

INSTITUTO CARLOS CHAGAS, FIOCRUZ-PR
Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia

JAQUELINE DE OLIVEIRA ROSA

CARACTERIZAÇÃO DA ACTINA 4 DE *Trypanosoma cruzi*

Curitiba
2018

INSTITUTO CARLOS CHAGAS, FIOCRUZ-PR
Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia

JAQUELINE DE OLIVEIRA ROSA

CARACTERIZAÇÃO DA ACTINA 4 DE *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia do Instituto Carlos Chagas – Fiocruz PR, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientadores: Dra. Lia Carolina Soares Medeiros
Dr. Stenio Perdigão Fragoso

Curitiba
2018

Dedico este trabalho a todos os que me apoiaram, incentivaram e acreditaram que eu seria capaz, em especial a minha filha.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus orientadores Lia e Stenio, por estes quatro anos de convivência, desde que cheguei ao laboratório fazendo iniciação científica e posteriormente o mestrado. Agradeço pela confiança, por toda a dedicação, apoio, paciência, cobranças, críticas e até mesmo pelas broncas, pois sem isso eu não teria crescido, amadurecido e tido a capacidade de desenvolver esse trabalho. Agradeço pelos momentos de descontração e por toda a amizade, levo vocês no meu coração.

Em segundo, agradeço a Bia, parceira de projeto que se tornou grande amiga! Foram muitas risadas, choros, alegrias, tristezas, desabafos e todos os tipos de emoção que passamos juntas, às vezes de satisfação por ver um resultado bacana, muitas vezes de decepção por ver um resultado ruim. Obrigada por fazer parte da minha vida.

Agradeço aos amigos Bruno, Ju e Allan por toda a ajuda, psicológica e braçal que me deram ao longo destes dois anos. Pelos momentos de descontração e por toda a ajuda ao longo das disciplinas...

Aos amigos do laboratório Bruna, Kammi, Augusto, Leticia e Anna em especial a Claudia e a Gi, por serem pessoas maravilhosas e me ajudarem de tantas formas. À Didi por ser tão sensível e me dar aquele abraço carinhoso nos momentos em que eu mais precisei, por estar sempre por perto e por todo carinho comigo.

Ao pessoal do preparo de materiais e do biotério Nilson, Sibebe, Vanessa, Tânia e Lívia pelo trabalho sempre eficiente contribuindo para que o meu trabalho pudesse ser realizado de uma forma muito mais rápida. E mais do que isso por todo o carinho e amizade.

A todos da plataforma de espectrometria de massas, Michel e Kely muito obrigada por toda a ajuda. E também ao Paulo Carvalho e ao Marlon por me ajudarem com as análises, não sei o que faria sem vocês.

Um agradecimento especial à minha família, ao meu marido, a minha filha e aos meus pais, de quem muitas vezes me distanciei em virtude do mestrado, pois sempre chegava em casa cansada e sem energia para lhes dar atenção e em vários finais de semana deixei de ficar com a família para fazer algum experimento no laboratório. Obrigada pelo amor incondicional, por sempre apoiar minhas decisões e torcer pelo meu sucesso.

Por fim agradeço ao programa de pós-graduação do Instituto Carlos Chagas pela oportunidade de desenvolver este projeto de mestrado; aos avaliadores da Jornadinha

Fabiola e Daysi, por me acompanharem ao longo desse processo, pelas correções e sugestões realizadas; aos professores da UFPR Jaime e Wanderson por toda a ajuda intelectual e de material; aos membros da banca examinadora da defesa de mestrado Fabiola, Haruo e Carolina por terem aceitado o convite de avaliar e contribuir com sugestões para aperfeiçoar esta dissertação. E à Fiocruz pelo apoio financeiro.

RESUMO

A actina é uma proteína altamente conservada que participa em inúmeras funções essenciais tais como motilidade celular, citocinese, tráfego de vesículas e remodelamento da cromatina. Análises *in silico* do genoma do protozoário *Trypanosoma cruzi* identificaram quatro genes que codificam actinas (TcAct), nomeadas como actinas 1, 2, 3 e 4. Entretanto, esta anotação foi baseada em análises de similaridade, sem que nenhuma caracterização em termos funcionais tenha sido realizada. Nesse trabalho, caracterizamos a actina 4 de *T. cruzi* (TcAct4). Apesar de possuir similaridade com actinas de outros eucariotos, TcAct4 é a menos conservada quando comparada às outras actinas de *T. cruzi* (similaridade inferior a 50%). O gene que codifica a actina 4 (TcAct4) não possui ortólogo em *T. brucei*, porém possui ortólogos em outros tripanosomatídeos, dentre os quais as diferentes espécies do gênero *Leishmania*. A análise do padrão de expressão de TcAct4 por *western blot* mostrou que essa proteína é expressa em todas as fases do ciclo de vida do parasita. Análises por imunofluorescência e por microscopia eletrônica mostraram que TcAct4 apresenta um padrão disperso por todo o citoplasma e, frequentemente, associada com estruturas citoplasmáticas discretas, que em alguns casos, se assemelham a pequenos segmentos lineares, compatíveis com microfilamentos curtos ao longo do corpo celular do parasita. TcAct4 foi identificada majoritariamente na fração solúvel de extratos protéicos de *T. cruzi*, sugerindo que esta proteína não se encontra na forma filamentosa. Uma linhagem de *T. cruzi* mutante para TcAct4 (TcAct4 KO) foi gerada pela técnica de CRISPR-Cas9. Os parasitas TcAct4 KO apresentam alterações ultraestruturais, tais como intensa formação de vesículas de conteúdo elétron-denso e com aspecto de corpos multivesiculares, sugerindo que TcAct4 é importante para os processos de formação e/ou transporte de vesículas. Além disso, a organização da mitocôndria parece ter sido afetada, bem como a proliferação das formas epimastigotas dos parasitas TcAct4 KO, que foi significativamente reduzida. Contudo, a morfologia externa dos epimastigotas, bem como os processos de diferenciação e infectividade não foram alterados. Ensaio de imunoprecipitação de TcAct4 seguidos da análise por espectrometria de massas identificaram proteínas de diversas vias metabólicas e processos celulares, algumas delas envolvidas com tráfego de vesículas e translocação de proteínas para a mitocôndria, processos que se bloqueados são compatíveis com os fenótipos encontrados nos parasitas TcAct4 KO.

Palavras-chave: Actina, proteínas relacionadas à Actina (ARPs), *Trypanosoma cruzi*.

ABSTRACT

Actin is a highly conserved protein that participates in numerous essential functions such as cell motility, cytokinesis, vesicle trafficking, and chromatin remodeling. *In silico* analyses of the genome of the protozoan *Trypanosoma cruzi* identified four genes encoding for actin (TcAct), named as actin 1, 2, 3 and 4. However, this annotation was based on similarity analyses, without any functional characterization being fulfilled. In this work, we characterized the actin 4 of *T. cruzi* (TcAct4). Although it has similarity to other eukaryotic actins, TcAct4 is the least conserved when compared to other *T. cruzi* actins (similarity less than 50%). The gene encoding actin 4 (*TcAct4*) has no orthologous in *T. brucei*, but has orthologues in other trypanosomatids, including different species of the genus *Leishmania*. Western blot analysis showed that TcAct4 is expressed in all stages of the parasite life cycle. Immunofluorescence and electron microscopy analyses showed that localization of TcAct4 is dispersed throughout the cytoplasm and often associated with discrete cytoplasmic structures, which in some cases resemble small linear segments compatible with short microfilaments along the parasite's cell body. TcAct4 was identified mainly in the soluble fraction of *T. cruzi* protein extracts, suggesting that this protein is not present in the filamentous form. A *T. cruzi* mutant strain for TcAct4 (TcAct4 KO) was generated by CRISPR-Cas9 methodology. TcAct4 KO parasites presented ultrastructural alterations, such as intense formation of electron-dense vesicles with an aspect of multivesicular bodies, suggesting that TcAct4 may be important for vesicle formation/transport processes. In addition, mitochondrial organization was also affected, and TcAct4 KO proliferation of the epimastigote forms was significantly reduced. However, the external morphology of the epimastigote forms, as well as processes of differentiation and infectivity were not altered. TcAct4 immunoprecipitation assays followed by mass spectrometric analysis identified proteins that are involved in various metabolic pathways and cellular processes such as vesicle trafficking and proteins translocation to the mitochondria, processes that once blocked could lead to phenotypes compatible with those found in the TcAct4 KO parasites.

