intensificadoras de transcrição, regiões promotoras, ORF's, etc), por mudanças químicas (através de modificações de DNA e histonas) ou estruturais (via remodelação da cromatina), que modificam o modo que o DNA interage com as histonas (CHEN et al., 2017).

Na metilação do DNA, um grupo metil (CH<sub>3</sub>) é adicionado enzimaticamente aos anéis de citosina do material genético com precisão temporal (estágios de desenvolvimento ou diferenciação) e espacial (regiões específicas de DNA em um dado cromossomo). No genoma

humano, a metilação do DNA ocorre em 60 a 80% dos 28 milhões de dinucleotídeos CpG, principalmente para formar 5-metilcitosina (5-mC). Acredita-se que a metilação seja um traço genético hereditário estável, mas estudos recentes indicam que os grupos metil podem ser adicionados ou apagados dinamicamente (WU; ZHANG, 2015).

Outro fator importante na epigenética são os RNAs não codificantes (ncRNAs), como o nome sugere, são uma classe de RNAs que não são traduzidos em proteínas. Embora três quartos do genoma humano possam ser transcritos, apenas uma pequena porção dos genes é traduzida em proteínas (CEDAR; BERGMAN, 2009). Os ncRNAs possuem algumas funções importantes na regulação epigenética como, ativação ou supressão gênica, através do recrutamento de enzimas modificadoras da cromatina para regular a expressão gênica em cis ou em trans, podendo também, recrutar múltiplas proteínas para montar complexos de ribonucleoproteínas, que normalmente atuam sobre a cromatina e / ou modulam as marcas de histonas (MARTIENSSEN; MOAZED, 2015).

E por último, temos também, as modificações pós-traducionais (PTMs, do inglês “*post translational modification*”) de histonas, sendo um dos principais fatores epigenéticos no controle da expressão gênica. Desde os estudos pioneiros de Vincent Allfrey, no início dos anos 60, era sabido que as histonas são modificadas pós-traducionalmente (ALLFREY; FAULKNER; MIRSKY, 1964). Agora, além desta certeza, já sabemos que há um grande número de diferentes PTMs de histonas. Uma perspectiva de como essas modificações poderiam afetar a estrutura da cromatina veio da resolução da estrutura do nucleossomo em 1997 (LUGER et al., 1997). Como já foi falado anteriormente, a estrutura indica que as caudas de histonas são altamente básicas, devido ao excesso de aminoácidos com cadeias laterais alcalinas, e assim podem se projetar de seu próprio nucleossomo e entrar em contato com os nucleossomos adjacentes. Com isso, concluiu-se que essas modificações afetam as interações inter-nucleossômicas e, portanto, influenciam na estrutura geral da cromatina por afetar a carga de interação DNA-histona. As modificações não apenas regulam a estrutura da cromatina simplesmente por estarem lá, mas também recrutam enzimas de remodelação que utilizam a energia derivada da hidrólise do ATP para reposicionar os nucleossomos. O recrutamento de proteínas e complexos com atividades enzimáticas específicas, agora se torna um dogma aceito de como as modificações medeiam suas funções. Essas modificações não somente podem influenciar na transcrição, mas como também no

reparo, replicação e recombinação do DNA, visto que a cromatina é onipresente (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011).

A acetilação de lisinas, foi uma das primeiras PTMs de histonas descritas. É altamente dinâmica e regulada pela ação de dois grupos de enzimas, as histonas acetiltransferases (HATs) e histonas desacetilases (HDACs). As HATs utilizam o acetil CoA como substrato e catalisam a transferência de um grupo acetila para o grupo amino das cadeias laterais da lisina. Ao fazer isso, eles neutralizam a carga positiva da lisina e essa ação tem o potencial de enfraquecer as interações entre histonas e DNA. Existem duas classes principais de HATs: tipo-A e tipo-B. As HATs tipo B são altamente conservadas e predominantemente citoplasmáticas, promove a acetilação de histonas livres, mas não depositadas na cromatina. Já as HATs de tipo A são uma família de enzimas mais diversificada. No entanto, elas podem ser classificadas em pelo menos três grupos distintos, dependendo da homologia da sequência de aminoácidos e da estrutura conformacional, sendo denominadas de: GNAT, MYST e CBP / p300 (HODAWADEKAR; MARMORSTEIN, 2007). De um modo geral, cada uma destas enzimas tem capacidade de modificar múltiplos locais dentro das caudas N-terminais das histonas. Sua capacidade de neutralizar cargas positivas, interrompe a influência das interações eletrostáticas, que estabilizam o complexo DNA-histona, e com isso se correlaciona bem com classes de coativadores transcricionais (YANG; SETO, 2007). As enzimas HDAC se opõem aos efeitos das HATs, e assim, a desacetilação da lisina, restaura sua carga positiva, estabilizando a arquitetura da cromatina local. Pos este fato, podemos dizer que HDACs são predominantemente repressores de transcrição, já que diminuem os espaços livres de interação com DNA. Em geral, as HDACs possuem especificidade com seu substrato relativamente baixa, e por isso uma única enzima é capaz de desacetilar vários sítios. Devido a isso, estas enzimas são encontradas em diversos complexos distintos, frequentemente com outros membros da família HDAC, e isso dificulta o entendimento da função de cada uma (YANG; SETO, 2008).

Como a acetilação, a fosforilação das histonas é altamente dinâmica. Ocorre em serinas, treoninas e tirosinas, predominantemente, mas não exclusivamente, nas caudas N-terminais das histonas. Os níveis da modificação são controlados por quinases e fosfatases que adicionam e removem a modificação, respectivamente. Todas as histonas quinases identificadas transferem um grupo fosfato do ATP para o grupo hidroxil da cadeia lateral do aminoácido alvo. Ao fazer isso, a modificação adiciona uma carga negativa significativa à histona que influencian a estrutura da cromatina. Para a maioria das quinases, no entanto, não está claro como a enzima é recrutada com



precisão para o seu local de ação na cromatina. Em alguns casos, exemplificados pela enzima MAPK1 de mamífero, a quinase possui um domínio de ligação ao DNA intrínseco com o qual se liga ao DNA. Alternativamente, seu recrutamento pode requerer associação de um fator de ligação à cromatina antes de entrar diretamente em contato com o DNA para estabilizar a interação geral (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011).

A metilação de resíduos de lisina ou arginina pode ocorrer em vários estados de modificação. Os resíduos de lisina podem alojar um (me1), dois (me2) ou três (me3) grupamento metil em sua cadeia lateral, ao passo que os resíduos de arginina podem alojar um (me1) ou dois (me2) grupamentos metil. O estado de di-metil-arginina é ainda definido em configuração simétrica (me2s) ou na assimétrica (me2a) (TURNER, 2005). Ao contrário da acetilação e da fosforilação que alteram as propriedades de carga de um resíduo modificado, a metilação é inerte e não afeta a carga dos aminoácidos. Em vez disso, a metilação de histonas atua como um sítio de ancoragem para proteínas efetoras que desempenham uma função na cromatina. Por exemplo, o homeodomínio de planta (PHD) do fator de transcrição de bromodomínio PHD (BPTF) liga-se ao sítio H3K4me2 / me3 e recruta o complexo de remodelamento de cromatina NURF, para a ativação transcricional de genes alvo. Em contraste, o cromodomínio de HP1, que são proteínas que contribuem com a formação da heterocromatina, reconhece a metilação do sítio H3K9 e ajuda a reforçar o estado reprimido em genes silenciados (NG et al., 2009).

Apesar dessas serem as mais estudadas, em humanos e outros eucariotos já foram descritos mais de 20 tipos de modificações, que incluem acetilação, fosforilação, metilação (mono-, di e tri-), propionilação, butirilação, crotonilação, formilação, hidroxilação, citrulinação, malonilação, succinilação, 2-hidroxisobutirilação, glutarilação, ubiquitinação, SUMOilação, O-GlcNAcilação, ADP-ribosilação, e isomerização de prolina.

## **1.6. Epigenética dos TriTryps**

Na ânsia de elucidar o “Código de Histonas dos Tripanossomatídeos”, alguns estudos funcionais foram realizados com sucesso, no entanto o papel dessas modificações tanto na biologia da cromatina, quanto na sinalização epigenética nestes parasitas está apenas começando a ser descoberto. Houve um grande avanço no mapa de PTMs de histonas de *T. cruzi* com a publicação de Picchi et al., 2017, em que mais de 13 modificações diferentes, distribuídas em um total de 176 PTMs, encontradas em todas as histonas canônicas (H2A, H2B, H3 e H4), variantes (H2A.z,

H2B.v e H3.v) e ligante (H1). Porém, para os outros membros dos TriTryps, a informação ainda é muito escassa e o número de sítios de PTMs conhecidos ainda é muito menor do que o de *T. cruzi* e outros organismos modelo. Em *T. brucei*, são descritas apenas 30 marcas de acetilação e metilação nas histonas canônicas (FIGUEIREDO; CROSS; JANZEN, 2009; HORN, 2007; JANZEN et al., 2006a, 2006b; MANDAVA et al., 2007; MAREE; PATTERTON, 2014; SIEGEL et al., 2008). E para *Leishmania* a situação é ainda pior, descrito poucos sítios de acetilação nas histonas H3 e H4 (THOMAS et al., 2009).

As histonas dos tripanossomatídeos são diferentes quando comparadas com outros organismos, principalmente nos sítios de modificações pós-traducionais, possivelmente pela existência de mecanismos regulatórios distintos de transcrição, replicação e reparo do DNA (FIGUEIREDO; CROSS; JANZEN, 2009). No entanto, algumas dessas modificações parecem ocorrer em sítios conservados a outros eucariotos. Por exemplo, as lisinas 4, 10 e 14 são acetiladas na histona H4 de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei* (ELIAS; NARDELLI; SCHENKMAN, 2009; JANZEN et al., 2006). Estas lisinas parecem homólogas ao K5, K12 e K16 de outros organismos. Em *T. brucei*, essas modificações não parecem ser reversíveis, ocorrendo durante a fase S do ciclo celular, possivelmente durante a montagem da cromatina (SIEGEL et al., 2008).

Como já foi descrito anteriormente, o código de histonas afeta potencialmente a regulação transcricional em organismos eucariotos. Estudos feitos em tripanossomatídeos demonstram alguns padrões específicos de histonas e/ ou variantes marcam os limites das unidades de transcrição policistrônica. Em *T. cruzi* são encontradas H3 / H4 acetilada e H3 trimetilada (RESPUELA; FERELLA; RADA-IGLESIAS, 2008); em *T. brucei* H4 acetilada, H3 trimetilada e dímeros de H2A.Z / H2B.V (SIEGEL et al., 2009; WRIGHT; SIEGEL; CROSS, 2010); e *L. major* somente histonas acetiladas (THOMAS et al., 2009). Um compilado de estudos mostraram que as modificações histonas também desempenham importantes funções durante o controle do ciclo celular. Por exemplo, para *T. brucei* foi descrito que o silenciamento da lisina metiltransferase DOT1A, enzima responsável por promover a metilação no sítio H3K76, gera uma população de células que possui metade da quantidade de DNA comparado com uma célula normal. Isso ocorre devido a progressão impropria por mitose sem replicação do DNA, sugerindo que H3K76met tem um papel importante na progressão adequada do ciclo celular (FIGUEIREDO; CROSS; JANZEN, 2009; JANZEN et al., 2006). Além disso, estudos descreveram que algumas enzimas

modificadoras de histonas que possuem atividades HDAC, podem controlar os sítios de expressão das glicoproteínas de superfície variantes (VSGs ES). Esse é o caso das proteínas DAC1 e DAC3 que possuem atividade HDAC e dispõem de papéis distintos no silenciamento telomérico (local em que se situa o VSG ES), enquanto DAC1 impede o silenciamento do telômero em parasitas de forma sanguínea, DAC3 é fundamental para que o mesmo ocorra (WANG; KAWAHARA; HORN, 2010). A metiltransferase DOT1B desempenha uma função parecida que a DAC3, já que também é necessário para o silenciamento telomérico. Devido a variantes ambientais, os parasitas enfrentam diferentes condições que levam ao estresse. Esse estresse leva a uma modulação e consequente regulação da expressão gênica, mediada por modificações pós-traducionais de histonas (FIGUEIREDO; JANZEN; CROSS, 2008).

Com isso, após todas as evidências descritas acima, os mecanismos epigenéticos sugerem uma importante constituição na biologia desses parasitas e, conseqüentemente, nas condições infecciosas de suas respectivas doenças humanas. Alguns estudos funcionais são dificultados pela falta de informações básicas, particularmente sobre a ocorrência e localização específica do sítio das histonas PTMs. Com isso estudos são necessários para mapear e comparar os perfis de PTMs de histonas nos demais tripanossomatídeos a fim de uma melhor compreensão do controle epigenético nesses organismos, e é nesse contexto que o presente projeto se insere.

### **1.7. Análise de PTMs através de Espectrometria de Massas**

A espectrometria de massas (MS, do inglês “*mass spectrometry*”) é uma técnica analítica utilizada com o intuito de caracterizar moléculas ionizáveis em estado gasoso, permitindo obter informações sobre seu peso molecular, estrutura e abundância (SILVA et al., 2013). Uma das primeiras aplicações da MS nas pesquisas proteicas, foi o mapeamento de PTMs em proteínas purificadas (STENFLO et al., 1974). Contudo, foi somente no início da década passada que decolaram o número de pesquisas onde o objetivo do estudo eram as PTMs. Quando comparada a análise de proteomas com a de PTMs, podemos identificar algumas diferenças básicas. Na análise de um proteoma, vários peptídeos estão disponíveis, para que numa etapa posterior se possa caracterizar uma proteína. Já em análises de PTMs, cada peptídeo que possui um sítio modificado deve ser identificado e caracterizado *per se*, visto que nem sempre as versões modificadas desses

peptídeos estarão abundantes em relação as suas versões não modificadas, já que na sua maioria, são circunstanciais (OLSEN; MANN, 2013).

Resumidamente, a análise de PTMs por MS, de um modo geral, inicia com ionização da molécula alvo em uma fonte de íons, podendo ser tanto ionização por *eletrospray* (ESI, do inlês “*electrospray ionization*”) (FENN et al., 1990) quanto MALDI (do inglês “*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*”) (KARAS; BACHMANN; HILLENKAMP, 1985). Essas moléculas, agora ionizadas, serão então separadas por cromatografia líquida, na maioria das vezes de fase reversa, acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS). Os espectrômetros de massas em tandem têm a capacidade adicional de selecionar um íon e fragmentá-lo, a fim de obter informações estruturais (MS / MS) (OLSEN; MANN, 2013; SILVA et al., 2013).

Contudo, um dos fatores mais importante para descoberta das PTMs, é a cobertura de sequência das proteínas. O *dynamic range* elevado devido a alta concentração alguns tipos celulares em humanos, dificulta a identificação e quantificação de proteínas de baixa abundancia. Assim, algumas etapas de preparo das amostras, como fracionamento e enriquecimento, são necessárias. Com isso, a utilização de *Nano LC* (cromatografia líquida capilar que utiliza vazões de sub-microlitros) como abordagem de fracionamento e concentração de amostras, é uma das mais eficazes no aumento das taxas de identificação de proteínas e cobertura de sequencias (SILVA et al., 2013).

