**Título:** “Marcas epigenéticas potencialmente responsivas à ação do valproato de sódio (VPA) na heterocromatina de *Triatoma infestans* (Klug)”

**Pesquisador Responsável:** Maria Luiza Silveira Mello

**Candidato à Bolsa:** xxx

**Instituição Sede:** Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas (SP), Brasil

**Resumo:** As células somáticas de *Triatoma infestans*, hemíptero hematófago e vetor da doença de Chagas, são caracterizadas pela presença de corpos heterocromáticos (cromocentros) cujo DNA é rico em bases AT. Neste inseto, o tratamento com valproato de sódio/ácido valproico (VPA), conhecido inibidor de deacetilases de histonas, promove remodelação cromatínica nos cromocentros, porém, diferindo de respostas usuais a essa droga, esta não se mostra acompanhada por acetilação de H3K9 e H4K8. Também se desconhece se o VPA causaria algum efeito sobre metilação do DNA nesses cromocentros, pois há ainda incerteza quanto à presença de 5-metilcitosina (5mC) nos mesmos. Desconhece-se também se o VPA causaria efeito sobre a metilação de histonas já demonstrada nesse material. Dadas as dúvidas ainda existentes sobre os caminhos metabólicos através dos quais o VPA poderia atuar nesse tipo de cromatina, no presente trabalho será aprofundada a pesquisa de 5mC e de relações entre H3K9me3, H4K20me3, H3K27me3 e HP1-α nos cromocentros de *T. infestans* submetidos a tratamento com VPA. Dados serão levantados para células dos túbulos de Malpighi em diferentes fases do desenvolvimento do inseto que contemplem endorreplicação do DNA (3º. ou 4º. instar) e parada do ciclo celular (5º. instar ou adulto). A metodologia envolvida fará uso de imunoensaios e de imagens 3-D obtidas com microscopia confocal. Serão também desenvolvidos protocolos para isolamento de cromocentros por microcirurgia à laser para subsequente isolamento de DNA e estudo de uma eventual participação de 5mC em sua composição.

**Title:** “Epigenetic markers potentially responsive to sodium valproate (VPA) in the heterochromatin of *Triatoma infestans* (Klug)”

**Supervisor:** Maria Luiza Silveira Mello

**Fellowship Candidate:** xxx

**Host Institution:** University of Campinas, Institute of Biology, Campinas (SP), Brazil

**Abstract:** The somatic cells of*Triatoma infestans*, a blood-sucking hemipteran, vector of Chagas disease, exhibit conspicuous heterochromatic bodies (chromocenters) containing an AT-rich DNA. Treatment using sodium valproate/valproic acid (VPA), a well-known histone deacetylase inhibitor, induces chromatin remodeling in T. infestans chromoceneters. However, it is not accompanied by H3K9 and H4K8 acetylation, differing from the usual response in many other cell systems. It is not known whether VPA would cause some effect on DNA methylation in *T. infestans* chromocenters where the presence of 5-methylcytosine (5mC) is still uncertain. It is also unknown whether VPA would affect histone methylation previously demonstrated for this material. On account of the uncertainties regarding the metabolic pathways through which VPA would act on this chromatin type, the presence of 5mC and of relationships among H3K9me3, H4K20me3, H3K27me3 and HP1-α in chromocenters of VPA-treated *T. infestans* will be investigated in depth. Data will be obtained for Malpighian tubule cells in different developmental phases that involve DNA endoreplication (3rd or 4th nymphal instar) and cell cycle arrest (5th nymphal instar or adults). The methodology will comprise immunoassays and 3-D confocal images. Protocols for chromocenter isolation using laser microsurgery for DNA isolation and 5mC investigation will also be pursued.

**Problemática**

*Triatoma infestans*, espécie do grupo de insetos hemípteros hematófagos e eficiente vetor da doença de Chagas, apresenta características celulares particulares, como elevada poliploidia somática adquirida por endorreplicação do DNA ao longo do desenvolvimento ninfal, cromossomos holocinéticos, processo meiótico não usual, presença de grandes corpos heterocromáticos (cromocentros), e capacidade de resistência a períodos prolongados de jejum acompanhada por fenômeno de fusão nuclear e celular (Schreiber & Pellegrino 1951, Ueshima 1966, Mello 1971, 1989, Schreiber et al. 1972, Perez et al. 2000).