Key words: Actin, Actin-related proteins (ARPs), *Trypanosoma cruzi*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura cristalina da actina.

Figura 2: Três fases da polimerização da actina.

Figura 3: Proteínas de ligação à actina influenciam na sua dinâmica.

Figura 4: Árvore filogenética de actinas

Figura 5: Actinas de *T. cruzi*.

Figura 6: Ciclo de vida do *T. cruzi*.

Figura 7: Mapa dos vetores de expressão da actina 4.

Figura 8: Comparação da estrutura tridimensional das proteínas actina de *T. cruzi* com a actina de coelho.

Figura 9: Reconhecimento da actina 4 pelo antissoro anti-TcAct4.

Figura 10: Análise da expressão da actina 4 nas diferentes formas de desenvolvimento do parasita.

Figura 11: Solubilidade da actina 4 de *T. cruzi*.

Figura 12: Distribuição subcelular da actina 4 em *T. cruzi*.

Figura 13: Distribuição subcelular da actina 4 em formas epimastigotas de *T. cruzi* por imunoelctro microscopia.

Figura 14: Localização subcelular da actina 4 ao longo do ciclo de *T. cruzi* por imunoelctro microscopia.

Figura 15: Estratégia para obtenção do TcAct4 KO por CRISPR-Cas9.

Figura 16: Detecção da actina 4 nos parasitas nocaute.

Figura 17: Efeito do nocaute da actina 4 na proliferação de formas epimastigota de *T. cruzi*.

Figura 18: Efeito do nocaute da actina 4 na diferenciação de *T. cruzi* em tripomastigotas metacíclicos.

Figura 19: Efeito do nocaute da actina 4 na infecção de células VERO.

Figura 20: Avaliação morfológica ultraestrutural da superfície dos parasitas TcAct4 KO.

Figura 21: Avaliação ultraestrutural intracelular dos parasitas TcAct4 KO.

Figura 22: Avaliação da expressão da actina 4 nos parasitas TcAct4 KO complementados.

Figura 23: Efeito da complementação gênica na proliferação de epimastigotas de TcAct4 KO.

Figura 24: Avaliação ultraestrutural intracelular dos parasitas TcAct4 KO complementados.

Figura 25: Expressão e distribuição subcelular da actina 4 fusionada a etiqueta GFP na porção carboxi-terminal.

Figura 26: Imunoprecipitação da Act4GFP em tampão A.

Figura 27: Imunoprecipitação da Act4GFP em tampão B.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação entre as sequências de actina de *T. cruzi*.

Tabela 2: Proteínas identificadas na imunoprecipitação da TcAct4-GFP por LC-MS.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – Difosfato de adenosina

AP – Alkaline phosphatase (Fosfatase alcalina)

ATP – Trifosfato de adenosina

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool (Ferramenta para Pesquisa Básica de Alinhamento Local)

BSA – Bovine Serum Albumine (Albumina Bovina Sérica)

CDS – Protein Coding Sequence (Sequência Codificadora de Proteína)

DAPI – Di-hidrocloro de 4,6-diamidino-2-fenil-lindol

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos

DNase – Desoxirribonuclease

EDTA – Ácido etileno-diamino-tetracético

G418 – Antibiótico aminoglicosídeo relacionado à neomicina

GFP – Green Fluorescent Protein (Proteína Fluorescente Verde)

HEPES – Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2'-etanossulfônico

IgG – Imunoglobulina G

IPTG – Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo

kDa – Quilo Dalton

kDNA – DNA do cinetoplasto

LB – Luria-Bertani

LIT – Liver Infusion Tryptose (Infusão de Fígado e Triptose)

mRNA – RNA mensageiro

pb – Pares de bases de nucleotídeos

PBS – Phosphate Buffered Saline (Solução salina tamponada com fosfato)

PCR – Polymerase chain reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

PMSF – Fluoreto de fenil-metil-sulfonila

RNA – Ácido Ribonucleico

RNase – Ribonuclease

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

TAU – Triatomine Artificial Urine (Urina artificial de Triatomíneo)

TAU3AAG – Urina artificial de Triatomíneo suplementado com os aminoácidos prolina, glutamato sódico e aspartato sódico, e glicose

TBE – Tampão Tris-borato-EDTA

TE – Tampão Tris-EDTA

TRIS – Tris-hidroximetil aminometano

Tween 20 – Monolaurato de polioxietileno (20) sorbitana

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO / JUSTIFICATIVA	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 ACTINA E PROTEÍNAS RELACIONADAS.....	3
2.2 ACTINA DE PROTOZOÁRIOS.....	9
2.3 O CICLO DE VIDA DO <i>T. cruzi</i>	12
2.4 ACTINAS DE <i>T. cruzi</i>	14
3 OBJETIVOS	16
3.1 OBJETIVO GERAL.....	16
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
4 MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 CULTIVO DE <i>Escherichia coli</i>	17
4.2 CÉLULAS QUIMIO-COMPETENTES	17
4.3 CULTIVO DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
4.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO PROTEICO DE <i>T. cruzi</i>	19
4.5 <i>Western blot</i>	19
4.6 EXTRAÇÃO DE DNA DE <i>T. cruzi</i>	19
4.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	20
4.8 ELETROFORESE DE DNA	20
4.9 TRANSFEÇÃO DE EPIMASTIGOTAS DE <i>T. cruzi</i>	21
4.10 OBTENÇÃO DO ANTISORO CONTRA TcAct4 RECOMBINANTE	21
4.11 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE TcAct4.....	22
4.12 IMUNOLocalização POR IMUNOFLORESCÊNCIA.....	22
4.13 IMUNOCITOQUÍMICA.....	23
4.14 OBTENÇÃO DE LINHAGEM DE <i>T. cruzi</i> MUTANTE PARA O GENE <i>TcAct4</i> (<i>TcAct4</i> KO).....	23
4.15 CURVA DE CRESCIMENTO E QUANTIFICAÇÃO DA METACICLOGÊNESE ..	25
4.16 AVALIAÇÃO DA INFECTIVIDADE DOS PARASITAS <i>TcAct4</i> KO	25
4.17 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	26
4.18 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	27
4.19 COMPLEMENTAÇÃO GÊNICA.....	27
4.20 IMUNOPRECIPITAÇÃO DE <i>TcAct4</i>	29
5 RESULTADOS	34
5.1 ANÁLISE <i>in silico</i> DA <i>TcAct4</i>	34

5.2	EXPRESSÃO E LOCALIZAÇÃO DA TcAct4	36
5.3	NOCAUTE GÊNICO DE <i>TcAct4</i> USANDO O SISTEMA CRISPR-Cas9	43
5.4	IMUNOPRECIPITAÇÃO E ESPECTROMETRIA DE MASSAS	51
6	DISCUSSÃO	60
7	CONCLUSÕES	66
8	PERSPECTIVAS	67
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