Como na proteômica, a tripsina é a enzima de escolha para análise das PTMs, devido a sua alta especificidade e às propriedades amistosas de MS / MS dos peptídeos resultantes. Porém, não é regra, em alguns casos, os peptídeos trípticos podem ser muito grandes ou muito pequenos para análise em LC-MS/MS. Outro fator que pode alterar a utilização da enzima é a modificação da solubilidade do peptídeo pelas PTMs, como por exemplo os peptídeos trípticos glicosilados ou fosforilados podem ser muito hidrofílicos para ser capturados pelo C18. Nesses casos a utilização de outra protease com diferentes especificidades de clivagem é recomendada, como quimiotripsina, Lys-N, Glu-C e Asp-N (OLSEN; MANN, 2013).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Caracterizar, comparativamente, o perfil de modificações pós-traducionais de histonas canônicas e variantes de *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. braziliensis*., utilizando abordagens de proteômica baseada em espectrometria de massas (LC-MS/MS).

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Verificar a aplicabilidade dos protocolos de extração, enriquecimento e purificação de histonas padronizados em *T. cruzi*, para *T. brucei* e *L. braziliensis*, e otimiza-los, caso necessário;
- Otimizar os métodos de LC-MS/MS para identificação de histonas canônicas e variantes, bem como de suas PTMs para *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. braziliensis*;
- Caracterizar, por LC-MS/MS, o perfil de PTMs de histonas canônicas e variantes de *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. braziliensis*.;
- Comparar o mapa de PTMs de histonas canônicas e variantes de *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. braziliensis*., para encontrar padrões conservados e exclusivos de cada organismo

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. Cultura de células**

Células epimastigotas de *T. cruzi* Dm28c (CONTRERAS et al., 1988), procíclicas de *T. brucei* 427 (BRUN; SCHÖNENBERGER, 1979) e promastigotas de *L. braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 (CELESTE; GUIMARÃES, 1988) em fase de crescimento exponencial, foram mantidas em cultura axênica com repiques feitos a cada 3-4 dias para *T. cruzi* e *T. brucei* e semanalmente para *L. braziliensis* mantidos em meio *Liver Infusion Triptose* (LIT), SDM-79 e meio bifásico composto por fase sólida de ágar sangue e fase líquida Schneider respectivamente, todos suplementados com 10% de soro fetal bovino.

#### **3.2. Coleta dos Parasitas**

Foram obtidas células de epimastigota na ordem de aproximadamente  $3 \times 10^9$ . Este total de células foi dividido em três tubos, cada um com aproximadamente  $1 \times 10^9$  células. Estas células de cada tubo foram centrifugadas a 5000 xg, por 10 minutos a 4°C, lavadas em 10 mL de PBS 1X, centrifugadas novamente a 5000 xg, por 10 minutos a 4 °C, ressuspensas em 1 mL de PBS 1X, centrifugadas novamente nas mesmas condições anteriores e os pellets foram congelados (-20°C) até o uso.

#### **3.3. Enriquecimento de proteínas histonas**

As células dos três parasitas foram lisadas, ressuspendendo o *pellet* obtido em 1 mL de tampão A (0,25 M de sacarose; 1 mM de EDTA; 3 mM de CaCl<sub>2</sub>; 0,01 M de Tris-HCl pH 7,4; 0,5% (v / v) de saponina; coquetel inibidor de protease Complete mini EDTA free, Roche; inibidor de fosfatase Roche; Halt Protease Inhibitor; butirato de sódio) e centrifugado por 10 min a 5000g, 4 ° C. Foi obtido então um *pellet* contendo os detritos celulares e os núcleos, que foi lavado uma vez em 1 mL de Tampão B (0,25 M de sacarose; 1 mM EDTA; 3 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,01 M Tris HCl pH 7,4; coquetel inibidor de protease Complete mini EDTA free, Roche; inibidor de fosfatase Roche; Halt

Protease Inhibitor; butirato de sódio). As proteínas nucleares solúveis foram extraídas tratando o *pellet* obtido em 1 mL de Tampão C (1% (v / v) de Triton X-100; NaCl 0,15 M; M EDTA; Tris-HCl 0,01 M pH 8; coquetel inibidor de protease Complete mini EDTA free, Roche; inibidor de fosfatase Roche; Halt Protease Inhibitor; butirato de sódio). Subsequentemente, o material foi centrifugado durante 20 min a 10 000 g a 4°C, lavado 3 vezes em 100 mM Tris-HCl pH 8, e ressuspenso em 1 mL de HCl 0,4 N e incubado num rotador durante 2 h a 4°C. As proteínas solúveis em ácido foram recuperadas no sobrenadante após centrifugação da amostra durante 15 min a 10 000 g, 4°C. O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo e foi adicionado acetona (8 x volume inicial) e a amostra foi incubada *overnight* a -20°C para precipitação das proteínas solubilizadas em ácido. A amostra foi centrifugada durante 15 min a 3100 g, 4°C. A acetona foi removida cuidadosamente e o *pellet* foi lavado 3 vezes com 1 mL de acetona. O *pellet* de proteína foi cuidadosamente seco a 37°C e depois foi ressuspenso em 50 µl de água.

### **3.4. Fracionamento das histonas**

Os extratos enriquecidos com histona foram submetidos à separação por SDS-PAGE a 15% e corados com azul de coomassie. As bandas referentes às histonas foram excisadas de dois modos diferentes. Em um primeiro experimento, elas foram cortadas em conjunto em pedaços próximos de 1x1 mm e separadas em tubos de microcentrífuga. Já em outra análise, as bandas foram excisadas e analisadas separadamente. Os pedaços de gel foram descorados, lavando duas vezes com solução de descoloração para Coomassie (bicarbonato de amônio 25 mM em etanol 50%), com quantidade suficiente para cobrir os pedaços de gel, agitando a 800 rpm no thermomixer por 10 minutos a 25 °C, e então, foram desidratados com etanol 100% nas mesmas condições. Em cada etapa, foi retirado e descartado o sobrenadante, deixando as amostras secas até sua utilização na próxima etapa.

### **3.5. Preparo das histonas para digestão trípica em gel**

Previamente à digestão trípica *in-gel*, as bandas de histonas foram submetidas à propionilação *in vitro* para bloqueio de sítios de lisina não modificados (PLAZAS-MAYORCA et al., 2009), evitando assim a formação de peptídeos pequenos nas caudas ricas em lisina na análise em

espectrometria de massas. Para isso, imediatamente antes do uso, foi preparado o reagente de propionilação, adicionando 1 volume de anidrido propiônico a 10 volumes de 100 mM de bicarbonato de amônio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ). O reagente foi adicionado nas amostras suficiente para cobrir os pedaços de gel, e foi deixado por 5 minutos. Logo após foi adicionado 4x o volume (referente ao reagente de propionilação adicionado) de 1 M de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . Foi usada uma tira indicadora de pH para monitorar o pH das amostras. Foi testado o pH pipetando uma pequena quantidade ( $<0,5 \mu\text{L}$ ) em uma tira indicadora de pH, utilizando  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  ou ácido acético glacial a fim de equilibrar o pH entre 7 e 9. A reação foi feita por 60 minutos, logo após foi retirado o sobrenadante e repetido o procedimento mais uma vez. Foi finalizado o procedimento com uma lavagem de 100 mM de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  por 10 minutos a  $25^\circ\text{C}$  com uma agitação de 1300 rpm em termobloco. Logo após uma outra lavagem em  $\text{H}_2\text{O}$  por 1 minuto seguida de uma lavagem com 50% acetonitrila por 15 minutos a 1300 rpm. Por fim os géis foram desidratando no fim com 100% acetonitrila.

### **3.6. Digestão trípica em gel e extração dos peptídeos**

Para digestão, os pedaços de gel foram reidratados com solução de tripsina  $12,5 \text{ ng}/\mu\text{L}$  (diluída em ABC 50 mM no momento do uso), sob incubação na geladeira ( $4^\circ\text{C}$ ) por 20 minutos. Após, foi adicionado tampão de digestão aos géis e foram incubados na estufa a  $37^\circ\text{C}$  por 16 horas. Para interromper a digestão, as amostras foram acidificadas com ácido trifluoroacético (TFA), deixando-as em uma concentração final de 0,5% e agitadas em vortex por 10 segundos.

Para extração dos peptídeos, o sobrenadante foi coletado e transferido em tubos novos de microcentrífuga de 2,0 mL. Em seguida, foi adicionada aos géis, a solução de extração (TFA 3% e ACN 30%), em quantidade suficiente para cobrir os géis, mas sem ultrapassar  $400 \mu\text{L}$  e agitado no thermomixer a 800 rpm por 10 minutos a  $25^\circ\text{C}$ . Coletado novamente o líquido e transferido aos tubos novos de 2,0 mL. Essa etapa foi repetida mais uma vez. Adicionado ACN 100% até cobrir os pedaços de gel, agitado em thermomixer a 800 rpm por 10 minutos a  $25^\circ\text{C}$  e transferido o líquido para os tubos de 2,0 mL. Essa etapa foi repetida mais uma vez.

Por fim, as amostras foram secadas em Speed Vac (Thermo Scientific) a vacuum pressure de 0,1, até 10 a 20% do volume original, suficiente para remover a ACN. Os peptídeos foram purificados em StageTips C18 e analisados por LC-MS/MS.



### **3.7. Preparo das histonas para digestão trípica em solução**

Os extratos enriquecidos com histonas (20-40 µg de proteínas) foram propionilados. Para isso, as amostras foram dissolvidas em 15 µL 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> pH 8.0. As amostras foram diluídas ou secas até obter um volume de aproximadamente 30 µL. O reagente de propionilação foi feito adicionando 1 volume de anidrido propiônico a 3 volumes de 2-propanol, seguindo de agitação em vortex brevemente para misturar. Foi usada uma tira indicadora de pH para monitorar o pH das amostras, a fim que eles fiquem em uma faixa de 7 a 9. Foi adicionado 10 µL de reagente de propionilação. Para um volume da reação de propionilação usado, foi adicionado imediatamente de 1/4 a 1/2 volume de NH<sub>4</sub>OH à amostra de histona, para balancear o pH da reação. Foi testado o pH pipetando uma pequena quantidade (<0,5 µL) em uma tira indicadora de pH. Foi utilizando NH<sub>4</sub>OH ou ácido acético glacial a fim de equilibrar o pH entre 7 e 9. As amostras foram incubadas em termobloco a 37°C por 15 minutos. Logo após as amostras foram secas em SpeedVac até obter de 5 a 10 µL e diluídas até obter um volume de 30 µL com ddH<sub>2</sub>O. O processo foi repetido mais uma vez para ter mais de 95% de eficiência de propionilação.

### **3.8. Digestão trípica em solução**

Para a digestão da amostra propionilada em solução, foi adicionado 15 µL de 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> e ddH<sub>2</sub>O até obter um volume entre 50-100 µL. A tripsina foi adicionada em uma relação de 1:20 (1 µg de tripsina para 20 µg de amostra) e incubada a 37°C *overnight*. Para paralisar a digestão foi adicionada de 3 – 5 µL de ácido acético glacial a fim de o pH ficar próximo de 3.0. Os peptídeos foram purificados em StageTips C18 para análise por LC-MS/MS.

### **3.9. Purificação de Peptídeos por StageTip C18**

As *StageTips* foram confeccionadas *in-house* seguindo os procedimentos de RAPPILBER; MANN; ISHIHAMA, 2007. Os discos 3M Empore™ que possuem *beads* cromatográficas (C18) imobilizadas em uma malha de Teflon foram colocados em ponteiros de 200 µL. As *StageTips* foram acopladas a adaptadores (tubo de 1,5 mL com o fundo e a parte superior cortados) e ao tubo de lavagem (tubo de 2,0 mL sem tampa). Os discos C18 foram condicionados com 100 µL de metanol, centrifugado a 3.300 rpm por 1 minuto e equilibrado com 100 µL de solução A (água; ácido fórmico 0,1%) centrifugado a 3.300 rpm por 1 minuto. Após os discos estarem devidamente condicionadas e equilibradas, as amostras foram colocadas na *StageTip*, centrifugando por 3.300

rpm com tempo necessário que todo o volume passe pelo disco, sem o mesmo secar (de 30 a 90 seg. aprox.). Logo após as *StageTips* foram lavadas 2 vezes com 200 µL de solução A a 3.300 rpm. As amostras foram entregadas em *StageTip* na Plataforma de Espectrometria de Massas do Instituto Carlos Chagas (Fiocruz Paraná).

### 3.10. Análise GelC-MS/MS

As misturas peptídicas foram separadas por cromatografia líquida capilar de fase reversa (RP) on-line (LC) e analisadas por espectrometria de massa em tandem com eletropulverização (ESIMS / MS). Os experimentos foram realizados na instalação de espectrometria de massas RPT02H PDTIS, do Instituto Carlos Chagas (Fiocruz Paraná), com sistema EASY nLC 1000 (ThermoFisher Scientific) acoplado a espectrômetro de massas LTQ Orbitrap XL ETD (ThermoFisher Scientific) equipado com fonte de íons *nanoelectrospray* (Phoenix S & T). A separação cromatográfica dos peptídeos ocorreu em uma configuração de uma coluna analítica de 30 cm (75 µm de diâmetro interno) *in-house* com resina C18 de fase reversa, mantida a uma temperatura constante de 60°C. O solvente A era 0,1% de ácido fórmico, 5% de DMSO em água e o solvente B era 5% de DMSO, 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila. As amostras foram injetadas na coluna e subsequentemente eluídas com um caudal de 250 nL / min e as misturas de peptídeos foram separadas com um gradiente linear de 5 a 40% de acetonitrila em 120 ou 240 min. O espectrômetro de massas foi operado em modo dependente de dados para alternar automaticamente entre MS e MS / MS (MS2), usando múltiplos métodos de fragmentação complementares (dissociação induzida por colisão CID; dissociação colisional de alta energia (HCD)). Os espectros MS de rastreamento de pesquisa completa (a 300–1600 m / z) foram adquiridos no analisador Orbitrap com resolução R = 60 000 a m / z 400 (após acumulação para um valor alvo de 1 000 000 no *linear ion trap*), com a verificação de visualização ativada. Para o método de fragmentação múltipla, os cinco íons mais intensos foram isolados e sequencialmente fragmentados no *ion trap* (CID) ou câmara de colisão (HCD). Íons precursores carregados isoladamente não foram selecionados para fragmentação. Íons que já foram selecionados para MS / MS foram excluídos dinamicamente por 30 s. O tempo total do ciclo foi de aproximadamente três segundos. As condições gerais de espectrometria de massas foram: tensão de pulverização, 2,4 kV; sem bainha e fluxo de gás auxiliar; temperatura do tubo de transferência de íons, 100 ° C; pressão de gás de colisão, 1,3 mTorr; energia de colisão normalizada usando modo de ativação de banda larga 35% para MS2. O limiar de seleção de íons foi de 250

contagens para MS2. Uma ativação  $q = 0,25$  e tempo de ativação de 30 ms foram aplicados nas aquisições de MS2. A opção “*lock mass*” (OLSEN et al., 2005), usando picos DMSO (HAHNE et al., 2013), foi habilitada em todas as varreduras completas para melhorar a precisão da massa dos íons precursores.