 Os cromocentros de *T. infestans*, formados por diversas cópias dos autossomos A, B e C e dos cromossomos sexuais X e Y (Schreiber et al. 1972), contêm DNA rico em bases AT (Alvarenga et al. 2011, Bardella et al. 2014). Dados obtidos após tratamento de células somáticas de *T. infestans* com enzimas de restrição *Msp* I e *Hpa* II e imunoensaios para 5-metilcitosina (5mC) não têm revelado DNA metilado nessa heterocromatina (Alvarenga et al. 2011), uma característica não usual (Cedar & Bergman 2009), mas também compartilhada por hemípteros pragas agrícolas (Bongiorni et al. 1999, Mandrioli & Borsati 2007, Mandrioli et al. 2011). No entanto, há relato de imunomarcação para 5mC em partes dos cromossomos sexuais e de alguns autossomos desta espécie (Bardella et al. 2014). Assim, embora metilação de citosina possa não ser o fator determinante para o estado condensado global desses corpos heterocromáticos, haveria necessidade de se confirmar com precisão este ponto com outras metodologias, como, por exemplo, usando-se microscopia confocal a partir de imagens obtidas com imunoensaios, isolamento dessa cromatina com microcirurgia seguido de isolamento de seu DNA, e análise com *kit* específico para detecção de 5mC.

Dados obtidos de espécimes de *T. infestans* tratados com valproato de sódio/ácido valproico (VPA), conhecido como inibidor de deacetilases de histonas, porém potencial indutor de demetilação do DNA e de demetilação ou até metilação de histonas (Nightingale et al. 2007, Tung & Winn 2010, Ganai et al. 2015), indicaram indução de descondensação da cromatina do cromocentro em parte da população nuclear (Alvarenga et al. 2016; Bassani 2019). Porém esse fenômeno não se mostrou acompanhado por acetilação de H3K9 e H4K8 (Alvarenga et al. 2016; Bassani 2019). Demetilação ou metilação de histonas, um possível efeito da ação do VPA descrita em poucos tipos celulares, como no caso de células renais embrionárias humanas (Ganai et al. 2015), células HeLa (Nightingale et al. 2007; Rocha 2019), não foi ainda investigada em *T. infestans* sob tal condição de tratamento.

Há, portanto, diversas questões pendentes referentes à ação do VPA neste sistema celular, afetando elementos epigenéticos que estariam participando da manutenção do estado condensado da heterocromatina de cromocentros. Não se constatando metilação de DNA nos mesmos, a descompactação da heterocromatina se daria por outro mecanismo, provavelmente afetando marcas epigenéticas de histonas. Seria afetada a participação de HP1-α e de sua relação com H3K9me3 e H4K20me3 (Wongtawan et al. 2011, Azzaz et al. 2014)? Seria afetada a marca H3K27me3, também reportada como associada a H3K9me3 e H4K20me3 e marca epigenética de heterocromatina em outros organismos (Kouzarides 2007)? Essas questões poderiam ser investigadas em preparados de espécimes tratados com VPA, usando-se imunoensaios e reconstrução 3-D após obtenção de imagens à microscopia confocal para melhor identificação dos locais de sinais fluorescentes nos cromocentros. Isolamento de cromocentros por microcirurgia à laser seguido de isolamento de DNA e procedimento de Elisa com *kit* específico poderia ser utilizado para a comprovação de DNA metilado, se presente.

**Objetivo e Resultados esperados**

Identificar marcas epigenéticas e/ou moléculas proteicas que, sob a ação do VPA, venham permitir a descompactação dos cromocentros de *Triatoma infestans*, o que possibilitaria também entender serem elas responsáveis pelo estado compactado desses corpos heterocromáticos.

**Plano de Trabalho**

Ninfas de 3º. e 5º. instars e adultos de *T. infestans* (Klug, 1834)*,* criados em condições controle de temperatura, umidade, luminosidade e alimentação, serão fornecidos pelo Insetário da SUCEN (Superintendência de Controle de Endemias do Estado de São Paulo). Os procedimentos de manutenção/alimentação dos insetos estão registrados no Conselho Nacional de Controle do Uso de Animais segundo protocolo de no. 01200.003280/2014-28. O presente projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão Científica da SUCEN segundo protocolo 64405/2015. Os insetos serão dissecados 1 h após injeção com 50 µL de solução de VPA 0.05 mM para a retirada dos túbulos de Malpighi, ou serão cultivados *in vitro* em meio L-15 de Leibovitz modificado (Hink 1976), contendo a droga, conforme procedimento desenvolvido por Bassani (2019). A utilização de túbulos de Malpighi para o presente estudo se justifica por causa de um conhecimento bem estabelecido sobre sua biologia celular (revisão em Alvarenga et al. 2016).