1 INTRODUÇÃO / JUSTIFICATIVA

O protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (Classe Kinetoplastea) é o agente etiológico da doença de Chagas, enfermidade que afeta de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo todo (who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/). Além do interesse médico, esse protozoário é também um modelo de estudo interessante por apresentar características moleculares e estruturais peculiares em relação a outros modelos eucarióticos (HANNAERT et al., 2003; CAMPBELL et al., 2003; SIMPSON et al., 2004; LUKES et al., 2005; SIMPSON et al., 2006). Uma das principais características do *T. cruzi*, compartilhada com outros tripanosomatídeos, é a organização do seu citoesqueleto, baseada em uma rede subpelicular de microtúbulos bastante estáveis (DE SOUZA, 2009). Contudo, pouco se conhece sobre o papel da actina, outra importante proteína que compõe o citoesqueleto da maioria das células eucarióticas. A actina é uma das proteínas mais abundantes na célula e se manteve altamente conservada ao longo da evolução. Esta proteína, além de ser um dos principais componentes do citoesqueleto, desempenha papel essencial na estrutura e dinâmica celular, participando de vários processos, tais como motilidade e manutenção da forma e polaridade da célula, podendo interagir com diversos ligantes. Além disto, a actina participa de outras funções importantes, tais como remodelamento de cromatina e regulação transcricional (SCHAFER & SCHROER, 1999; SHEN et al., 2000; MULLER et al., 2005; CHEN et al., 2007).

Apesar do avanço na caracterização da actina de *T. cruzi* (DE SOUZA, 1983; MORTARA, 1989; CEVALLOS et al., 2003, 2011; DE MELO et al. 2008), suas funções ainda não foram elucidadas.

O genoma de *T. cruzi* codifica quatro isoformas de actina (DE MELO et al., 2008; CEVALLOS et al., 2011). A análise filogenética dos genes que codificam as isoformas de actina em *T. cruzi* mostrou que alguns destes genes estão mais próximos a genes que codificam proteínas relacionadas à actina (ARPs), algumas vezes anotadas como proteínas do tipo actina (AcL, actin-like protein), do que ao gene da actina propriamente dita (CEVALLOS et al., 2011), como é o caso da actina 4. Assim, considerando que a anotação dos genes das quatro isoformas de actina de *T. cruzi* foi feita com base em análises *in silico* apenas, ainda não se sabe exatamente quais

destes genes codificam para actina de fato e quais codificam para ARPs/AcL, tampouco quais são as funções destes genes durante o ciclo de vida do parasita.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ACTINA E PROTEÍNAS RELACIONADAS

A actina é uma proteína altamente conservada e possui papel importante na maioria das células eucarióticas. Os filamentos de actina fornecem suporte mecânico interno, força e direção para os movimentos celulares, além de participar no transporte de moléculas e vesículas, nos processos de divisão celular, formação de junções, remodelamento da cromatina e regulação transcricional (SCHAFER & SCHROER, 1999; SHEN et al., 2000; POLLARD & BORISY, 2003; MULLER et al., 2005; CHEN et al., 2007; CAMPELLONE & WELCH, 2010). Embora actinas de diferentes espécies apresentem cerca de 90% de similaridade, as variações de aminoácidos geram diferenças funcionais significativas como, por exemplo, contração em células musculares e não musculares, formação de anel contrátil no final da divisão celular, movimentos ameboides e preservação das microvilosidades intestinais (ALBERTS et al., 2017). Uma possível explicação para esta proteína ser altamente conservada, é que a estrutura da superfície de um filamento de actina interage com muitas outras proteínas, de forma que uma mutação no gene da actina acarretaria mudanças na interação com outras diversas proteínas, o que poderia resultar em mudanças celulares indesejáveis (ALBERTS et al., 2017).

A actina pertence à superfamília estrutural das açúcar-quinases e Hsp70, definida por um enovelamento consistindo de dois domínios com a topologia $\beta\beta\beta\alpha\beta\alpha$. Essas enzimas, possivelmente, divergiram a partir de um ancestral comum e todas possuem a capacidade de hidrolisar ATP ou de transferir grupamento fosfato do ATP para outros substratos, gerando grandes alterações conformacionais na estrutura proteica em cada ciclo de reação (HURLEY, 1996). A actina apresenta-se sob duas formas, a forma monomérica ou globular (actina G) e a forma filamentosa (actina F) (BORK et al., 1992). A actina foi primeiramente descrita por Straub (1942), que observou a capacidade de contração da actina quando associada à miosina e actinmiosina. A actina globular possui 2 domínios denominados alfa e beta (ou domínios interior e exterior, em referência à sua posição no filamento), e quatro subdomínios (1, 2, 3 e 4) (BORK et al., 1992; HERMAN et al., 1993). O contato entre os dois principais domínios é pequeno, conseqüentemente, formam-se duas fendas entre eles, a fenda superior, que se liga a nucleotídeos (ATP/ADP) e a cátions divalentes, e a fenda inferior, que é composta por resíduos predominantemente

hidrofóbicos, e constitui o principal local de ligação para a maioria das proteínas que interagem com a actina (Figura 1) (OTTERBEIN et al., 2001).

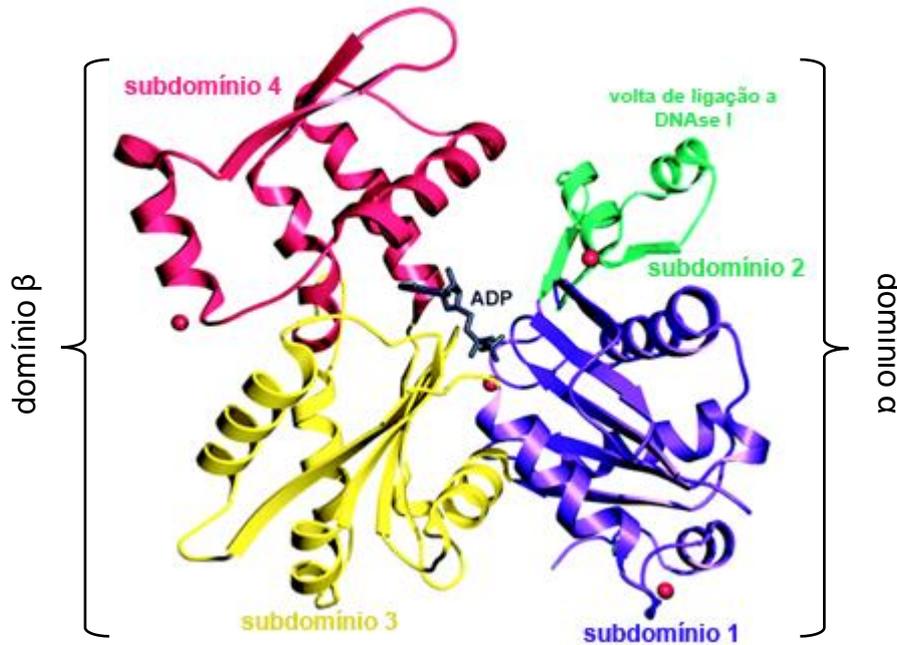


Figura 1: Estrutura cristalina da actina. Representação da estrutura da actina ligada a ADP. Os quatro subdomínios da actina estão representados em diferentes cores: subdomínios 1 (azul), 2 (verde), 3 (amarelo) e 4 (rosa). A volta de ligação a DNase I está localizado na parte superior do subdomínio 2. O ADP está ligado ao centro da molécula, onde os quatro subdomínios de actina se encontram. Quatro íons Ca^{2+} ligados ao monômero de actina nos cristais são representados como esferas vermelhas. Um dos íons Ca^{2+} , denominado primário ou catalítico, está ligado em estreita associação com o nucleotídeo. Os outros três estão ligados aos subdomínios 1, 2 e 4 na superfície da molécula. ADAPTADO DE: OTTERBEIN et al., 2001.