### 3.11. Análise de dados

A compilação dos dados, identificação de proteínas e validação foram realizadas por busca *de novo* em banco de dados assistidos utilizando a plataforma computacional Peaks Studio (versão 7.5, Bioinformatics Solutions Inc.) (HAN et al., 2011; MA et al., 2003). A análise sequencial de múltiplas etapas começou com *Peptide De Novo* (sequenciamento *de novo*), de espectros de fragmentos; seguido por *Peaks DB* (correspondência de sequência peptídica das *tags de novo* de alta qualidade, considerando modificações frequentes para a busca no banco de dados) e então pelo *Peaks PTM* (correspondência de sequência peptídica das tags de peptídeo *de novo* somente de alta qualidade restantes, usando um conjunto mais amplo de modificações para a pesquisa de banco de dados).

As proteínas foram buscadas em um banco de dados de *T. cruzi* contendo 13.643 sequências de proteínas da linhagem Dm28c, baixadas em 30 de julho de 2018, para *T. brucei* foi utilizando um banco de dados de 8.758 sequências de proteínas da linhagem TREU927 e para *L. braziliensis* foi utilizado um banco de dados de 8.160 sequências de proteínas da linhagem MHOM/BR/75/M2904, todos os bancos de dados foram obtidos do TriTrypDB, (<http://www.tritrypdb.org>). Em todas as buscas do PEAKS (*Peptide De Novo*, PEAKS DB e PEAKS PTM), a tolerância de massa precursora foi ajustada para 10 ppm e a tolerância de massa do fragmento foi ajustada para 0,5 Da (*ion trap*) ou 20 ppm (Orbitrap). As buscas exigiram uma especificidade enzimática de 4 *missed cleavages*. Para as buscas por *Peptide De Novo* e Peaks DB, as modificações frequentes em histonas de tripanossomatídeos foram estabelecidas como modificações variáveis: acetilação [K] (+42,011 Da); monometilação [K / R] (+ 14,016 Da); dimetilação [K / R] (+28,031 Da) e trimetilação [K] (+42,047 Da). Para as pesquisas de PEAKS PTM, além das modificações utilizadas na etapa anterior, as PTMs de histona que são menos frequentes foram incluídas como modificações variáveis: fosforilação [S / T / Y] (+79,966 Da); acetilação [S / T] (+42,011 Da); monometilação [K / R] (+ 14,016 Da); crotonilação [K] (+68,026 Da); 2-Hidroxiubutirilação [K] (+86,037 Da); succinilação [K] (+100,016 Da); formilação [K]

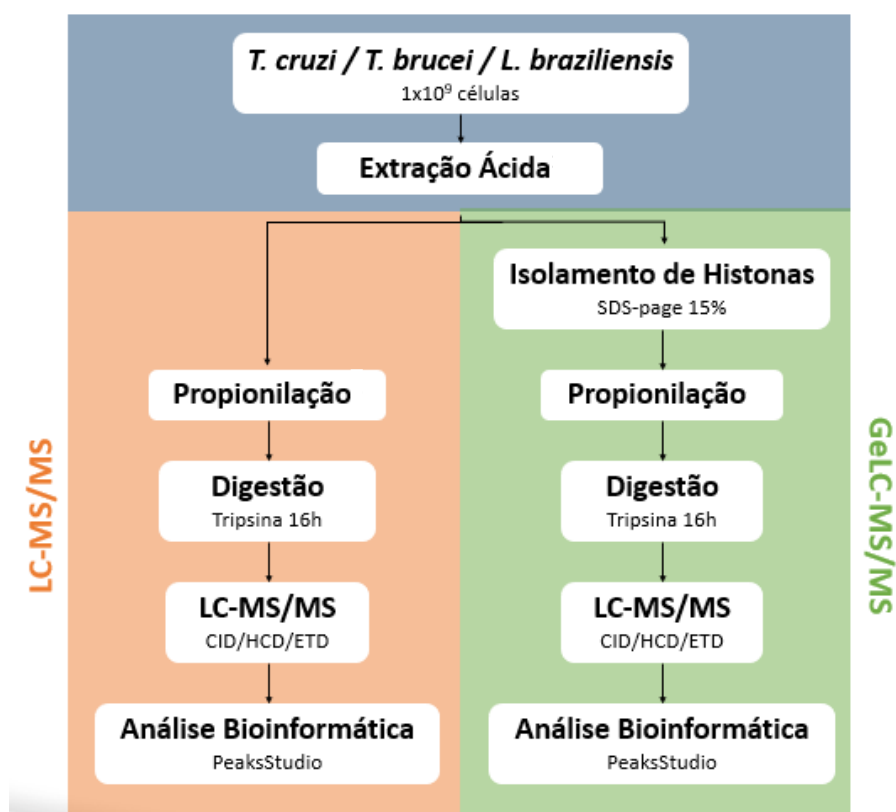
(+27,995 Da); ubiquitinação [K] (+114,043 Da); citrulinação [R] (+0,984 Da); hidroxilação [Y] (+15,995 Da); metilação [proteína N-term] (+14,016 Da) e dimetilação [proteína N-term] (+28,031). As pesquisas de PEAKS PTM também incluíram a desamidação [N / Q] (+0,984 Da), para ajudar a distinguir da citrulinação. A oxidação [M] (+15,995 Da) e a acetilação da proteína N-terminal (+42,011 Da), também foram incluídas em todas as pesquisas. Sempre que aplicável, para dar conta de modificações introduzidas por manipulação experimental, a carbamidometilação [C] (57,022 Da) foi estabelecida como uma modificação fixa. A propionilação [K] (56,026 Da); monometilpropionilação [K] (70,042 Da); propionilação [da proteína N-term] (56,026 Da) e propionilação [peptídeo N-term] (56,026 Da) foram inclusos como modificações variáveis.

Para todas as pesquisas, o *False Discovery Rate* (FDR) foi abaixo de 1%, conforme estimado pelo método de *decoy-fusion*. Ao transformar as identificações de peptídeos em identificações de proteínas, sequências de proteínas similares (por exemplo, isoformas) presentes no banco de dados que não puderam ser distinguidas pelos peptídeos detectados experimentalmente foram agrupadas e referidas como *protein group*. Sítios de PTMs com um *Ascore*  $\geq 20$  foram automaticamente validados.

#### 4. RESULTADOS

abordagens proteômicas utilizadas no presente trabalho (Figura 4) foram escolhidas dentre as descritas no trabalho prévio de caracterização do mapa global de PTMs de *T. cruzi*, realizado por nosso grupo (PICCHI et al., 2017), pois foram as que reuniram os melhores resultados no que diz respeito a cobertura das histonas. Aqui, a abordagem de GeLC-MS/MS foi ainda subdividida em duas estratégias, onde as bandas das histonas foram analisadas de forma combinada ou separadamente.

**Figura 4.** Fluxo de trabalho utilizado para caracterização de PTMs de histonas dos TriTryps.



Fonte: O autor

Células em fase logarítmica de crescimento foram obtidas para todos os TriTryps. Para cada amostra, extratos proteicos foram enriquecidos para proteínas histonas, e as amostras foram processadas e analisadas por espectrometria de massas, de acordo com diferentes estratégias proteômicas.

#### 4.1. Enriquecimento e separação de histonas

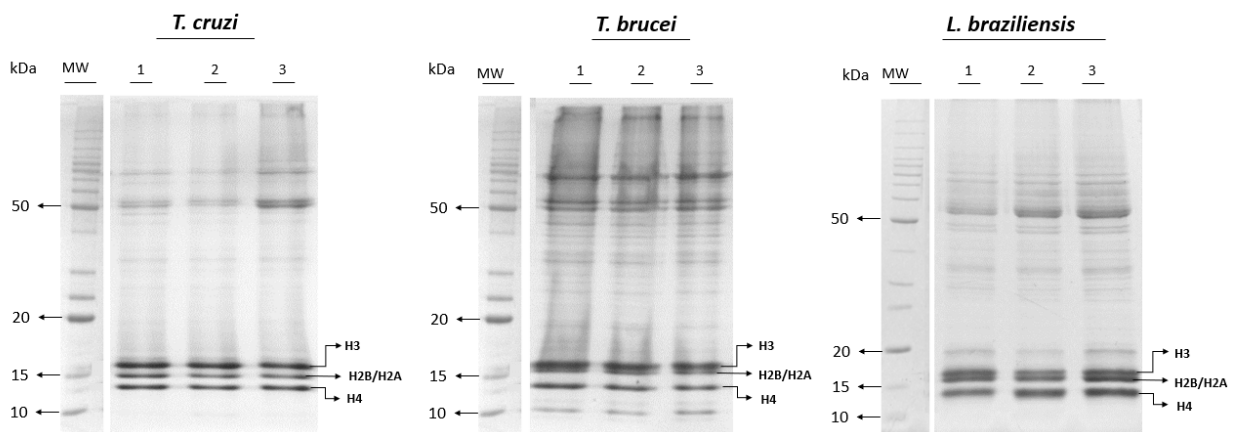
Extratos enriquecidos em histonas foram obtidos, por extração ácida, a partir da coleta de  $1 \times 10^9$  células, em fase log de crescimento, das formas epimastigotas de *T. cruzi*, pró-cíclicas de *T. brucei* e promastigotas de *L. Braziliensis*, em triplicatas biológicas. Após o enriquecimento, as amostras tiveram rendimento entre 60,8 e 92,2  $\mu\text{g}$  de proteína (Tabela 1).

**Tabela 1.** Rendimento obtido nos extratos enriquecidos em histonas dos TriTryps.

Amostra	Quantidade de proteína ( $\mu\text{g}$ )		
	<i>T. cruzi</i>	<i>T. brucei</i>	<i>L. braziliensis</i>
1	60,8	76,9	61,9
2	78,3	87,4	65,9
3	85,4	92,2	87,6

Em seguida, os extratos enriquecidos foram submetidos à SDS-PAGE em gel com concentração de acrilamida otimizada para melhor separação das proteínas histonas, as quais são relativamente pequenas. Na região de baixa massa do gel (13 a 18 kDa), para os três organismos foram observadas bandas enriquecidas correspondentes às histonas (Figura 5), conforme descrito previamente na literatura e confirmado posteriormente em nossos experimentos.

**Figura 5.** Perfil dos extratos enriquecidos em histonas para os TriTryps.



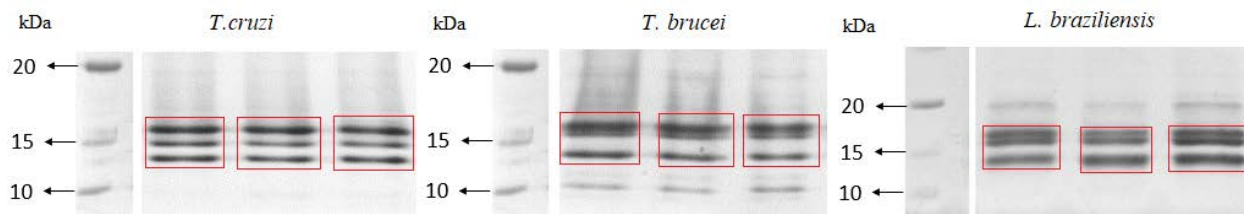
Fonte: O autor

Extratos proteicos enriquecidos em histonas (10 $\mu\text{g}$ ) de *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. brasiliensis* foram separados por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 15% e corados com Coomassie Blue. Como padrão de Mw, foi utilizado o Benchmark Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific). As canaletas 1, 2 e 3 representam triplicatas biológicas de cada experimento.

## 4.2. Caracterização de histonas e suas PTMs

Para todos os TriTryps, os experimentos da abordagem de GeLC-MS/MS com análise de bandas de histonas combinadas já foram finalizados. As bandas referentes ao tamanho esperado das histonas (Figura 6) foram excisadas do gel, combinadas, submetidas à propionilação de lisinas (não modificadas ou monometiladas), digeridas com tripsina e analisadas por LC-MS/MS. Os cromatogramas obtidos para as 3 réplicas biológicas de cada um dos TriTryps estão ilustrados na Figura 7. Para *T. cruzi* e *T. brucei*, podemos observar alguma picos diferentes, mas, no geral, o perfil cromatográfico está coerente entre as réplicas. Já a *L. braziliensis* apresenta perfil cromatográfico praticamente idêntico entre as amostras. A propionilação das histonas teve uma eficiência de 93,75%, tendo sido detectada em 60 das 64 lisinas propioniláveis (que não possuem PTMs biológicas ou são monometiladas) distribuídas nos três parasitas. Já a digestão das histonas gerou, em sua maioria, peptídeos sem *missed cleavages* (Tabela 2). No total, foram identificados somente 45 *protein groups* para *T. cruzi*, 55 para *T. brucei* e 52 para *L. Braziliensis*.

**Figura 6.** Bandas excisadas para preparo das amostras das abordagens de GeLC-MS/MS

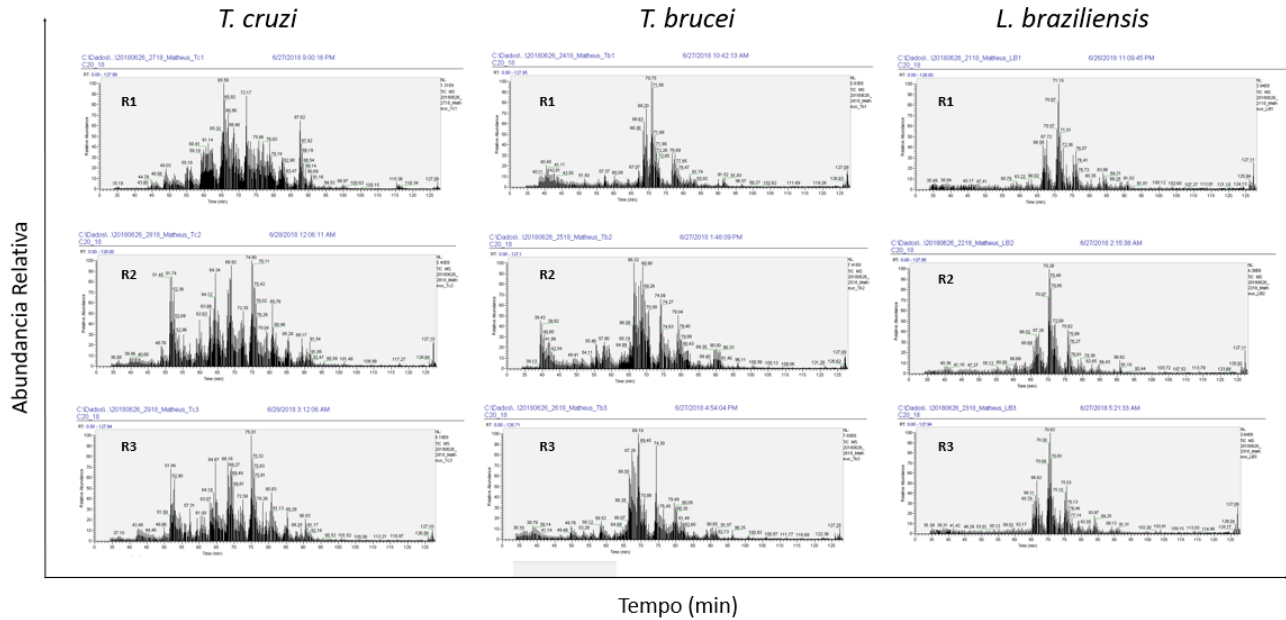


Fonte: O Autor

As bandas de histonas que estão destacadas pelo retângulo vermelho foram excisadas do gel e preparadas para análise em LC-MS/MS. Vale destacar que todo excesso de gel, tanto lateral, quanto entre as bandas foi retirado.