Em preparados de túbulos de Malpighi fixados em paraformaldeído a 4% serão realizados ensaios de imunocitoquímica com anticorpos primários anti-H3K9me3 (*rabbit*, policlonal) (Millipore, Billerica, MA, USA), H4K20me3 (*rabbit,* monoclonal) (Cell Signaling, Danvers, MA, USA), H3K27me3 (*rabbit,* monoclonal) (Cell Signaling), HP1-α (*rabbit,* policlonal) (Rheabiotech, Campinas, Brasil)); como anticorpo secundário será usada *goat anti-rabbit IgG* complexada com fluoróforos adequados (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA). Imagens de microscopia confocal e reconstrução 3-D serão obtidas na *facility* LACTAD/Unicamp, com a utilização de microscópio confocal Leica TS SP5 II (Wetzlar, Germany), equipado com lasers de argônio e hélio-neônio, objetivas de 63x e 100x e *software* Leica Applications Suite AF.

5mC será pesquisada em preparados fixados em metanol a 20ºC por 10 min, usando-se anticorpo primário anti-5-mC de camundongo (Sigma) e anticorpo secundário *rabbit anti-mouse* complexado com Alexa 488 (Cell Sgnaling), bem como em DNA isolado de cromocentros obtidos por microcirurgia a laser, sob supervisão da Profa. Luciana Bolsoni, citogeneticista de anfíbios com larga experiência na técnica, e usando-se análise de ELISA com *kit* apropriado, conforme instruções do fabricante (Zymo Research).

Obtido DNA isolado, este poderia se prestar a uma análise microespectroscópica ao infravermelho (FT-IR), com equipamento Illuminat IR II™ (Smiths Detection, Danbury, CT, USA), à semelhança do que já foi reportado por nosso laboratório para níveis alterados de metilação do DNA em células hepáticas de animais diabéticos e em células HeLa sob a ação do VPA (Vidal et al. 2014; Veronezi et al. 2017).

**Desafios científicos e tecnológicos e os meios e métodos para superá-los**

 Para o desenvolvimento da presente pesquisa convergem abordagens complexas, visando contribuir com conhecimento novo para um campo que ainda não dispõe de conclusões fechadas relativas à ação do VPA sobre a cromatina.

 Há o desafio em se determinar como o VPA promove descompactação da heterocromatina sem induzir uma acetilação clássica de histonas H3K9 e H4K8 e aparentemente sem DNA metilado a ser afetado. Ao mesmo tempo estarão sendo esclarecidos quais elementos participam da manutenção do estado condensado dessa heterocromatina. O isolamento de cromocentros de *T. infestans* com microcirurgia permitiria a extração de DNA dessa área e consequentemente seu estudo, incluindo-se até determinação de assinaturas espectrais no infravermelho (FT-IR). Já constatamos que tal procedimento envolverá dificuldade operacional, porém contamos com que esse desafio venha a ser resolvido por supervisão da Profa. Luciana Bolsoni (Unicamp, IB), experiente no campo de isolamento de regiões cromossômicas por microcirurgia à laser. Além disso, o aprofundamento na detecção de alguns tipos de resíduos metilados de histonas e de HP1-α na estrutura cromatínica dos cromocentros, aliado a uma investigação topológica usando microscopia confocal, consubstanciaria a participação desses elementos na própria manutenção do estado condensado da heterocromatina.

**Cronograma de Execução**

|  |  |
| --- | --- |
| **Etapas** | **Semestres** |
|  | **1º.** | **2º.** | **3º.** | **4º.** |
| 1. **Obtenção de insetos e preparados**
 |  |  |  |  |
| 1. **Imunocitoquímica para histonas modificadas, HP1-α, 5mC**
 |  |  |  |  |
| 1. **Microscopia confocal, microcirurgia à laser**
 |  |  |  |  |
| 1. **Isolamento de DNA- ELISA 5mC**
 |  |  |  |  |
| 1. **FT-IR para DNA isolado**
 |  |  |  |  |
| 1. **Divulgação de resultados/Congressos/Manuscritos**
 |  |  |  |  |
| 1. **Relatórios Técnico-Científicos**
 |  |  |  |  |

**Disseminação e avaliação**

O conhecimento científico produzido será disseminado através de artigos científicos em veículos de circulação internacional, apresentações em congressos científicos nacionais e internacionais e palestras. Avaliações anuais comprovarão tal disseminação.

**Outros apoios**

Este item não se aplica à presente proposta.

**Referências**

Alvarenga EM, Rodrigues VLCC, Moraes AS, Naves LS, Mondin M, Felisbino MB, Mello MLS. Histone epigenetic marks in heterochromatin and euchromatin of the Chagas’ disease vector, *Triatoma infestans*. Acta Histochem 118: 401-412, 2016.

Alvarenga EM, Mondin M, Martins JA, Rodrigues VLCC, Vidal BC, Rincones J, Carazzolle MF, Andrade LM, Mello MLS. Spatial distribution of AT- and GC-rich DNA within interphase cell nuclei of *Triatoma infestans* Klug. Micron 42: 568-578, 2011.