A montagem do filamento de actina é um evento dinâmico e complexo, que envolve uma grande quantidade de proteínas, sinais moleculares internos e externos e uma quantidade mínima de actina G, chamada de concentração crítica. Para iniciar a montagem de filamentos de actina, também denominados de microfilamentos, extremidades livres são formadas por eventos de descapeamento ou corte de filamentos existentes ou por nucleação, que é iniciada com a ligação entre duas moléculas de actina seguida pela ligação a uma terceira molécula, que estabiliza o grupo e oferece condições para o crescimento do filamento. Após a formação das extremidades, ocorre a fase de crescimento, onde novos monômeros são adicionados

à cadeia principal, seguida pela fase de equilíbrio ou *treadmilling*, na qual o filamento de actina torna-se polarizado, ou seja, em uma das extremidades ocorre a adição de novos monômeros (extremidade positiva) e na outra ocorre a saída de monômeros (extremidade negativa) (Figura 2). Isto ocorre devido a diferenças nas taxas de polimerização nas duas extremidades, onde na extremidade positiva ocorre crescimento rápido, e na extremidade negativa ocorre crescimento lento, com maior taxa de dissociação de subunidades (ALBERTS et al., 2017).

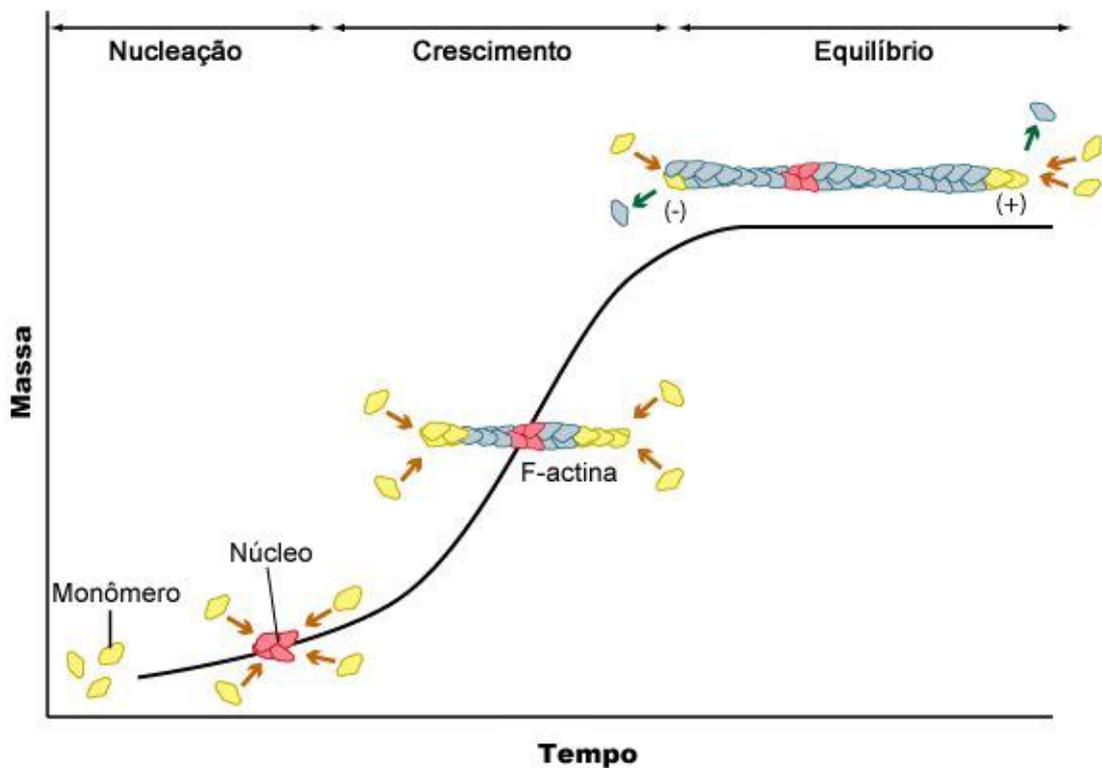


Figura 2: Três fases da polimerização da actina. Nucleação, crescimento e fase de equilíbrio. ADAPTADO DE: Mechanobiology Institute, Universidade Nacional de Singapura. Three phases of filament assembly.

Disponível em: <http://mbinfo.mbi.nus.edu.sg/figure/1384243097065/>

A diferença nas taxas de crescimento das extremidades é causada por alterações na conformação dos monômeros ao entrar no polímero. Cada monômero de actina é ligado a uma molécula de ATP, que é hidrolisado a ADP ao ser adicionado no filamento. Uma vez ligada a ADP, a afinidade entre as subunidades vizinhas de

actina é reduzida e torna-se mais provável a dissociação a partir de ambas as extremidades. Com isto, a velocidade de dissociação é independente da concentração dos monômeros, enquanto que a velocidade de polimerização é dependente da concentração dos monômeros livres, dada pela fórmula $C \times K_{on}$ (C = concentração de monômeros livres; K_{on} = monômeros adicionados ao filamento), resultando em um equilíbrio na concentração crítica de monômeros (C_c) onde $K_{of} = C_c \times K_{on}$ (K_{of} = monômeros dissociados do filamento) (ALBERTS et al., 2017).

A nucleação da actina é um evento cineticamente desfavorável, e para que este evento ocorra, diversos fatores estão envolvidos, dentre eles as ARPs (Actin-Related Proteins) (POLLARD & BORISY, 2003; CAMPELLONE & WELCH, 2010). ARPs são proteínas cuja sequência primária apresenta semelhança com a da actina. A semelhança entre as ARPs e as actinas convencionais varia entre 17 a 60% (SCHAFER & SCHROER, 1999). A nomenclatura das ARPs é dada de acordo com a relação de suas sequências com as de actinas convencionais (SCHROER et al., 1994). As proteínas relacionadas à actina mais bem caracterizadas são as Arp1, Arp2 e Arp3.

A Arp1 é o principal componente da dinactina, um complexo proteico com múltiplas subunidades responsável pelo tráfego de vesículas ao longo dos microtúbulos, mediado por dineína. É a única ARP capaz de formar microfilamentos curtos, com cerca de 8 a 10 monômeros (SCHAFER et al., 1994). Outra ARP que compõe este complexo é a Arp11, que parece ser responsável pela interação com a extremidade negativa do microfilamento de Arp1 (SCHAFER & SCHROER, 1999).

O complexo formado pelas Arp2 e Arp3 possui papel importante na montagem dos filamentos de actina, tanto na nucleação, quanto na ramificação e estabilização da extremidade negativa (SCHAFER & SCHROER, 1999, GOLEY & WELCH, 2006).

Outras ARPs possuem atividades não relacionadas ao citoesqueleto, como é o caso das ARPs nucleares (Arp4, Arp5, Arp6, Arp7, Arp8 e Arp9), que apresentam papel importante na regulação da transcrição gênica e estão envolvidas em controles epigenéticos (SCHAFER & SCHROER, 1999; SHEN et al., 2000; MULLER et al., 2005; CHEN et al., 2007).

Diversas proteínas também participam na regulação da polimerização/despolimerização da actina. Em geral, a concentração citoplasmática de actina G é muitas vezes superior à concentração crítica, o que em tese poderia levar à polimerização total da actina. Entretanto, monômeros de actina por vezes encontram-

se ligados à timosina, uma proteína que impede a hidrólise do ATP e a ligação do monômero ao filamento. A profilina por sua vez, estimula a ligação dos monômeros à extremidade positiva do filamento e, conseqüentemente, o crescimento de um filamento. Esta proteína compete com a timosina pela ligação à actina G e responde a diversos estímulos, tais como elevação na concentração de AMPc (3´5´-adenosina-monofosfato-cíclico). O balanço entre as moléculas de actina G ligadas a timosina ou a profilina resulta na instabilidade dinâmica dos filamentos (Figura 3) (POLLARD & BORISY, 2003; CAMPELLONE & WELCH, 2010).