**Figura 7.** Imagem comparativa entre os cromatogramas das 3 réplicas de cada parasita provenientes da abordagem de GeLC-MS/MS com análise de bandas de histonas combinadas



Fonte: O autor

Separação cromatográfica *online* dos peptídeos provenientes de *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. braziliensis*, em triplicata.

**Tabela 2.** Número de *missed cleavages* contidas nos peptídeos identificados para as histonas dos TriTryps provenientes da abordagem de GeLC-MS/MS com análise de bandas de histonas combinadas.

	Amostras	0	1	2
<i>T. cruzi</i>	1	84	5	1
	2	87	7	1
	3	56	6	0
<i>T. brucei</i>	1	85	5	0
	2	77	9	0
	3	81	7	0
<i>L. braziliensis</i>	1	90	10	0
	2	90	10	0
	3	67	8	0

Após o processo de propionilação, as amostras foram digeridas em gel com tripsina, programada como se fosse Arg-C no momento das buscas, para compensar o processo prévio de bloqueio dos sítios de clivagem em lisina.

Combinando as análises realizadas até o momento, todas as histonas canônicas dos três parasitas (H2A, H2B, H3 e H4) foram encontradas, com porcentagens de cobertura entre 26 e 100% . Para as histonas variantes, foram encontradas H2A.z, H2B.v e H3.v para *T. cruzi*; H2B.V, H3.V e H4.V pra *T. brucei*; e H2B.V para *L. braziliensis* (Tabela 3).

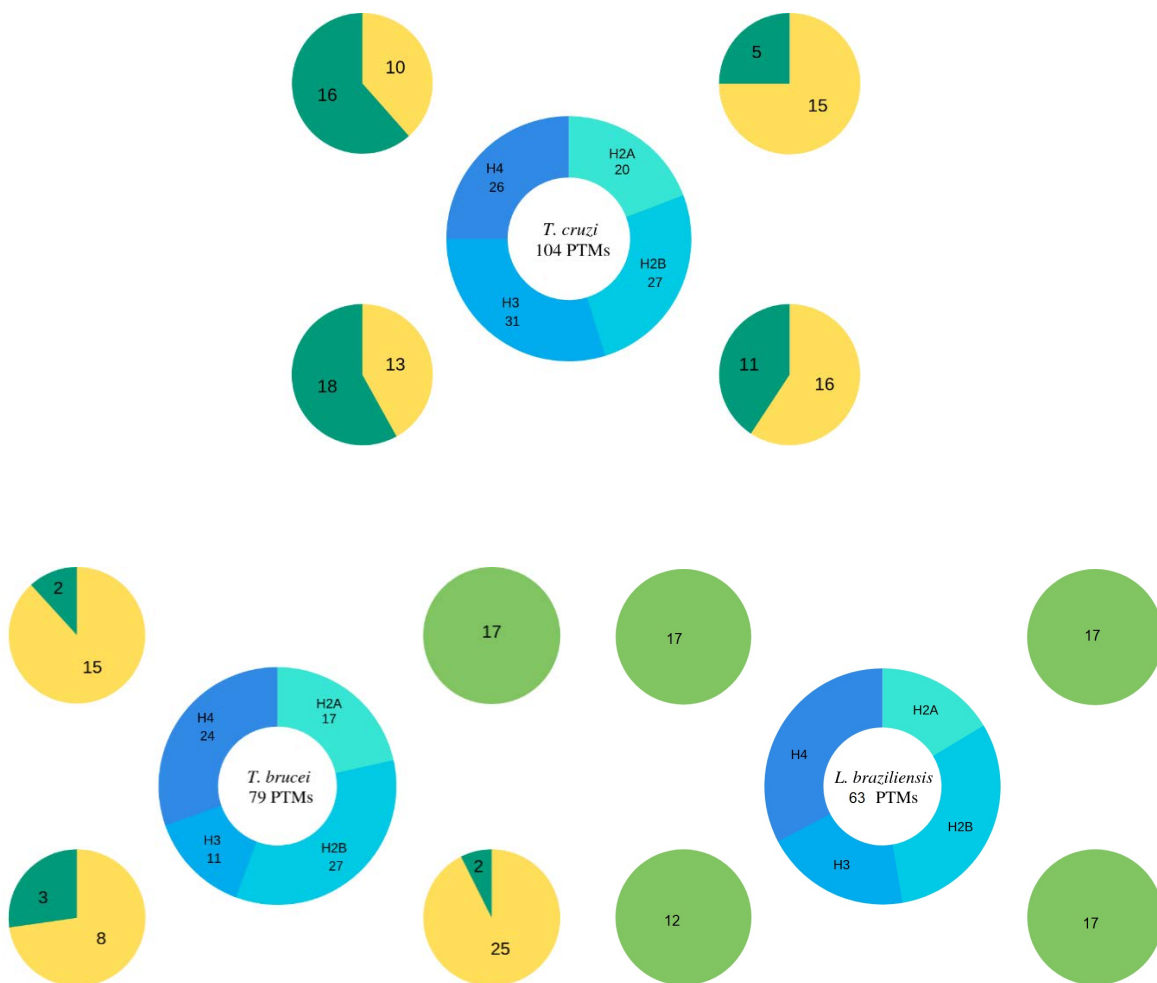
**Tabela 3.** Cobertura de seqüências das histonas canônicas e variantes encontradas para os TriTryps.

	<i>T. cruzi</i> (%)	<i>T. brucei</i> (%)	<i>L. braziliensis</i> (%)
H2A	38	26	40
H2B	100	83	77
H3	100	56	48
H4	76	67	62
H2A.Z	9		
H2B.V	32	29	56
H3.V	34	35	
H4.V		62	

### 4.3. Mapa Global de PTMs dos TriTryps

Para os três parasitas, nossa análise demonstrou a existência de uma variedade de tipos de PTMs de histonas, assim como grande número de sítios de modificação e marcas de PTMs, sendo várias dessas, descritas pela primeira vez (Figura 8). No total, até o momento no presente trabalho, foram identificados 12 tipos de PTMs diferentes, sendo 162 sítios e 246 PTMs, distribuídas nos TriTryps, sendo 136 PTMs ainda não descritas na literatura.

**Figura 8.** Visão geral do número de PTMs encontradas nos TriTryps no presente trabalho.



Fonte: O Autor

O valor ao meio dos gráficos representa o número total de PTMs de histonas encontrado para cada parasita no presente trabalho. Os valores em cada parcela representam a quantidade de PTMs descobertas em cada histona. Nos gráficos em pizza menores, o número de sítios novos está representado em amarelo e o número de sítios que já foram descritos na literatura está representado em verde.

### 4.3.1 Histonas Canônicas

#### 4.3.1.1. *Trypanosoma cruzi*

Para as 4 histonas canônicas de *T. cruzi*, foram encontrados 66 sítios de modificações e 104 PTMs no total, sendo elas de 12 diferentes tipos: monometilação, dimetilação, trimetilação, acetilação, fosforilação, citrulinação, hidroxilação, glutarilação, crotonilação, succinilação, 2-Hidroxi-butirilação e ubiquitinação. Das 104 PTMs encontradas, 54 são inéditas, contribuindo com o aumento do mapa global de PTMs em aproximadamente 30%. Além dessas, 2 sítios de formilação foram encontrados, no entanto, essa modificação pode ser causada pela presença de ácido fórmico nas fases móveis da cromatografia, e é necessária investigação adicional para confirmar a sua origem biológica.

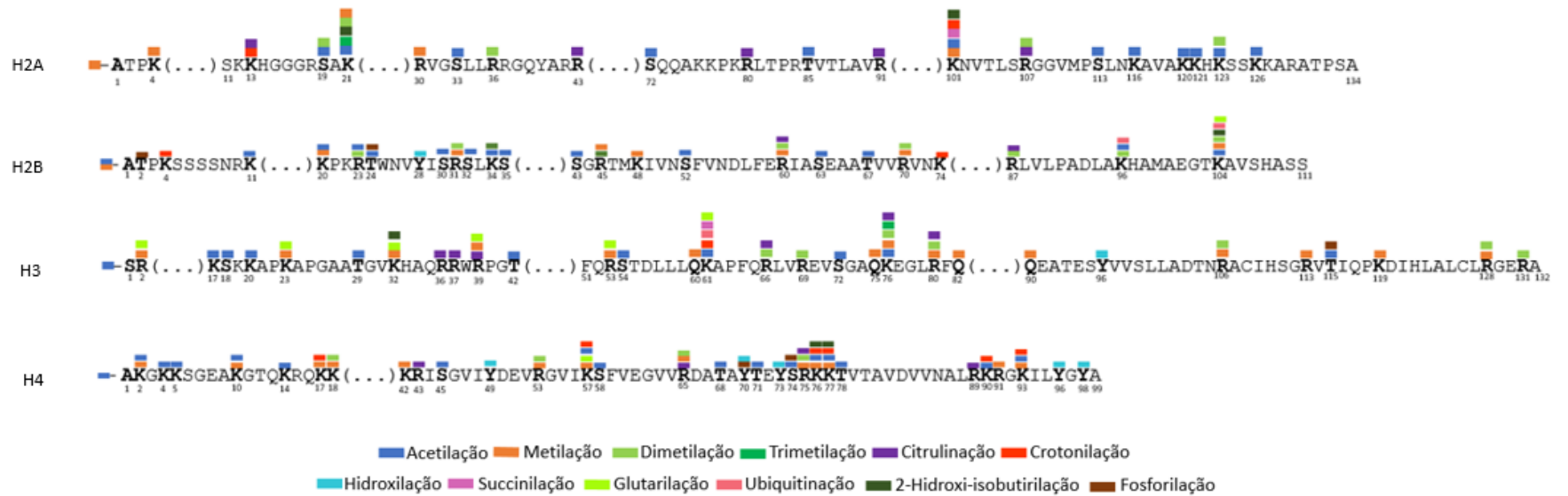
A Figura 9 mostra o resumo das modificações encontradas até agora neste trabalho. O estado atual do mapa de PTMs identificadas, contabilizando as identificadas neste trabalho e previamente descritas na literatura (no momento, apenas para as regiões da sequência cobertas no presente trabalho), está mostrado na Figura 10.

**Figura 9.** PTMs identificadas neste trabalho para as histonas canônicas de *T. cruzi*.



A figura compila todas as PTMs identificadas nesse trabalho, classificando as que já foram descritas na literatura em vermelho e as inéditas em verde; Me:Monometilação; Me2:Dimetilação; Me3:Trimetilação; Ac:Acetilação; Ph:fosforilação; Ci:Citrulinação; OH:Hidroxilação; Glu:Glutarilação; Cr:Crotonilação; Su: Succinilação; 2-Hi:2-Hidroxibutirilação; For:Formilação.

**Figura 10.** Mapa de Modificações pós-Traducionais das histonas canônicas de *T. cruzi*



Fonte: O Autor

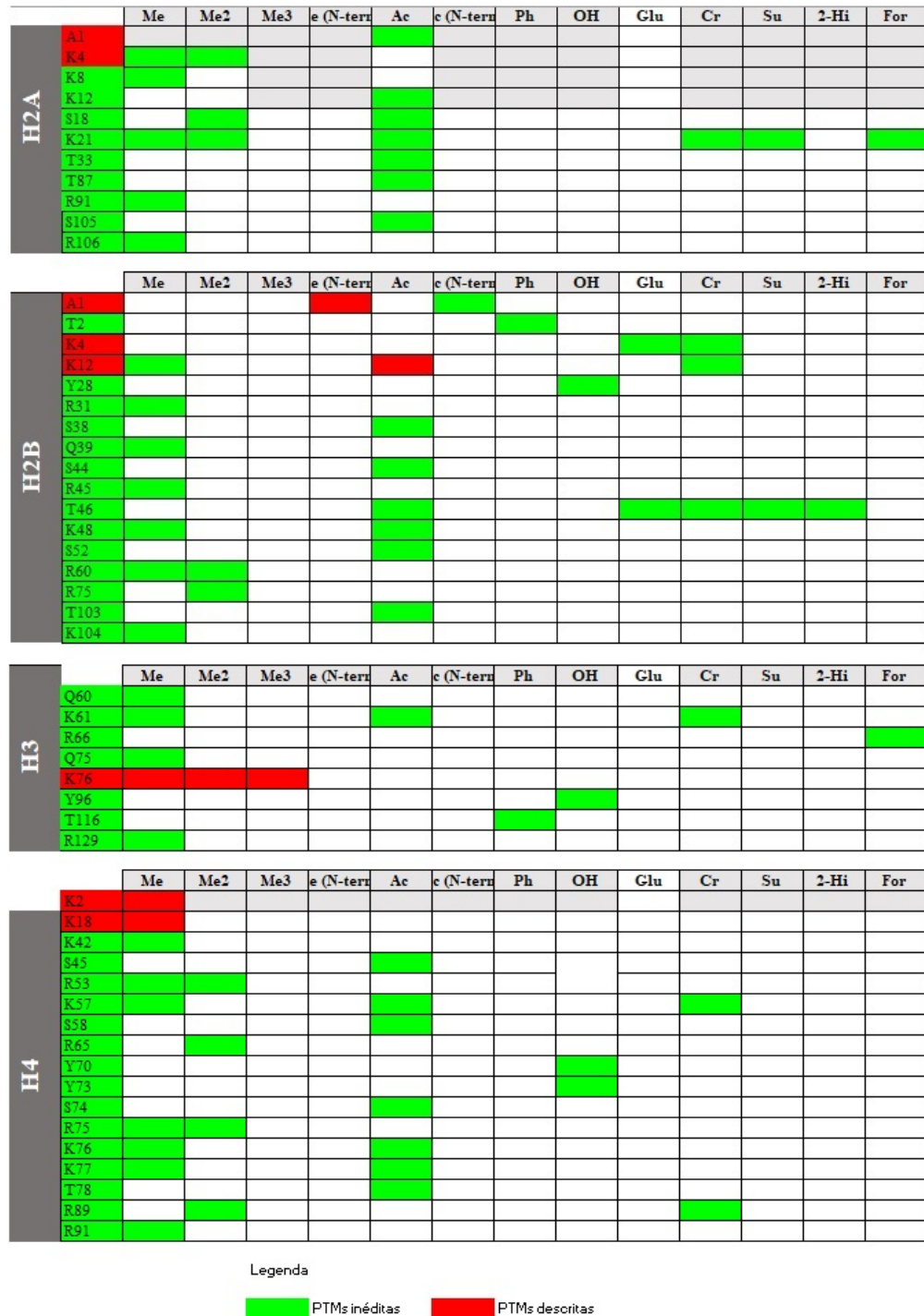
Modificações pós-traducionais identificadas nas histonas canônica de *T. cruzi*. É exibido o repertório de sítios de modificações identificados no presente trabalho juntamente com as informações contidas na literatura (no momento, apenas para regiões cobertas no presente trabalho) para essas regiões encontradas. Os números abaixo das sequências indicam a posição dos aminoácidos nas histonas de *T. cruzi* após a remoção da metionina inicial.