Azzaz AM, Vitalini MW, Thomas AS, Price JP, Blacketer MJ, Cryderman DE, Zirbel LN, Woodcock CL, Elcock AH, Wallrath LL, Shogren-Knaak MA. Human heterochromatin protein 1α promotes nucleosome associations that drive chromatin condensation. J Biol Chem 289: 6850-6861, 2014.

Bardella VB, Rosa JA, Vanzela ALL. Origin and distribution of AT-rich repetitive DNA families in *Triatoma infestans* (Heteroptera). Infection, Genet and Evol 23: 106-114, 2014.

Bassani A. Ação do valproato de sódio (VPA) sobre a cromatina de células de túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* (Klug) cultivados *in vitro.* Relatório de Bolsa IC/FAPESP – Projeto Temático 2015/10356-2, 2019.

Bongiorni S, Cintio O, Prantera G. The relationship between DNA methylation and chromosome imprinting in the coccid *Planococcus citri*. Genetics 151: 1471-1478, 1999.

Cedar H, Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. Nat Rev Genet 10: 295-304, 2009.

Ganai SA, Kalladi SM, Mahadevan V. HDAC inhibition through valproic acid modulates the methylation profiles in human embryonic kidney cells. J Biomol Struct Dyn 33: 1185-1197, 2015.

Hink WF. A compilation of invertebrate cell lines and culture media. *In* Invertebrate Tissue Culture (ed. Maramorosch K). Acad Press, New York, pp 319-369, 1976.

Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. Cell 128: 693-705, 2007.

Mandrioli M, Borsatti F. Analysis of heterochromatic epigenetic markers in the holocentric chromosomes of the aphid *Acyrthosiphon pisum*. Chromosome Res 15: 1015-1022, 2007.

Mandrioli M, Azzoni P, Lombardo G, Manicardi GC. Composition and epigenetic markers of heterochromatin in the aphid *Aphis nerii* (Hemiptera: Aphididae). Cytogenet Genome Res 133: 67-77, 2011.

Mello MLS. Nuclear behavior in the Malpighian tubes of *Triatoma infestans*. Cytologia 36: 42-49, 1971.

Mello MLS. Nuclear fusion and change in chromatin packing state in response to starvation in *Triatoma infestans*. Rev Brasil Genét 12: 485-498, 1989.

Nightingale KP, Gendreizig S, White DA, Bradbury C, Hollfelder F, Turner BM. Cross-talk between histone modifications in response to histone deacetylase inhibitors: MLL4 links histone H3 acetylation and histone H3K4 methylation. J Biol Chem 282: 4408-4416, 2007.

Perez R, Sanches-Rufas J, Suja JA, Page J, Panzera F. Meiosis in holocentric chromosomes: orientation and segregation of an autosome and sex chromosomes in *Triatoma infestans* (Heteroptera). Chromosome Res 8: 17-25, 2000.

Rocha MA. Análise de atuação do valproato de sódio sobre a metilação de histonas e de possível interação com o DNA e histonas de células HeLa. Tese de doutorado em andamento. Unicamp, 2019.

Schreiber G, Pellegrino J. Análise citológica e cariométrica da ação da colchicina sobre a espermatogênese dos hemípteros. Mem Inst Oswaldo Cruz 49: 513-542, 1951.

Schreiber G, Bogliolo AR, Pinto AC. Cytogenetics of Triatominae: caryotype, DNA content, nuclear size and heteropyknosis of autosomes. Braz J Biol 32: 255-263, 1972.

Tung EW, Winn LM. Epigenetic modifications in valproic acid-induced teratogenesis. Toxicol Appl Pharmacol 248: 201-209, 2010.

Ueshima N. Cytotaxonomy of the Triatominae (Reduviidae, Hemiptera). Chromosoma 18: 97-122, 1966.

Veronezi GMB, Felisbino MB, Gatti MSV, Mello MLS, Vidal BC. DNA methylation changes in valproic acid-treated HeLa cells as assessed by image analysis, immunofluorescence and vibrational microspectroscopy. PLoS ONE 12(1): e0170740, 2017.

Vidal BC, Ghiraldini FG, Mello MLS. Changes in liver cell DNA methylation status in diabetic mice affect its FT-IR characteristics. PLoS ONE 9(7): e102295, 2014.

Wongtawan T, Taylor JE, Lawson KA, Wilmut I, Pennings S. Histone H4K20me3 and HP1α are late heterochromatin markers in development, but present in undifferentiated embryonic stem cells. J Cell Sci 124: 1879-1890, 2011.