Além de ser regulada por fatores proteicos, íons Mg^{2+} e ATP, a actina também é regulada por alterações covalentes de seus aminoácidos. Dentre as alterações estão a acetilação, a ADP-ribosilação, arginilação, glicosilação, metilação, fosforilação. Estas modificações pós-traducionais podem facilitar ou impedir a interação com outras moléculas, regulando assim os eventos de polimerização e despolimerização dos filamentos de actina (TERMAN & KASHINA, 2013).

As toxinas que interagem com a actina são amplamente utilizadas para compreender a dinâmica normal de polimerização/despolimerização dos filamentos. Dentre os principais compostos que interferem nesta dinâmica estão a faloidina e a citocalasina. A faloidina é uma droga extraída do cogumelo *Amanita phalloides*, capaz de formar ligações laterais com microfilamentos, estabilizando-os, e impedindo a sua despolimerização. Uma variação da faloidina é a falacidina, um derivado fluorescente que permite a visualização dos filamentos por microscopia de fluorescência. A citocalasina, por sua vez, liga-se especificamente aos monômeros impedindo a sua adição ao filamento. Com isto, e devido à dinâmica de polimerização/despolimerização, os microfilamentos acabam sendo todos despolimerizados, levando a célula a perder sua forma característica, tornando-se arredondada, e a desprender-se do substrato.

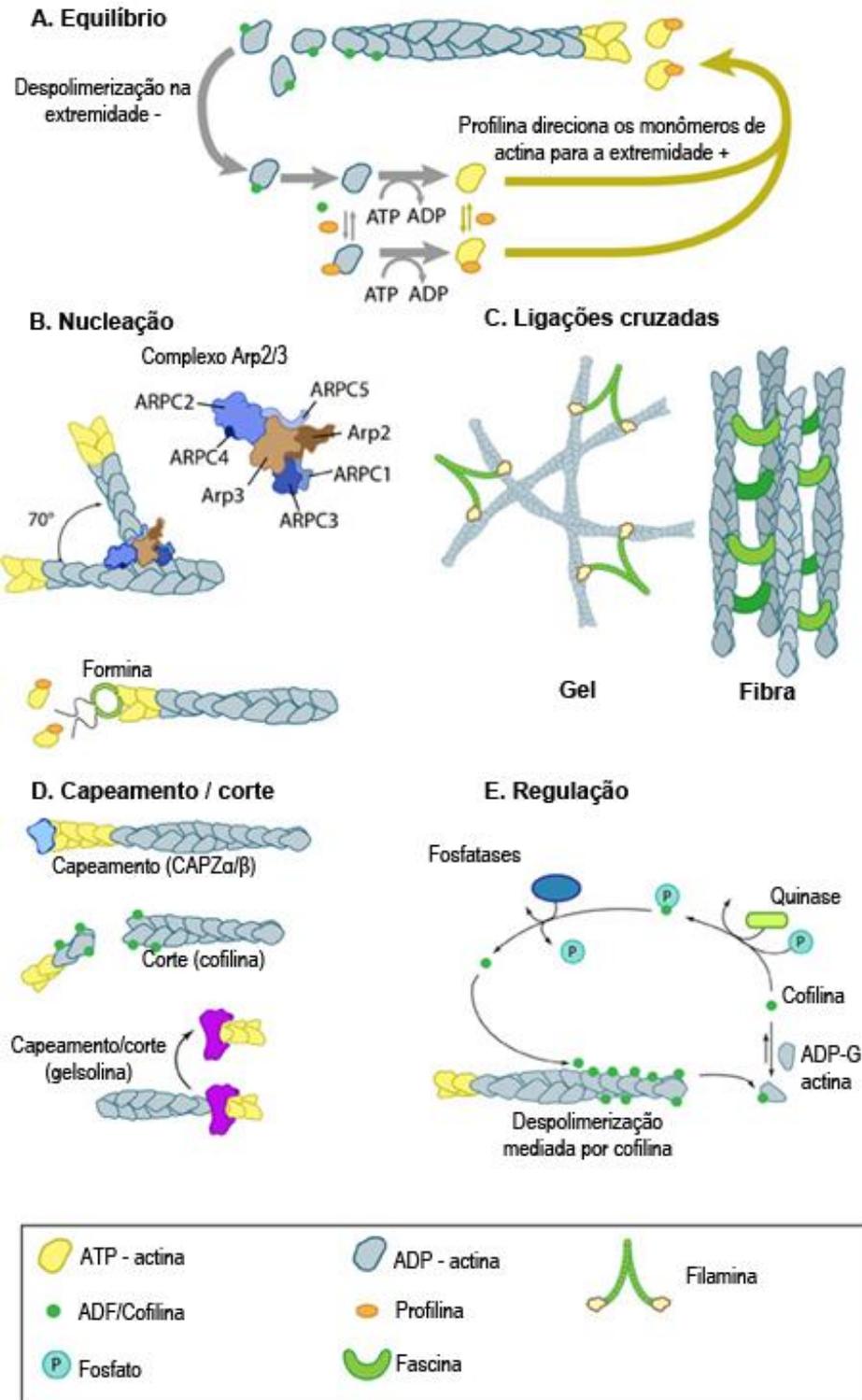


Figura 3: Proteínas de ligação à actina influenciam na sua dinâmica. (A) o equilíbrio dos filamentos de actina pode ser alterado pela ligação a profilina ou a cofilina. (B) novos filamentos são nucleados pelo complexo ARP2/3, que liga os monômeros de actina à lateral dos filamentos para formar novos ramos. (C) proteínas de ligação a actina influenciam a organização de filamentos de actina em estruturas secundárias. (D) proteínas de capeamento e corte promovem a desmontagem de filamentos de actina. (E) filamentos de actina podem ser modulados pela hidrólise controlada de nucleotídeos (ATP) e modificações reversíveis como fosforilação.

ADAPTADO DE: Mechanobiology Institute, Universidade Nacional de Singapura.

Muitos organismos possuem múltiplos genes que codificam isoformas de actina. Em mamíferos, por exemplo, existem pelo menos seis isoformas de actina, entre actinas musculares e não musculares, sendo três isoformas de actina α , duas de actina γ e uma actina β (VANDEKERCKHOVE & WEBER, 1978). Diferentes isoformas de actina de um mesmo organismo desempenham funções celulares especializadas. Os mecanismos pelos quais diferentes isoformas de actina desempenham diferentes funções celulares são: as interações com outras proteínas, que podem se ligar especificamente a uma isoforma ou à outra, e a localização em regiões subcelulares distintas (PERRIN & ERVASTI, 2010).

2.2 ACTINA DE PROTOZOÁRIOS

Actinas de protozoários são consideradas não convencionais (GUPTA et al., 2015). Filogeneticamente, as actinas dos grupos das amebas, apicomplexa e de tripanosomatídeos formam três clados distintos (Figura 4). Actinas de amebas são mais conservadas, e juntamente com as actinas de humanos e de coelhos formam o clado 1. As actinas de apicomplexa formam o clado 2 e as actinas de tripanosomatídeos formam o clado 3. As actinas de *T. brucei*, *T. cruzi* e *Leishmania major* possuem aproximadamente 70% de identidade de aminoácidos com a actina humana (GUPTA et al., 2015). O genoma desses tripanosomatídeos codifica para várias isoformas de actina (Figura 5). A maioria dos genes presentes em *T. cruzi* são compartilhados com *T. brucei* e com *L. major*, porém os genes *TcAct2* e *TcAct3* não possuem ortólogos nem em *T. brucei*, nem em *L. major*, e o gene *TcAct4* não possui ortólogo em *T. brucei* (CEVALLOS et al., 2011).