#### 4.3.1.2. *Trypanosoma brucei*

Para *T. brucei*, foram encontrados 53 sítios de modificações nas 4 histonas canônicas e 79 PTMs no total. Foram encontrados sítios de monometilação, dimetilação, trimetilação, acetilação, fosforilação, citrulinação, hidroxilação, glutarilação, crotonilação, succinilação e 2-Hidroxi-butirilação. Das 59 PTMs encontradas, apenas 4 estão descritas na literatura, representando um aumento de quase 3x no mapa geral de PTMs para *T. brucei*. Dentre as PTMs identificadas, estão 2 sítios de formilação que, como descrito acima foram desconsiderados nesse momento.

A Figura 11 mostra o resumo das modificações encontradas até agora neste trabalho. O estado atual do mapa de PTMs juntando as identificadas neste trabalho com os dados da literatura está mostrado na Figura 12.

**Figura 11.** PTMs identificadas neste trabalho para as histonas canônicas de *T. brucei*.



Fonte: O autor

A figura compila todas as PTMs identificadas nesse trabalho, classificando as que já foram descritas na literatura em vermelho e as inéditas em verde.; Me:Monometilação; Me2:Dimetilação; Me3:Trimetilação; Ac:Acetilação; Ph:fosforilação; Ci:Citrulinação;OH:Hidroxilação; Glu:Glutarilação; Cr:Crotonilação; Su: Succinilação; 2-Hi:2-Hidroxibutirilação; For:Formilação.



**Figura 12.** Mapa de Modificações pós-Traducionais das histonas canônicas de *T. brucei*



Fonte: O Autor

Modificações pós-traducionais identificadas nas histonas canônicas de *T. brucei*. É exibido o repertório de sítios de modificações identificados no presente trabalho juntamente com as informações contidas na literatura (no momento, apenas para regiões cobertas no presente trabalho). Os números abaixo das sequências indicam a posição dos aminoácidos nas histonas de *T. brucei* após a remoção da metionina inicial

#### 4.3.1.3. *Leishmania braziliensis*

Para *L. braziliensis*, foram encontrados 45 sítios de modificações nas 4 histonas canônicas e 63 PTMs no total. Como não existe nenhum mapa descrito ainda para esse parasita, todos os sítios e PTMs encontrados são novos. Foram encontrados sítios de monometilação, dimetilação, trimetilação, acetilação, hidroxilação, crotonilação. Para *Leishmania* não existem estudos em larga escala, somente algumas predições em sítios específico (JHA et al., 2017; KUMAR et al., 2012; THOMAS et al., 2009), assim, todos os sítios encontrados no trabalho são novos. 1 sítio de formilação foi encontrado para *L. braziliensis*. A Figura 13 mostra o resumo das modificações encontradas até agora neste trabalho. O estado atual do mapa de PTMs identificadas neste trabalho juntando com os dados da literatura está mostrado na Figura 14.

**Figura 13.** PTMs identificadas neste trabalho para as histonas canônicas de *L. braziliensis*.

		Me	Me2	Me3	Ac	OH	Glu	Cr	For
H2A	K12								
	R16								
	S17								
	K19								
	K99								
	S100								
	R105								
H2B	S3								
	R4								
	K9								
	Y27								
	S29								
	R30								
	S31								
	K33								
	Y52								
	T54								
	R59								
	S66								
	R69								
R110									
H3	Q57								
	Q72								
	K73								
	R77								
	T112								
	Q114								
	K116								
	Q119								
	R123								
H4	S6								
	K10								
	S12								
	K14								
	R15								
	R53								
	K57								
	Y60								
	R65								
	K76								
	K77								
	T78								
R89									

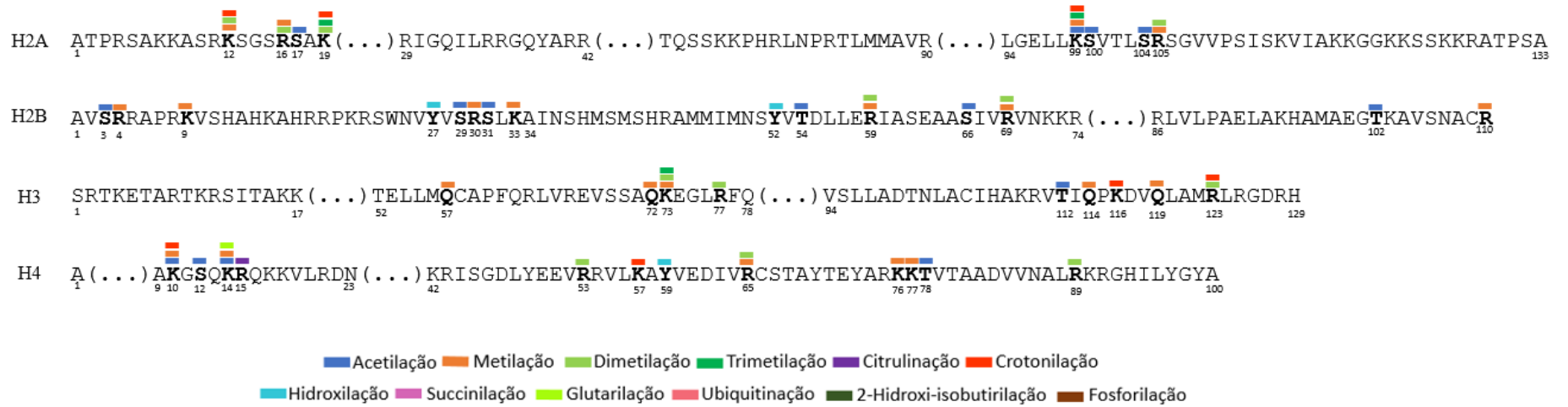
Legenda

PTMs inéditas

Fonte: O autor

A figura compila todas as PTMs identificadas nesse trabalho. Me:Monometilação; Me2:Dimetilação; Me3:Trimetilação; Ac:Acetilação; OH:Hidroxilação; Glu:Glutarilação; Cr:Crotonilação; For:Formilação

**Figura 14.** Mapa de Modificações pós-Traducionais das histonas canônicas de *L. braziliensis*



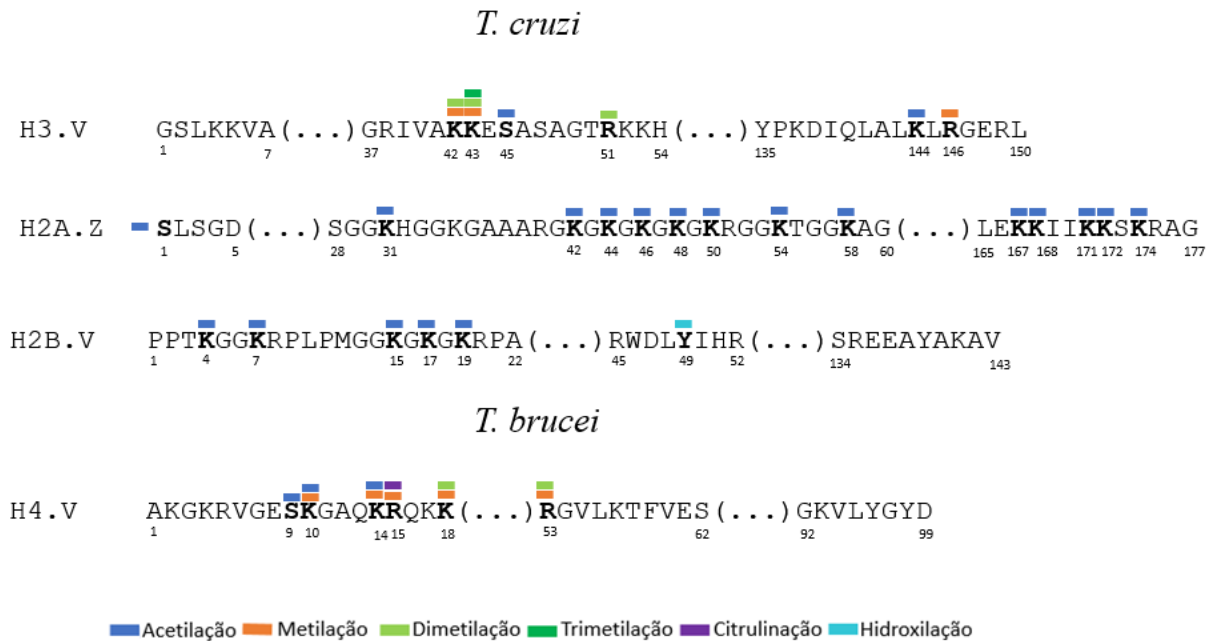
Fonte: O Autor

É exibido o repertório de sítios de modificações identificados no presente trabalho. Os números abaixo das sequências indicam a posição dos aminoácidos nas histonas de *L. braziliensis* após a remoção da metionina inicial.

### 4.3.2. Histonas Variantes

Além das histonas canônicas, identificamos também algumas histonas variantes dos TriTryps. Apenas a H3.v de *T. cruzi* e H4.v de *T. brucei* foram encontradas com sítios de modificações (Figura 15).

**Figura 15.** Mapa de Modificações pós-Traducionais de Histonas Variantes



Fonte: O Autor

Contextualização das modificações pós-traducionais das histonas variantes de *T. cruzi* e de *T. brucei*. É exibido o repertório de sítios de modificações identificados no presente trabalho juntamente com as informações contidas na literatura (no momento, apenas para regiões cobertas no presente trabalho) em *T. cruzi*. Para *T. brucei*, não existem trabalhos PTMs de histonas variantes. Os números abaixo das sequências indicam a posição dos aminoácidos após a remoção da metionina inicial.

Foram identificados, no presente trabalho, 5 sítios e 5 PTMs para a H3.v de *T. cruzi* sendo K42me, K43me, R51me2, K144ac e R146me. Para a H4.v foram identificadas 6 sítios e 11 PTMs sendo S9ac, K10me/ac, K14me/ac, R15me/ci, K18me/me2 e R53me/me2 (Figura 16).

**Figura 16.** PTMs identificadas neste trabalho para as histonas variantes.

		<i>T. cruzi</i>			
		Me	Me2	Ac	Ci
H3.V	K42				
	K43				
	R51				
	K144				
	R146				

		<i>T. brucei</i>			
		Me	Me2	Ac	Ci
H4.V	S9				
	K10				
	K14				
	R15				
	K18				
	R53				

Legenda

	Descrito somente nesse trabalho
	Descrito nesse trabalho e na literatura

Fonte: O autor

A figura compila todas as PTMs identificadas nesse trabalho, classificando as que já foram descritas na literatura em vermelho e as inéditas em verde.; Me:Monometilação; Me2:Dimetilação; Ac:Acetilação; Ci:Citrulinação.

#### 4.4. Padrões combinatoriais de PTMs presentes nas histonas dos TriTryps

Uma grande parte dos sítios de PTM identificados apresentou mais de um tipo de modificação. Além disso, diferentes padrões combinatoriais de PTMs foram encontrados em peptídeos individuais (Figura 17). A lista completa dos peptídeos diferencialmente modificados está contida no Anexo 1.

**Figura 17.** Exemplos de padrões de regulação sítio específico em histonas dos TriTryps



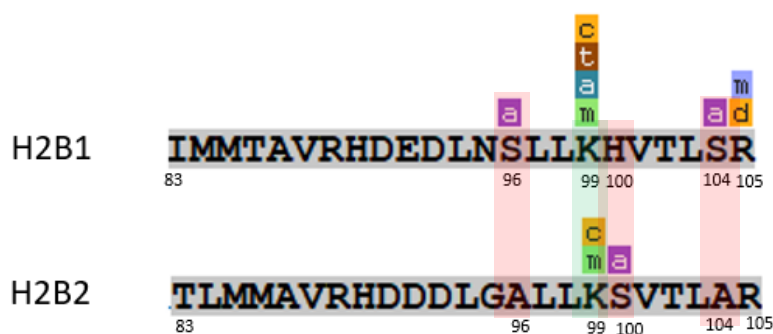
Fonte: O autor

Exemplo de padrões de PTMs identificadas para H4 de *T. brucei*, H2A de *L. braziliensis* e H2B de *T. cruzi*. As seqüências do modelo são mostradas sublinhadas em cinza, os peptídeos identificados são mostrados em azul e os PTMs são indicados nos retângulos coloridos. a: acetilação; m: metilação; d: dimetilação; t: trimetilação; c: crotonilação; h: hidroxilação.

#### 4.5. Expressão de isoformas diferencialmente modificadas das histonas dos TriTryps

Isoformas de histonas diferencialmente modificadas foram detectadas para todos os TriTryps. Dentre elas, uma que se destacou e servirá aqui como exemplo é a histona H2B de *L. braziliensis* (Figura 18). A lista completa dos peptídeos diferencialmente modificados para cada isoforma de histona está contida no Anexo 1.

**Figura 18.** Isoformas diferencialmente modificadas da histona H2B de *L. braziliensis*



Fonte: O autor

Demonstração de peptídeo alternativo para histona H2B de *L. braziliensis*. Destacados em vermelho: substituição de aa que gerou um sítio de modificação; destacado em verde: sítio conservado que possui modificações diferentes. A: acetilação; m: metilação; d: dimetilação; t: trimetilação; c: crotonilação

As duas isoformas do exemplo foram identificadas como H2B1 e H2B2, para uma melhor compreensão. Podemos observar que a isoformas H2B1 possui S96ac e S104ac, que são sítios de modificações únicos, já que na mesma posição de H2B2 esses sítios foram substituídos por alaninas, as quais não são modificadas. Do mesmo modo, S100ac da H2B2 é um sítio único já que na mesma posição da H2B1 esse sítio foi substituído por uma histidina, para a qual não foi identificada nenhuma modificação. Além disso, é visto que apesar do sítio K99 ser conservado entre as isoformas, há uma diferença quanto às PTMs, já que na H2B1 temos acetilação, metilação (mono- e tri-) e crotonilação e na H2B2 temos só monometilação e crotonilação.



## 4.6. Comparação do perfil de PTMs de histonas entre os TriTryps

Na caracterização comparativa entre as PTMs de histonas nos TriTryps temos 3 situações, que são: sítios conservados nos 3 parasitas, sítios conservados em 2 parasitas e sítios exclusivos de um dos parasitas. Dentre os sítios conservados, podem haver também modificações que estão conservadas e modificações diferentes. Dentre os sítios exclusivos, existem aqueles que foram mudados no decorrer da evolução, representando substituições de amino ácidos, e também sítios onde o aminoácido é conservado entre dois ou todos os TriTryps, mas encontra-se modificado em apenas um deles.

Como foco do nosso grupo é o *T. cruzi*, a posição utilizada para descrever os sítios no texto será dele, e para os outros Tryps, os sítios correspondentes serão demonstrados nas figuras.