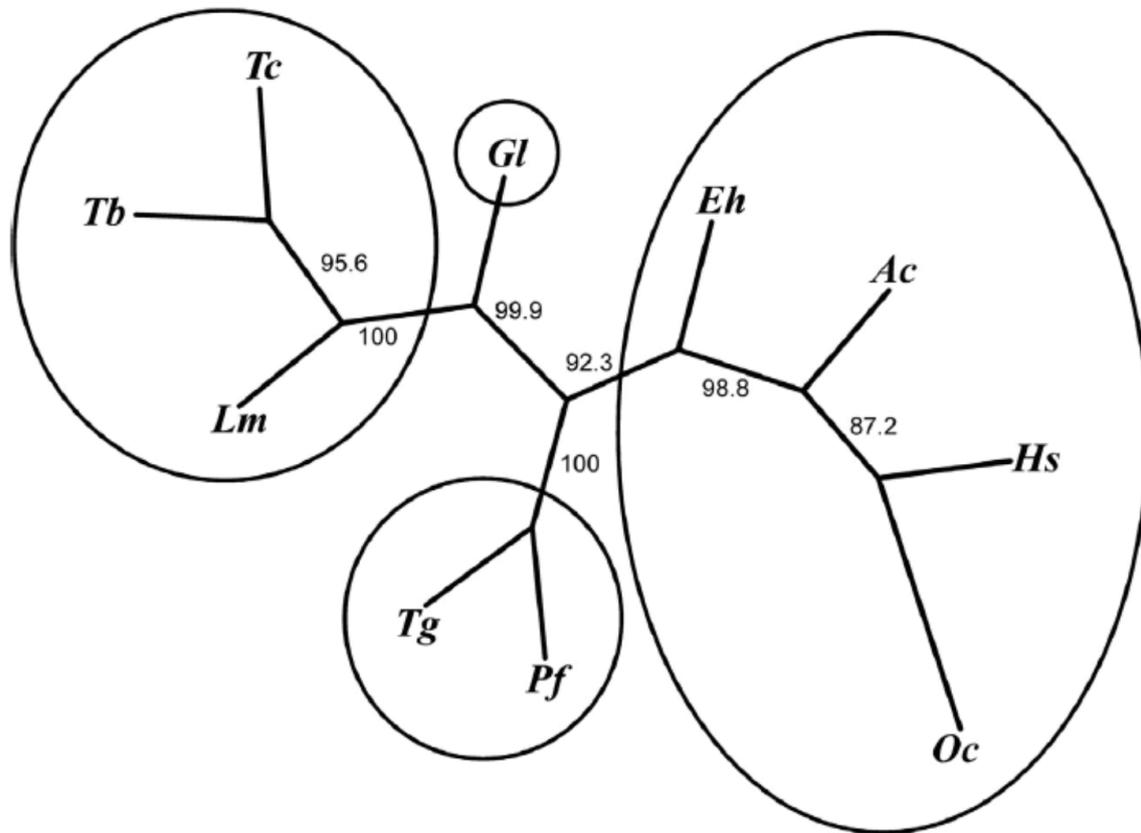


Figura 4: Árvore filogenética de actinas. Actinas de humanos (Hs), coelho (Oc), Acanthamoeba (Ac), Entamoeba (Eh), Plasmodium falciparum (Pf), Toxoplasma gondii (Tg), Leishmania major (Lm), Trypanosoma brucei (Tb), Trypanosoma cruzi (Tc) e Giardia lamblia (Gl). As porcentagens de *Bootstrap* são dadas ao longo da árvore. As espécies estão circuladas de acordo com o clado que formam.

FONTE: Gupta et al., 2015.

Locus	<i>T. cruzi</i> locus tag	Annotation	Protein ID	Identity (I) Similarity (+)	<i>T. brucei</i> Orthologue (protein ID)	<i>L. major</i> Orthologue (protein ID)	MW ^a	pl ^a	# aa	Haplotype	Chr ^b
1 ^c	Tc00.1047053510571.30	Actin, putative	AAP97326	I = 100%	Tb9.211.0620 (EAN76875)	LmjF04.1230 (CAC22667)	42.0	5.5	376	non-E	8
	Tc00.1047053510571.39	Actin, putative	AAP97327	+ = 100%			42.0	5.5	376	non-E	
	Tc00.1047053510127.79	Actin, putative	AAP97329		Tb9.211.0630 (EAN76876)		42.0	5.5	376	Esmeraldo	
2	Tc00.1047053507969.50	Actin 2, putative	EAN87645	I = 51%	Not present	Not present	43.6	4.9	392	non-E	35
	Tc00.1047053507129.10	Actin 2, putative	EAN84193	+ = 71%			43.6	4.9	392	Esmeraldo	
3	Tc00.1047053510945.30	Actin, putative (actin 3) ^d	EAN86458	I = 39%	Not present	Not present	42.8	5.3	390	E = non-E	26
				+ = 59%							
4	Tc00.1047053511463.4	actin, putative (actin 4) ^d	♦	I = 32%	Not present	LmjF35.0790 (AAZ14306)				non-E	38
	Tc00.1047053503841.40	Actin, putative (actin 4) ^d	EAN85934	+ = 48%			45.9	6.7	426	Esmeraldo	

Figura 5: Actinas de *T. cruzi*. MW e pl são teóricos, os valores foram derivados da sequência de aminoácidos deduzida de *T. cruzi* dos genes anotados. Chr = número do cromossomo.

FONTE: Cevallos et al., 2011.

As actinas mais bem estudadas são as actinas dos Apicomplexa *Plasmodium* e *Toxoplasma* (GUPTA et al., 2015). *Plasmodium* spp. expressa duas isoformas de actina, a actina I, mais abundante e expressa ao longo do ciclo de vida do parasita, e a actina II, presente apenas nos gametócitos e esporozoítos (WESSELING et al., 1988; DELIGIANNI et al., 2011). A actina I é responsável pela mobilidade e invasão das células hospedeiras pelos parasitas (MILLER et al., 1979; WETZEL et al., 2003), enquanto a actina II só é necessária na gametogênese (VAHOKOSKI et al., 2014). As actinas de *Plasmodium* hidrolisam ATP de forma eficiente e, ao contrário das actinas canônicas, formam oligômeros curtos (VAHOKOSKI et al., 2014).

T. gondii, ao contrário de *Plasmodium* spp., tem apenas uma isoforma de actina, que é 93% idêntica à actina I de *Plasmodium* (GUPTA et al., 2015). Apesar do seu alto potencial de polimerização, a maior parte da actina de *T. gondii* está presente como monômeros, sugerindo apenas uma ocorrência transitória de filamentos de actina nesses parasitas (DOBROWOLSKI et al., 1997).

Em *T. gondii*, foi demonstrada a presença de extensas redes de actina que conectam parasitas entre si e também com a membrana do vacúolo parasitóforo (PERIZ et al. 2017). A actina do parasita foi necessária para transportar moléculas entre os parasitas dentro de um vacúolo. Quando a actina foi depletada, a rede entrou em colapso e os parasitas começaram a se replicar em diferentes momentos e perderam a habilidade de sair da célula hospedeira (PERIZ et al. 2017).

A prospecção do genoma dos principais tripanosomatídeos patogênicos (*T. brucei*, *T. cruzi* e *Leishmania*) mostrou a presença de genes que codificam a actina e um repertório limitado de proteínas de ligação à actina que incluem ADF/cofilina, profilina, twinfilina, forminas, coronina, CAP/Srv2 e miosinas. Curiosamente, os genes que codificam algumas proteínas componentes do complexo Arp2/3 de nucleação de filamentos, tampão de filamentos (CapZ) e proteínas de reticulação de filamentos estão faltando no genoma desses parasitas (DE MELLO et al. 2008; GUPTA et al., 2015).

Em *Leishmania donovani*, a actina está presente não apenas no citoplasma, regiões corticais, flagelo e núcleo, mas também está localizada no cinetoplasto onde se associa ao DNA do cinetoplasto (kDNA) (SAHASRABUDDHE et al., 2004; KAPOOR et al., 2010). É sugerido que a actina possui papel no remodelamento do kDNA, uma vez que ensaios *in vitro* revelaram que a actina realiza o corte do DNA, que converte os minicírculos de kDNA concatenados em sua forma aberta (KAPOOR

et al., 2010).

Em *T. brucei*, a actina está envolvida nos processos de endocitose e tráfego vesicular (GRACIA-SALCEDO et al., 2004). A distribuição subcelular da actina difere entre as formas sanguínea e procíclica. Nas formas procíclicas, a actina está distribuída por todo o corpo celular. Em contraste, nas formas sanguíneas, a actina está concentrada na região posterior, entre o núcleo e o cinetoplasto, com marcação compatível com o caminho endocítico. De fato, foi demonstrado que a actina co-localiza com marcadores de endocitose. Em formas sanguíneas, o silenciamento da expressão da actina por RNAi resulta na parada da atividade endocítica e no tráfego vesicular pela bolsa flagelar (GRACIA-SALCEDO et al., 2004).

2.3 O CICLO DE VIDA DO *T. cruzi*

Trypanosoma cruzi pertence à Família Trypanosomatidae, Ordem Kinetoplastida (Filo: Euglenozoa, Classe: Kinetoplastea) (CAVALIER-SMITH, 2010), a qual abrange protozoários flagelados que possuem mitocôndria única contendo uma região especializada que concentra todo o DNA mitocondrial, denominada cinetoplasto. Além da arquitetura única do DNA mitocondrial, os protozoários da Ordem Kinetoplastida possuem outras características peculiares, tais como: *trans-splicing* do mRNA transcrito, organização dos genes em *clusters* e compartimentalização da glicólise (HANNAERT et al. em 2003; CAMPBELL et al., 2003; SIMPSON et al., 2004; LUKES et al., 2005; SIMPSON et al., 2006).

Todos os membros da família Trypanosomatidae possuem um flagelo único, que emerge de uma invaginação da membrana, denominada bolsa flagelar. Além disto, todos os membros caracterizam-se por serem exclusivamente parasitas (PODLIPAEV, 2001). O gênero *Trypanosoma* constitui um dos mais importantes da Família Trypanosomatidae, pois inclui os agentes etiológicos de importantes enfermidades humanas, tais como a doença de Chagas (*T. cruzi*), e a doença do sono (*T. brucei*) (HIDE, 1999).

O ciclo de vida do *T. cruzi* inclui um hospedeiro invertebrado e um hospedeiro vertebrado, que por vezes pode ser o homem. Os principais hospedeiros invertebrados são triatomíneos dos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*, popularmente conhecidos como “barbeiros”. Estes insetos são também os principais

vetores da doença de Chagas. As fêmeas são hematófagas e, uma vez contaminadas, liberam as formas infectantes tripomastigotas metacíclicas nas fezes durante o repasto sanguíneo. Os tripomastigotas metacíclicos podem entrar no hospedeiro pelo local da picada ou por solução de continuidade da pele. Uma vez no hospedeiro, esta forma invade uma célula e diferencia-se para amastigota, forma replicativa. Os amastigotas multiplicam-se por divisão binária, diferenciam-se em tripomastigotas sanguíneos e rompem a célula hospedeira. Os tripomastigotas sanguíneos podem invadir outras células adjacentes ou atingir a corrente sanguínea e infectar diferentes tecidos e tipos celulares, repetindo o ciclo replicativo. O triatomíneo é infectado quando se alimenta do sangue de um mamífero contaminado pelo parasita. No intestino do hospedeiro invertebrado, ocorre a diferenciação para a forma replicativa epimastigota, que se multiplica por divisão binária e migra para a porção posterior do intestino onde diferencia-se para tripomastigota metacíclico, reiniciando o ciclo (Figura 6) (revisado por TYLER & ENGMAN, 2001).

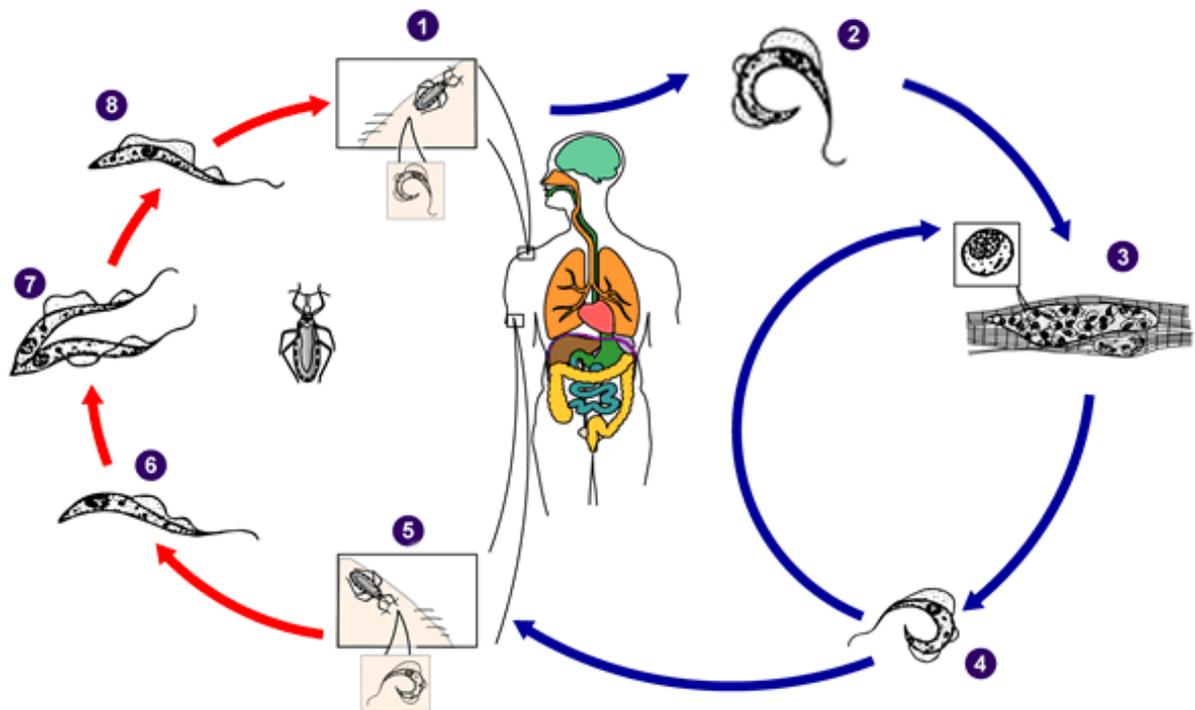


Figura 6: Ciclo de vida do *T. cruzi*. (1) durante o repasto sanguíneo, o inseto triatomíneo infectado libera tripomastigotas metacíclicos em suas fezes perto do local da picada. Os tripomastigotas metacíclicos entram no hospedeiro vertebrado através da ferida ou através de mucosas. (2) dentro do hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas metacíclicos invadem as células próximas e se diferenciam em amastigotas intracelulares. (3) os amastigotas se multiplicam por fissão binária e (4) diferenciam-se em tripomastigotas sanguíneos, que são liberados para circulação. Os tripomastigotas sanguíneos

infectam células de uma variedade de tecidos e se transformam em amastigotas intracelulares em novos locais de infecção. As manifestações clínicas podem resultar deste ciclo infeccioso. (5) durante o repasto sanguíneo outro triatomíneo é infectado pela ingestão de sangue contendo parasitas circulantes. (6) os tripomastigotas sanguíneos ingeridos se diferenciam em epimastigotas no intestino médio do vetor e se multiplicam (7). (8) no intestino posterior, os parasitas diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos e o ciclo reinicia.