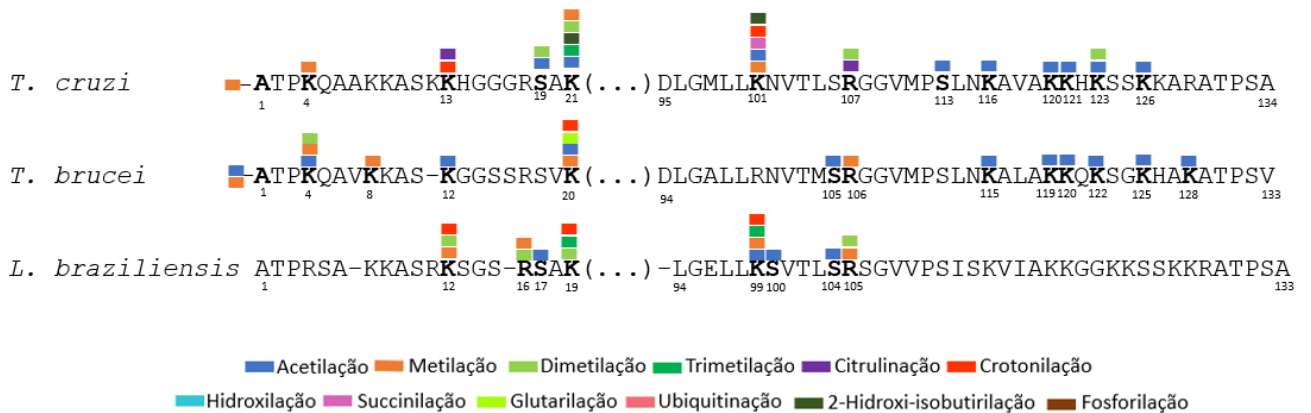
### 4.6.1. H2A

A histona H2A (Figura 19) foi a que teve a menor cobertura de sequência. A metionina inicial é removida pelo processamento da proteína e a alanina subsequente é modificada, como descrito anteriormente para *T. brucei* (JANZEN et al., 2006) e *T. cruzi* (PICCHI et al., 2017). Para *L. braziliensis* não conseguimos confirmar esse fato. Foram identificadas 9 tipos de PTMs diferentes distribuídas pelos TriTryps. Para *T. cruzi* foram encontradas as modificações metilação (mono-, di- e tri-), acetilação, 2-hidroxitirilação, crotonilação, succinilação e ubiquitinação. No total foram encontrados 8 sítios de modificações para 20 PTMs sendo dessas, 15 PTMs que não foram previamente descritos. Já para *T. brucei*, foram encontradas as modificações acetilação, metilação (mono- e di-), crotonilação e succinilação. No total, foram encontrados 11 sítios de modificações para 17 PTMs, sendo todas descritas pela primeira vez. Para *L. Braziliensis*, foram encontradas as modificações metilação (mono-, di- e tri-), acetilação e crotonilação. No total, foram encontrados 8 sítios de modificações para 17 PTMs, todos descritos pela primeira vez.

Conseguimos identificar 3 sítios conservados nos 3 organismos, que são: K13, K21 e R 107. Alguns sítios são compartilhados entre 2 dos 3 organismos, como: S19, para *T. cruzi* e *L. braziliensis*; e S106 para *T. bucei* e *L. braziliensis*. Identificamos 2 sítios específicos para *L. braziliensis* na posição R16 e S100; já para *T. cruzi* identificamos o sítio S113. Um padrão de acetilação C-terminal bem conservado nas posições K116, K120, K121, K123 e K126 foi

identificado em *T. cruzi* e *T. brucei*, apesar de não ter coberto essa parte da sequência para *L. braziliensis*, provavelmente apresentará um padrão parecido. Embora grande parte dos sítios encontrados sejam compartilhados entre os TriTryps, as PTMs que são encontradas neles podem ser diferentes, devido a dinâmica que essas modificações possuem.

**Figura 19.** Mapa comparativo da histona H2A de *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. braziliensis*



Fonte: O autor

Mapa que compila as PTMs da histona H2A encontradas no trabalho, juntamente com as que já estavam descritas na literatura para a região coberta.

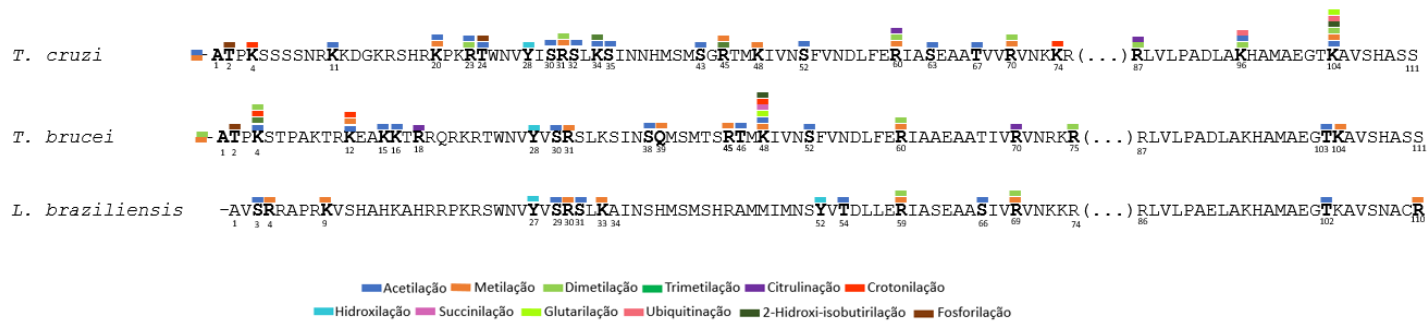
#### 4.6.2 H2B

A histona **H2B** foi a que teve a maior cobertura de sequência em *T. brucei* e *L. braziliensis*, e em *T. cruzi* ficou em 100% junto com H3. Com a retirada da metionina inicial, identificamos a primeira alanina de *T. cruzi* metilada como já descrito em Picchi et al., 2017 e também encontramos acetilada; em *T. brucei* identificamos ela monometilada como descrita em Mandava et al., 2007, como também acetilada. Na histona H2B (Figura 20) foram identificadas 9 tipos de PTMs diferentes distribuídas pelos TriTryps. Para *T. cruzi* foram encontradas as modificações metilação (mono-, di-), acetilação, crotonilação, hidroxilação, fosforilação e citrulinação. No total foram encontrados 21 sítios de modificações para 27 PTMs, sendo 16 novas. Já para *T. brucei* foram encontradas as modificações acetilação, metilação (mono-, di-), crotonilação, glutarilação, succinilação, hidroxilação e 2-Hidroxi-butirilação. No total foram encontrados 17 sítios de modificações para 27 PTMs, sendo 25 novas. Para *L. braziliensis* foram encontradas as

modificações metilação (mono- e di-), acetilação, e hidroxilação. No total foram encontrados 15 sítios de modificações para 17 PTMs.

Conseguimos identificar 5 sítios conservados nos 3 organismos que são: Y28, S30, R31, R60 e R70. Os sítios que são compartilhados com apenas 2 dos 3 organismos são: S32 e K34 para *T. cruzi* e *L. braziliensis*; para *T. bucei* e *L. braziliensis* temos o sítio T103; para *T. cruzi* e *T. brucei* identificamos A1, T2, K4, R45, K48, S52 e K104. Alguns sítios específicos também foram identificados para *T. cruzi* em K11, K20, R23, T24, S35, S43, S63, T67, K74, R87 e K96. Esse grande número de sítios específicos pode ser devido ao fato de ter cobrido 100% da sequencia para esta histona em *T. cruzi*, enquanto nos demais parasitas não. Em *T. brucei* os sítios exclusivos foram K12, K15, K16, R18, S38, Q39 e R75; em *L. braziliensis* foram encontrados em R4, K9, Y52, T54, S66 e R110.

**Figura 20.** Mapa comparativo da histona H2B de *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. braziliensis*.



Fonte: O autor

Mapa que compila as PTMs da histona H2A encontradas no trabalho, juntamente com as que já estavam descritas na literatura para a região coberta.

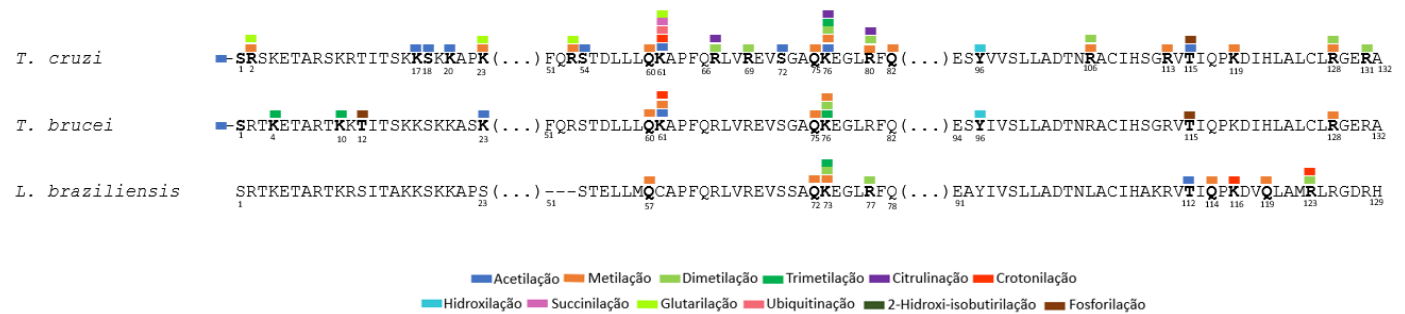
### 4.6.3. H3

A histona H3 teve a remoção da metionina inicial em *T. cruzi* confirmada nesse trabalho, estando a serina N-terminal acetilada, como foi descrita em *T. brucei* (MANDAVA et al., 2007). Na histona H3 (Figura 21) foram identificadas 9 tipos de PTMs diferentes distribuídas pelos TriTryps. Para *T. cruzi* foram encontradas as modificações metilação (mono-, -di e tri-), acetilação, fosforilação e citrulinação. No total foram encontrados 21 sítios de modificações para 31 PTMs, sendo 13 novas. Já para *T. brucei* foram encontradas as modificações acetilação,

metilação (mono, -di e tri-), hidroxilação, fosforilação e crotonilação. No total foram encontrados 8 sítios de modificações para 11 PTMs, sendo 8 novas. Para *L. braziliensis* foram encontradas as modificações metilação (mono- e di-, tri), acetilação e crotonilação. No total foram encontrados 9 sítios de modificações para 11 PTMs.

Conseguimos identificar 4 sítios conservados nos 3 organismos que são: Q60, Q75, K76 e T115. Os sítios que são compartilhados com apenas 2 dos 3 organismos são: R80 e K119 para *T. cruzi* e *L. braziliensis*; para *T. cruzi* e *T. brucei* identificamos S1, K23, K61, Y96, R128. Alguns sítios específicos também foram identificados para *T. cruzi* nas posições R2, K17, S18, K20, R53, S54, R66, R69, S72, Q82, R106, R113 e R131. Como na H2B, a H3 de *T. cruzi* foi coberta em 100% de sequencia e devido a isso aprendeu, por hora, um grande número de sítios exclusivos. Em *T. brucei* identificamos K4, K10 e T12 e por ultimo *L. braziliensis* foram encontrados em Q114, Q119 e R123.

**Figura 21.** Mapa comparativo da histona H3 de *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. braziliensis*.



Fonte: O autor

Mapa que compila as PTMs da histona H2A encontradas no trabalho, juntamente com as que já estavam descritas na literatura para a região coberta.

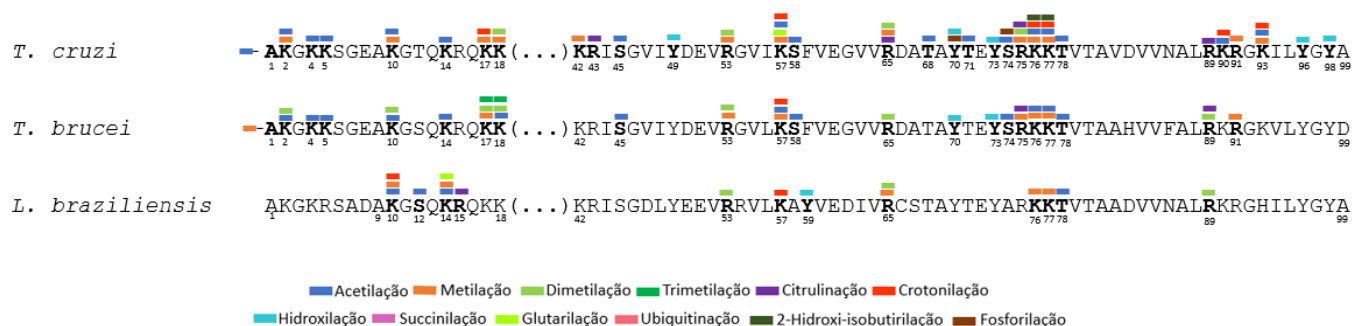
#### 4.6.4. H4

A histona H4 (Figura 22) foi a que teve o maior índice de conservação. Foi identificado 6 tipos de PTMs diferentes distribuídas pelos TriTryps. Para *T. cruzi*, foram encontradas as modificações metilação (mono-, di-), acetilação, crotonilação e hidroxilação. No total foram encontrados 16 sítios de modificações para 26 PTMs, sendo 10 novas. Já para *T. brucei* foram encontradas as modificações metilação (mono-, di-), acetilação, crotonilação e hidroxilação. No

total foram encontrados 17 sítios de modificações para 24 PTMs, sendo 22 novas. Para *L. braziliensis* foram encontradas as modificações metilação (mono-, di-), acetilação e hidroxilação. No total foram encontrados 13 sítios de modificações para 18 PTMs.

Conseguimos identificar 9 sítios conservados nos 3 organismos que são: K10, K14, R55, K57, R65, K76, K77, T78 e R89. Os sítios que são compartilhados com apenas 2 dos 3 organismos são; para *T. cruzi* e *T. brucei* identificamos A1, K2, K4, K5, K17, K18, S45, S58, Y70, Y73, S74, R75 e R91. Os sítios exclusivos para *T. cruzi* estão nas posições K42, R43, Y49, T68, T71, K90, K93, Y96 e Y98, e foram identificados para *L. braziliensis* na posição S12, R15, Y59. Possivelmente mais sítios são conservados entre os 3 parasitas, contudo não foi possível identificar pela falta de cobertura das sequencias.

**Figura 22.** Mapa comparativo da histona H4 de *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. braziliensis*.



Fonte: O autor

Mapa que compila as PTMs da histona H2A encontradas no trabalho, juntamente com as que já estavam descritas na literatura para a região coberta.

#### 4.7 Comparação de PTMs de histonas entre os TriTryps e humanos

Além dos sítios conservados entre os TriTryps, também encontramos sítios conservados entre esses organismos e eucariotos superiores. A compilação completa dos sítios modificados para eucariotos superiores e suas implicações biológicas excede, em muito, o escopo do presente projeto. No entanto, como exemplos, podemos citar alguns sítios conservados com *H. Sapiens*, os quais foram relacionados com o remodelamento de nucleossomos humanos (Tabela 4).

**Tabela 4.** Conservações entre as PTMs de Humanos e TriTryps

	<i>H. sapiens</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>T. brucei</i>	<i>L. braziliensis</i>	Efeitos Intrinsicos	Fatores de Cromatina Influenciados
<b>H3</b>	K4me3		K4me3		Nenhum	Recruta remodelador Chd1; exclui remodeladores NuRD e ATRX
	K14ac K18ac K23ac	K17ac S18ac K20ac			Sítio de desenovelamento	Recruta remodeladores SWI/SNF, RSC
	K64me3/ac	K61ac	K61ac		Desestabilização nucleossomal	
	T118ph	T115ph	T115ph	T112ph	Desestabilização nucleossomal	Estimula desmontagem pela SWI / SNF
<b>H4</b>	K16ac	K14ac	K14ac	K14ac	Desestabilização da fibra de Cromatina	Reduz atividade de Chd1 e ISWI
	K79ac	K77ac	K77ac		Sítio de desenovelamento	
<b>H2B</b>	K120ub	K96/104ub			Desestabilização da fibra de Cromatina	Auxilia a chaperona de histona FACT

(BOWMAN; POIRIER, 2015)

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Dados experimentais

Para todos os TriTryps, os experimentos finalizados, da abordagem de GeLC-MS/MS com análise de bandas de histonas combinadas, apresentaram, de maneira geral, qualidade técnica bastante satisfatória. Os cromatogramas obtidos (Figura 7) tiveram um sinal suficientemente bom e reprodutível. O enriquecimento dos extratos proteicos demonstrou ser eficiente. Primeiro, pois bandas enriquecidas correspondentes às histonas puderam ser observadas na região de massa esperada do gel, as quais tiveram sua identidade confirmada posteriormente por espectrometria de massas. Segundo, pois poucas proteínas no total foram identificadas em cada busca nos bancos de dados completos de cada parasita, confirmando o enriquecimento em histonas visualizado nos géis. A propionilação das lisinas não modificadas e monometiladas teve uma eficiência de aproximadamente 94%, e a baixa ocorrência de peptídeos contendo *missed cleavages* indicou que a tripsina teve uma boa performance durante a reação.

### 5.2. Os perfis de PTMs de histonas são abundantes e variados em todos os TriTryps

Nos resultados obtidos através destas análises, foi possível observar que todas as histonas identificadas nos 3 parasitas possuem uma variedade de tipos de PTMs distribuídas em um grande número de sítios, que estão presentes tanto nas regiões de caudas como nas regiões globulares das histonas, como descrito em outros eucariotos. Já foram descritos 13 tipos de PTMs para *T. cruzi* (PICCHI et al., 2017) das 20 identificadas para humanos. Neste estudo, identificamos 11 tipos diferentes para *T. cruzi*, 10 para *T. brucei* e 7 para *L. braziliensis*, sendo todos descritos na literatura anteriormente para *T. cruzi*. Inclusive, foi identificado nos TriTryps uma rara metilação de glutamina descrita para humanos, localizada H2AQ104 (TESSARZ et al., 2014), porém na histona H3. Essa variedade e abundância de PTMs nos sugere que os TriTryps são capazes de modular essas modificações a fim de alcançar diferentes estados de cromatina, levando a uma possível regulação epigenética.

### 5.3. Conservação dos sítios e abundancia de PTMs sugerem uma possível regulação epigenética

Na literatura alguns trabalhos já confirmaram a retirada da metionina inicial seguido de modificação do próximo aminoácido para *T. brucei* e *T. cruzi* (JANZEN et al., 2006; MANDAVA et al., 2007; PICCHI et al., 2017), no presente estudo identificamos alguns N-terminais, todos sem a metionina inicial mas nem todos com o próximo aminoácido modificado. Em *T. cruzi* foi encontrado os N-terminais das histonas H2B e H3, ambas modificados no aminoácido seguinte. Para *T. brucei* foi identificado para as histonas H2A e H2B com o primeiro aminoácido modificado e a histona H4 não modificada. E para *L. braziliensis* foi identificado somente para a histona H2B não modificado.

Na histona H2A vemos que alguns sítios de modificações, aparentam ser bem dinâmicos sugerindo algum tipo de regulação. Podemos ver isso, na lisina 21 para *T. cruzi* que corresponde a posição 20 para *T. brucei* e 19 para *L. braziliensis*. Foi observado um possível padrão regulatório de modificações que apresentam características tanto ativadoras como repressoras de transcrição. Para *T. cruzi* ela foi encontrada modificada por acetilação, 2-hidroxitirilação e metilação (mono-, di- e tri-). Para *T. brucei* a acetilação e metilação (mono- e di-) se manteve com adição de succinilação e crotonilação. Para *L. braziliensis* foram encontrados sítios de metilação (di- e tri-) e crotonilação. Do mesmo modo a lisina 101 que em *T. cruzi* foi encontrada com metilação, acetilação, crotonilação e 2-hidroxitirilação, que corresponde a posição 99 em *L. braziliensis* encontrada acetilação, metilação (mono-, tri-) e crotonilação. Essas modificações foram descritas para *T. cruzi* previamente (PICCHI et al., 2017). Um padrão de acetilação pode ser observado no C-terminal, tanto de *T. cruzi* quanto *T. brucei* (MANDAVA et al., 2007; PICCHI et al., 2017), o mesmo padrão possivelmente deve ser observado em *L. braziliensis*, mas por hora, não conseguimos cobrir esta região.

O sítio K76 da histona H3, é alvo da metiltransferase DOT1 em *T. brucei* (JANZEN et al., 2006), foi encontrado mono-, di- ou tri-metilado na maioria dos peptídeos identificados para *T. brucei*, já em *T. cruzi* ele é encontrado metilado (mono-, -di e tri-), acetilado e citrulinado. O sítio corresponde para *L. braziliensis* é a K73 também encontrada com esse padrão metilações (mono-, di- e tri). Como demonstrado em um estudo prévio, essas modificações estão sendo reguladas diferencialmente: a mono- e a dimetilação do H3K76 são mais abundantes nas formas replicativas



do *T. cruzi*, sendo a monometilação de K76 apenas detectada durante a mitose, enquanto a dimetilação está presente durante a mitose e citocinese e o K76me3 é expresso em todos os contextos analisados (DE JESUS et al., 2016). Isso é semelhante ao que foi relatado para *T. brucei*, para o qual o grau de H3K76me3 está presente em todo o ciclo celular, enquanto o H3K76me2 é um regulador chave da progressão do ciclo celular (JANZEN et al., 2006b; MANDAVA et al., 2007). Uma monometilação de glutamina exclusiva da histona H3 também foi encontrada nos três parasitos. Essa modificação foi descrita anteriormente na literatura (PICCHI et al., 2017b).

Estudos prévios, demonstraram que em *T. cruzi*, H4K10ac e H4K14ac são necessários para a montagem / remodelamento da cromatina durante a transcrição e replicação (DE JESUS et al., 2016; RAMOS et al., 2015). Da mesma forma, em *T. brucei*, H4K10ac é concentrado em prováveis locais de iniciação da transcrição. (KAWAHARA et al., 2008). Além disso, após exposição para a radiação  $\gamma$ , observa-se um aumento nos níveis de H4K10ac / H4K14ac e uma diminuição de H4K4ac, indicando sua associação com a resposta a danos no DNA (NARDELLI et al., 2009). Podemos observar esses sítios, também em *L. braziliensis* sugerindo um papel semelhante no mecanismo molecular desse parasita. Outras regiões como R75, K76 e K77 que sugerem um importante papel na regulação da cromatina, por possuírem diversos substratos para modificações, descritas em *T. cruzi*, foram encontrados para *T. brucei* e *L. braziliensis*, mas até agora, com menor número de modificações.

#### **5.4. Padrões distintos de modificações, isoformas diferencialmente modificadas e histonas variantes com sítios de PTMs elevam a complexidade da cromatina**

O envolvimento do DNA ao redor do octâmero de histonas *per se* possui uma característica inibitória e impede a junção de outras proteínas de ligação ao DNA. A formação do nucleossomo é estável quando ligado ao DNA, e em sua estrutura cristalizada ele se dispõe totalmente envolto ao DNA (LUGER et al., 1997). Contudo, alguns estudos feitos por Polach e Widom usando enzimas de restrição, demonstraram que são uma pequena fração de contatos DNA-histona que mantem a estabilidade do nucleossomo. Assim, existe duas formas de alterar a constante de equilíbrio que mantem o nucleossomo estável. Primeiro, a substituição das histonas canônicas pelas variantes, que alteram a natureza química do nucleossomo e com isso modificam as múltiplas interações histona-DNA e histona-histona simultaneamente (TALBERT; HENIKOFF,

2010). Assim, a adição de PTMs modulam ainda mais os efeitos que as histonas variantes tem sobre a dinâmica dos nucleossomos (LOYOLA, 2007). Outro fator que leva a instabilidade do DNA é a adição de PTMs em sítios específicos, que são capazes de modular as dinâmicas nucleossomais (COSGROVE; BOEKE; WOLBERGER, 2004; MER SFELDER; PARTHUN, 2006). No presente estudo, além de encontrarmos algumas histonas variantes, identificamos ela com sítios de modificações, potencializando sua função em auxiliar a cromatina atingir diferentes estados organizacionais.

Além de influenciar diretamente a estrutura dos nucleossomos através da mudança química natural do complexo, as PTMs também desempenham um importante papel no remodelamento da cromatina por meio do recrutamento de proteínas remodeladoras de cromatina, que estão ligados a ações como: reorganização nucleossomal, montagem e desmontagem dos nucleossomos, troca das histonas canônicas pelas variantes e reposicionamento do octâmero de histonas (BARTHOLOMEW, 2014; NARLIKAR; SUNDARAMOORTHY; OWEN-HUGHES, 2013). A ocorrência de padrões distintos de PTMs em moléculas histonas (Figura 9) sugere, como em eucariotos superiores, que os TriTryps são capazes de regular modificações de histonas de forma combinatória para estabelecer estados da cromatina distintos, seja influenciando diretamente ou pelo recrutamento de parceiros de interação, permitindo uma possível existência de um sofisticado código de histonas em tripanossomatídeos. Isso fica ainda mais evidente quando levamos em consideração os tipos e número de PTMs identificados nas histonas nos TriTryps, que conduz a uma remodelação da cromatina dinâmica semelhante a outros eucariotos. Dependendo do tipo de sinal celular, um conjunto de “escritores epigenéticos” transferem grupos químicos para histonas, enquanto um conjunto de “apagadores epigenéticos” removem grupos químicos de tal maneira que o cenário apropriado de PTMs é entendido por “leitores epigenéticos” que desempenhar suas funções.

No genoma dos TriTryps, cada histona apresenta várias cópias de genes que são expressos em tandem. Estudos anteriores de nosso grupo em *T. cruzi* identificaram peptídeos alternativos contendo substituições, o que levou a evidências experimentais para a expressão de isoformas de proteínas nas histonas H2A, H2B e H4. Curiosamente, alguns desses peptídeos alternativos apresentaram PTMs únicas para as isoformas de histona H2A (K121me3, K101me2, K120hib) e H4 (Y49ph, K42me2, K43me2 e K58me2), que não foram detectadas em suas contrapartes do

modelo. (PICCHI et al., 2017). Esse nível de regulação, até presente momento, não havia sido descrito na literatura para os demais tripanossomatídeos.

Essas isoformas podem elevar ainda mais o nível da complexidade da regulação epigenética nos TriTryps. Levando em consideração que qualquer mutação não-sinônima pode desencadear uma desorganização nos nucleossomos e alterar as funcionalidades das histonas, podendo gerar doenças humanas (SINGH et al., 2013, 2015), qualquer modificação na sequência de aminoácido, por mais discreta, é igualmente importante biologicamente. Portanto, a presença de isoformas de histonas ligeiramente divergentes com marcas de PTMs únicas adiciona uma camada extra de regulação e expande significativamente a complexidade da estrutura da cromatina e controle epigenético nos TriTryps, contudo pesquisas futuras ainda precisam responder sua verdadeira relevância biológica.

## 5.5. Existem Algumas Conservações com o Perfil de PTMs de Humanos

Já foi visto em humanos e alguns fungos que algumas modificações estimulam mudanças dinâmicas na estrutura dos nucleossomos (Tabela 4). Essas modificações são encontradas tanto nas caudas como na região globular das histonas e alteram o processo de liberação do DNA enovelado e estabilidade nucleossomal.

Apesar da considerável divergência entre as sequências das histonas dos TriTryps com a de outros eucariotos superiores, ainda é possível identificar alguns sítios conservados. No presente trabalho, algumas dessas modificações foram encontradas para esses parasitas. Como a H3K4me3 para *T. brucei*; um padrão de acetilação da cauda N-terminal da histona H3 foi identificada em *T. cruzi* semelhante ao encontrado em humanos, nas posições K17, S18 e K20, apesar de que em humanos ter um K e em *T. cruzi* ter um S, a acetilação se manteve; o sítio H3K64 em humanos, corresponde ao sítio H3K61 em *T. brucei* e *T. cruzi*, que em ambos parasitas é sítio de várias modificações, incluindo acetilação; a H3T118ph é correspondente ao H3T115ph de *T. cruzi* e *T. brucei*, já em *L. braziliensis* o sítio está disposto na posição H3T112; a H4K16ac encontra-se bem conservada nos 3 parasitas, correspondendo a H4K14ac; a acetilação de H4K79 também está conservada em *T. cruzi* e *T. brucei* na posição de H4K77; a histona H2B é uma das mais divergentes, isso dificulta a comparação, contudo a um padrão de ubiquitinação no C-terminal parecido a encontrada em humanos em *T. cruzi* na posição H2BK96 e H2B104.

Em humanos e alguns eucariotos superiores essas modificações possuem como função o recrutamento de algumas proteínas remodeladoras da cromatina (BOWMAN; POIRIER, 2015). Alguns desses remodeladores são encontrados nesses parasitas como os da família SNF e ISWI, esse último foi recentemente identificado em *T. brucei* relacionado a regulação das VSGs através da interação com nucleoplasmina (NLP) que está associada ao controle dos sítios de expressão (ES) dessas glicoproteínas (STANNE et al., 2015). Além do recrutamento de complexos de remodelamento da cromatina, a própria inserção das modificações em regiões específicas do nucleossomo podem quebrar a constante de equilíbrio alterando a interação DNA-Histona / Histona-Histona (BOWMAN; POIRIER, 2015).

## 5. CONCLUSÃO

Até então, com nossa análise em larga escala, algumas lacunas estão sendo preenchidas, respondendo à perguntas como: “Até que ponto e por quais modificações pós-traducionais as histonas dos TriTryp são modificadas?” “Existem sítios conservados entre eles?”. Com o mapa das PTMs dos TriTryps apresentado, mostra-se que as modificações pós-traducionais são abundantes e diversas e um número significativo de sítios são conservados. Além disso, nossos dados mostram que o controle epigenético via modificações de histonas tem o potencial de ser complexo e sofisticado nestes parasitas, como em outros eucariotos. Assim, este trabalho pode contribuir para melhorar o conhecimento sobre o controle epigenético em TriTryps, sendo o primeiro a descrever sítios modificados em *L. braziliensis*, e com isso, abrindo caminho para estudos funcionais adicionais que possam ajudar a entender os principais mecanismos regulatórios epigenéticos destes organismos, em nível molecular.

## 6. REFERENCIAS

- ALLFREY, V. G.; FAULKNER, R.; MIRSKY, A. E. Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 51, n. 1938, p. 786–94, 1964.
- BANNISTER, A. J.; KOUZARIDES, T. Regulation of chromatin by histone modifications. **Cell Research**, v. 21, n. 3, p. 381–395, 2011.
- BARTHOLOMEW, B. Regulating the Chromatin Landscape: Structural and Mechanistic Perspectives. n. February, p. 1–26, 2014.
- BATRAM, C. et al. Expression site attenuation mechanistically links antigenic variation and development in *Trypanosoma brucei*. **eLife**, v. 2014, n. 3, p. 1–18, 2014.
- BERRIMAN, M. et al. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 416–422, 2005.
- BOWMAN, G. D.; POIRIER, M. G. Post-Translational Modifications of Histones That Influence Nucleosome Dynamics. **Chem Rev.**, v. 115, p. 2274–2295, 2015.
- BREGLIA, S. A.; SLAMOVITS, C. H.; LEANDER, B. S. Phylogeny of phagotrophic euglenids (Euglenozoa) as inferred from Hsp90 gene sequences. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 86–92, 2007.
- BRUN, R.; SCHÖNENBERGER. Cultivation and in vitro cloning or procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. Short communication. **Acta tropica**, v. 36, n. 1979, p. 289–292, 1979.
- BÜSCHER, P. et al. Human African trypanosomiasis. **The Lancet**, v. 390, n. 10110, p. 2397–2409, 2017.
- CEDAR, H.; BERGMAN, Y. Linking DNA methylation and histone modification: Patterns and paradigms. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 5, p. 295–304, 2009.
- CELESTE, B. J.; GUIMARÃES, M. C. Growth curves of *Leishmania braziliensis braziliensis* promastigotes and surface antigen expression before and after adaptation to Schneider's *Drosophila* medium as assessed by anti-*Leishmania* human sera. **Revista do Instituto de**

**Medicina Tropical de São Paulo**, v. 30, n. 2, p. 63–67, 1988.

CHEN, Z. et al. Epigenetic Regulation: A New Frontier for Biomedical Engineers. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v. 19, n. February, p. 195–219, 2017.

CHENG, K. Y. et al. Immunoblot assay using recombinant antigens as a supplemental test to confirm the presence of antibodies to *Trypanosoma cruzi*. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 4, p. 355–361, 2007.

CNOPS, J.; MAGEZ, S.; DE TREZ, C. Escape mechanisms of African trypanosomes: Why trypanosomosis is keeping us awake. **Parasitology**, v. 142, n. 3, p. 417–427, 2015.

CONTRERAS, V. T. et al. **Biological aspects of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media.** **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 1988.

COSGROVE, M. S.; BOEKE, J. D.; WOLBERGER, C. Regulated nucleosome mobility and the histone code. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 11, n. 11, p. 1037–1043, 2004.

COSTA, J. M. et al. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. **J Trop Med Hyg**, v. 89, n. 6, p. 319–323, 1986.

CRICK, F. H. Central Dogma of Molecular Biology. **Nature**, v. 227, n. 6, p. 561–563, 1970.

DE JESUS, T. C. L. et al. Chromatin proteomics reveals variable histone modifications during the life cycle of *trypanosoma cruzi*. **Journal of Proteome Research**, v. 15, n. 6, p. 2039–2051, 2016.

DE OLIVEIRA, C. I.; BRODSKY, C. I. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. JUN, p. 1–9, 2012.

DEITSCH, K. W.; LUKEHART, S. A.; STRINGER, J. R. Common strategies for antigenic variation by bacterial, fungal and protozoan pathogens. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 7, p. 493–503, 2009.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–318, 2004.

DIAZ, J. H. Recognizing and reducing the risks of Chagas disease (American Trypanosomiasis) in travelers. **Journal of Travel Medicine**, v. 15, n. 3, p. 184–195, 2008.

EL-SAYED, N. M. et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of chagas

disease. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 409–415, 2005.

ELIAS, M. C.; NARDELLI, S. C.; SCHENKMAN, S. Chromatin and nuclear organization in *Trypanosoma cruzi*. **Future Microbiology**, v. 4, n. 8, p. 1065–1074, 2009.

FAIRLAMB, A. H. et al. Isolation and characterization of kinetoplast DNA from bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. **Journal of Cell Biology**, v. 76, n. 2, p. 293–309, 1978.

FENN, J. B. et al. Electrospray ionization—principles and practice. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 9, n. 1, p. 37–70, 1990.

FIGUEIREDO, L. M.; CROSS, G. A. M.; JANZEN, C. J. Epigenetic regulation in African trypanosomes: a new kid on the block. **Nature reviews. Microbiology**, v. 7, n. 7, p. 504–13, 2009.

FIGUEIREDO, L. M.; JANZEN, C. J.; CROSS, G. A. M. A histone methyltransferase modulates antigenic variation in African trypanosomes. **PLoS Biology**, v. 6, n. 7, p. 1539–1548, 2008.

FLORES-CHÁVEZ, M. et al. Fatal congenital Chagas' disease in a non-endemic area: a case report. **Cases Journal**, v. 1, n. 1, p. 302, 2008.

GUERIN, P. J. et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **The Lancet infectious diseases**, v. 2, n. 8, p. 494–501, 2002.

HAHNE, H. et al. DMSO enhances electrospray response, boosting sensitivity of proteomic experiments. **Nature Methods**, v. 10, n. 10, p. 989–991, 2013.

HAN, X. et al. PeaksPTM: Mass spectrometry-based identification of peptides with unspecified modifications. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 7, p. 2930–2936, 2011.

HEMMIGE, V.; TANOWITZ, H.; SETHI, A. *Trypanosoma cruzi* infection: A review with emphasis on cutaneous manifestations. **International Journal of Dermatology**, v. 51, n. 5, p. 501–508, 2012.

HERTZ-FOWLER, C. et al. Telomeric expression sites are highly conserved in *Trypanosoma brucei*. **PLoS ONE**, v. 3, n. 10, 2008.

HODAWADEKAR, S. C.; MARMORSTEIN, R. Chemistry of acetyl transfer by histone modifying enzymes: Structure, mechanism and implications for effector design. **Oncogene**, v. 26, n. 37, p. 5528–5540, 2007.

- HORN, D. Introducing histone modification in trypanosomes. **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 6, p. 238–239, 2007.
- HORN, D. Antigenic variation in African trypanosomes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 195, n. 2, p. 123–129, 2014.
- HORN, D.; MCCULLOCH, R. Molecular mechanisms underlying the control of antigenic variation in African trypanosomes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 700–705, 2010.
- IVENS, A. C. et al. NIH Public Access. v. 309, n. 5733, p. 436–442, 2006.
- JAMONNEAU, V. et al. Untreated human infections by trypanosoma brucei gambiense are not 100% fatal. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 6, 2012.
- JANZEN, C. J. et al. Selective Di- or Trimethylation of Histone H3 Lysine 76 by Two DOT1 Homologs Is Important for Cell Cycle Regulation in Trypanosoma brucei. **Molecular Cell**, v. 23, n. 4, p. 497–507, 2006a.
- JANZEN, C. J. et al. Unusual histone modifications in Trypanosoma brucei. **FEBS Letters**, v. 580, n. 9, p. 2306–2310, 2006b.
- JHA, P. K. et al. HAT2 mediates histone H4K4 acetylation and affects micrococcal nuclease sensitivity of chromatin in Leishmania donovani. **PLoS ONE**, v. 12, n. 5, p. 1–16, 2017.
- KARAS, M.; BACHMANN, D.; HILLENKAMP, F. Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of Organic Molecules. **Analytical Chemistry**, v. 57, n. 14, p. 2935–2939, 1985.
- KAWAHARA, T. et al. Two essential MYST-family proteins display distinct roles in histone H4K10 acetylation and telomeric silencing in trypanosomes. **Molecular Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 1054–1068, 2008.
- KUMAR, D. et al. Histone H4 lysine 14 acetylation in Leishmania donovani is mediated by the MYST-family protein HAT4. **Microbiology**, v. 158, n. 2, p. 328–337, 2012.
- LOYOLA, A. Marking histone H3 variants : How , when and why ? **Trends Biochem. Sci.**, v. 32, n. 9, 2007.
- LUGER, K. et al. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. **Nature**, v.



389, n. 6648, p. 251–260, 1997.

MA, B. et al. PEAKS: Powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 17, n. 20, p. 2337–2342, 2003.

MANDAVA, V. et al. Histone modifications in *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 156, n. 1, p. 41–50, 2007.

MAREE, J. P.; PATTERTON, H. G. The epigenome of *Trypanosoma brucei*: A regulatory interface to an unconventional transcriptional machine. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1839, n. 9, p. 743–750, 2014.

MARTIENSSEN, R.; MOAZED, D. RNAi and Heterochromatin Assembly. **Cold Spring Harb Perspect Bio**, v. 7, n. a019323, 2015.

MERSFELDER, E. L.; PARTHUN, M. R. The tale beyond the tail: histone core domain modifications and the regulation of chromatin structure. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 9, p. 2653–2662, 2006.

NARDELLI, S. C. et al. Distinct acetylation of *Trypanosoma cruzi* histone H4 during cell cycle, parasite differentiation, and after DNA damage. **Chromosoma**, v. 118, n. 4, p. 487–499, 2009.

NARLIKAR, G. J.; SUNDARAMOORTHY, R.; OWEN-HUGHES, T. Review Mechanisms and Functions of ATP-Dependent Chromatin-Remodeling Enzymes. **Cell**, v. 154, n. 3, p. 490–503, 2013.

NETO, V. A.; AMATO, M. A. S.; SABBAGA, Y. V. Doença de Chagas aguda. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas.**, p. 127–33, 1997.

NEVES, D. P. et al. Parasitologia Humana. **Atheneu**, p. 498, 2011.

NG, S. S. et al. Dynamic protein methylation in chromatin biology. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 3, p. 407–422, 2009.

OLSEN, J. V. et al. Parts per Million Mass Accuracy on an Orbitrap Mass Spectrometer via Lock Mass Injection into a C-trap. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 4, n. 12, p. 2010–2021, 2005.

OLSEN, J. V.; MANN, M. Status of Large-scale Analysis of Post-translational Modifications by Mass Spectrometry. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 12, n. 12, p. 3444–3452, 2013.

PAYS, E. Regulation of antigen gene expression in *Trypanosoma brucei*. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 11, p. 517–520, 2005.

PAYS, E. The variant surface glycoprotein as a tool for adaptation in African trypanosomes. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 3, p. 930–937, 2006.

PEACOCK, C. S. et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nat. Genet.**, v. 39, n. 7, p. 839–847, 2007.

PEREZ, C. J.; LYMBERY, A. J.; THOMPSON, R. C. A. Reactivation of Chagas Disease: Implications for Global Health. **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 11, p. 595–603, 2015.

PICCHI, G. F. A. et al. Post-translational Modifications of *Trypanosoma cruzi* Canonical and Variant Histones. **Journal of Proteome Research**, v. 16, n. 3, p. 1167–1179, 2017b.

PICCHI, G. F. A. et al. Post-translational modifications of *Trypanosoma cruzi* canonical and variant histones. p. 1–41, 2017a.

PLAZAS-MAYORCA, M. D. et al. One-pot shotgun quantitative mass spectrometry characterization of histones. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 11, p. 5367–5374, 2009.

POLACH, K. J.; WIDOM, J. Mechanism of Protein Access to Specific DNA Sequences in Chromatin : A Dynamic Equilibrium Model for Gene Regulation. **J. Mol. Biol.**, p. 130–149, 1995.

RAMOS, T. C. P. et al. Expression of non-acetylatable lysines 10 and 14 of histone H4 impairs transcription and replication in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 204, n. 1, p. 1–10, 2015.

RAPPSILBER, J.; MANN, M.; ISHIHAMA, Y. Protocol for micro-purification , enrichment , pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. n. Step C, 2007.

RESPUELA, P.; FERELLA, M.; RADA-IGLESIAS, A. Histone Acetylation and Methylation at Sites Initiating Divergent Polycistronic Transcription in *Trypanosoma cruzi* \* □. v. 283, n. 23, p. 15884–15892, 2008.

SARTORI, A. M. C.; SOTTO, M. N. ( Short Report Reactivation of Chagas disease manifested by skin lesions in a patient with AIDS. 1999.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 14–21, 2010.

SIEGEL, T. N. et al. Acetylation of histone H4K4 is cell cycle regulated and mediated by HAT3 in *Trypanosoma brucei*. **Molecular Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 762–771, 2008.

SIEGEL, T. N. et al. Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*. **Genes & Development**, p. 1063–1076, 2009.

SILVA, A. M. N. et al. Post-translational modifications and mass spectrometry detection. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p. 925–941, 2013.

SINGH, R. et al. Increasing the complexity of chromatin: Functionally distinct roles for replication-dependent histone H2A isoforms in cell proliferation and carcinogenesis. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 20, p. 9284–9295, 2013.

SINGH, R. et al. Proteomic profiling identifies specific histone species associated with leukemic and cancer cells. **Clinical Proteomics**, v. 12, n. 1, p. 1–14, 2015.

STANNE, T. et al. Identification of the ISWI Chromatin Remodeling Complex of the Early Branching Eukaryote *Trypanosoma brucei* \*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 45, p. 26954–26967, 2015.

STENFLO, J. et al. Vitamin K dependent modifications of glutamic acid residues in prothrombin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 71, n. 7, p. 2730–3, 1974.

STEVENS, J. R. Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. **Parasite**, v. 15, n. 3, p. 226–232, 2008.

TALBERT, P. B.; HENIKOFF, S. Histone variants — ancient wrap artists of the epigenome. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. April, p. 264–275, 2010.

TESSARZ, P. et al. Glutamine methylation in histone H2A is an RNA-polymerase-I-dedicated modification. **Nature**, v. 505, n. 7484, p. 564–568, 2014.

THOMAS, S. et al. Histone acetylations mark origins of polycistronic transcription in *Leishmania major*. **BMC genomics**, v. 10, n. 1, p. 152, 2009.

TORRES-GUERRERO, E. et al. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, n. May, p. 750, 2017.

TURNER, B. M. Reading signals on the nucleosome with a new nomenclature for modified

histones. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 12, n. 2, p. 110–112, 2005.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi*. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 5–6, p. 472–481, 2001.

WADDINGTON, C. H. The Epigenotype. **Endeavour**, p. 18–20, 1942.

WANG, Q. P.; KAWAHARA, T.; HORN, D. Histone deacetylases play distinct roles in telomeric VSG expression site silencing in African trypanosomes. **Molecular Microbiology**, v. 77, n. 5, p. 1237–1245, 2010.

WATSON, J. D.; CRICK, F. C. H. Molecular structure of nucleic acid. A structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature**, v. 171, n. 8, p. 737–738, 1953.

WRIGHT, J. R.; SIEGEL, T. N.; CROSS, G. A. M. Histone H3 trimethylated at lysine 4 is enriched at probable transcription start sites in *Trypanosoma brucei*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 172, n. 2, p. 141–144, 2010.

WU, H.; ZHANG, Y. Reversing DNA Methylation: Mechanisms, Genomics, and Biological Functions. **Cell Research**, v. 156, n. 0, p. 45–68, 2015.

YANG, X. J.; SETO, E. HATs and HDACs: From structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. **Oncogene**, v. 26, n. 37, p. 5310–5318, 2007.

YANG, X. J.; SETO, E. The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: From bacteria and yeast to mice and men. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 3, p. 206–218, 2008.