ADAPTADO DE: Centers for Disease Control and Prevention

2.4 ACTINAS DE *T. cruzi*

O papel da actina permanece pouco compreendido em *T. cruzi*. No genoma de *T. cruzi* estão anotados 4 genes que codificam actinas putativas. Essas actinas foram didaticamente nomeadas de 1 a 4. A TcActina 1 (TcAct1) é a isoforma mais conservada, mesmo quando comparada a outros organismos, incluindo humanos, enquanto que a TcActina 4 (TcAct4) é a menos conservada, estando filogeneticamente mais próxima às ARPs do que à actina propriamente dita (CEVALLOS et al., 2011). A TcAct1 é a única que possui ortólogos tanto em *T. brucei* quanto em *L. major* (CEVALLOS et al., 2011).

A prospecção do genoma de *T. cruzi* revelou que as principais proteínas que participam dos processos de nucleação e de *treadmilling* da actina em eucariotos superiores estão conservadas, indicando que a maquinaria básica necessária para a formação do filamento está codificada no genoma deste parasita (DE MELO et al., 2008). O fato de microfilamentos nunca terem sido observados em *T. cruzi* pode se dar devido a fatores tais como a instabilidade do filamento ou montagem ineficiente (DE MELO et al., 2008). De Melo (2008) observou que, apesar da estrutura global da TcAct1 ser conservada em relação às actinas de outros eucariotos, a maioria das substituições de aminoácidos encontradas está na superfície do monômero, em geral nos loops responsáveis pela interação monômero-monômero durante a formação do filamento.

Ainda que a actina seja uma proteína altamente conservada, actinas de protistas são bem menos conservadas, não só quando comparadas às actinas convencionais de organismos multicelulares, mas também às variantes de um mesmo organismo (SEHRING et al., 2007). Essa característica é também observada em *T. cruzi*, onde a similaridade entre as isoformas de actinas é inferior a 70% (CEVALLOS et al., 2011).

Os primeiros estudos sobre a actina de *T. cruzi* centraram esforços na identificação e determinação da localização subcelular dessa proteína no parasita, utilizando anticorpos heterólogos contra a actina de outros organismos. Anticorpos contra a actina de coelho detectaram uma proteína de 43 kDa (MORTARA, 1989), enquanto que anticorpos contra a actina de *Entamoeba histolytica* mostraram uma reação positiva no flagelo de *T. cruzi* (DE SOUZA et al., 1983), levantando à hipótese da presença de actina na estrutura paraflagelar. Entretanto, trabalhos subsequentes não encontraram actina em frações purificadas de estrutura paraflagelar (DE MELLO et al., 2008). Mais recentemente, a localização subcelular da actina foi avaliada utilizando um anticorpo homólogo contra a TcAct1 nas diferentes formas de desenvolvimento deste parasita. Este ensaio revelou muitas estruturas arredondadas e lineares, distribuídas ao longo do citoplasma, e que não tinham associação com microtúbulos subpeliculares ou com o DNA nuclear ou do cinetoplasto (DE MELLO et al. 2008; CEVALLOS et al., 2011).

Alterações no padrão de expressão de actina durante o desenvolvimento também foram relatadas. Cevalos e colaboradores (2011) detectaram, por imunofluorescência, diferenças na distribuição subcelular da TcAct1 entre os estágios do ciclo de vida do parasita. Em formas epimastigota, a actina está distribuída por todo o corpo celular, com concentrações da marcação próximas à região da bolsa flagelar e ao longo do flagelo. Em tripomastigotas, a marcação se mostrou fraca e uniformemente distribuída por toda a célula. Nas formas amastigotas, a distribuição da actina é heterogênea, tendendo a se acumular ao redor da membrana celular.

Trabalhos do nosso grupo de pesquisa determinaram a localização subcelular da TcAct2, que está concentrada na região perinuclear das formas epimastigotas (BORGES, 2016), embora não tenha sido determinada a sua localização em todas as formas evolutivas do parasita.

Excetuando-se, pois, as análises de localização subcelular, nada é conhecido sobre o papel que cada uma das actinas desempenha em *T. cruzi*, bem como de sua importância durante o ciclo de vida do parasita. A compreensão das funções das isoformas de actina em *T. cruzi* pode fornecer dados relevantes sobre a biologia celular deste parasita, bem como abrir novos caminhos para a pesquisa de fármacos. Dessa forma, esse trabalho tem como objetivo a caracterização funcional da actina 4 de *T. cruzi*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo geral a caracterização funcional da actina 4 de *T. cruzi*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o padrão de expressão da actina 4 nas diferentes formas de desenvolvimento do parasita por ensaios de *western blot*;
- Determinar a localização subcelular da actina 4 nas diferentes formas de desenvolvimento do parasita através de análises de microscopia eletrônica e de fluorescência;
- Avaliar o fenótipo da linhagem nocaute para o gene da actina 4 obtido através da técnica de CRISPR-Cas9;
- Determinar as proteínas que interagem com a actina 4 através de técnicas de imunoprecipitação e espectrometria de massas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CULTIVO DE *Escherichia coli*

As cepas de *E. coli* foram cultivadas em meio LB a 37 °C (SAMBROOK et al., 1989), sob agitação à 200 rpm. O meio sólido utilizado para o cultivo foi obtido pela adição de ágar (15 g/L) ao meio LB.

4.2 CÉLULAS QUIMIO-COMPETENTES

Para o preparo de células quimio-competentes, as cepas de *E. coli* BL21 e TOP10 foram cultivadas em meio LB, contendo os antibióticos adequados, a 37 °C sob agitação à 200 rpm, até atingir uma D.O._{600nm} de 0,5. A cultura foi mantida por 15 minutos no gelo e centrifugada a 3.000 x g, 4 °C, durante 10 minutos. As células foram ressuspensas em 50 mL de solução contendo CaCl₂ 100 mM e HEPES 10 mM, e incubadas em gelo por aproximadamente 2 horas. As células foram centrifugadas novamente e o *pellet* foi ressuspensão em 2 mL da solução de ressuspensão (CaCl₂ 100 mM, HEPES 10 mM e glicerol 10%). As células foram aliquotadas e congeladas a - 80 °C.

Para as transformações, 5 µL de DNA plasmidial foram adicionados a 50 µL de células quimio-competentes e incubadas em gelo por 30 minutos. O choque térmico de 1,5 minutos a 42 °C foi seguido de resfriamento em gelo por 2 minutos. As células foram recuperadas em meio LB a 37 °C, durante 1 hora. Posteriormente, as células foram semeadas em meio LB sólido contendo os antibióticos apropriados.

4.3 CULTIVO DE *Trypanosoma cruzi*

Formas epimastigotas de *T. cruzi* da cepa CL (BRENER & CHIARI, 1963) e do clone Dm28c (CONTRERAS et al., 1985, CONTRERAS et al., 1988) foram mantidas em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) (CAMARGO, 1964) a 28 °C, com passagens a cada três dias mediante inóculos de 1 x 10⁶ células/mL. Quando necessário, as formas epimastigotas foram coletadas por centrifugação no terceiro dia de cultivo (correspondente à fase logarítmica de crescimento), quando a densidade celular se

apresentou entre $1 - 3 \times 10^7$ células/mL. Para o ensaio de imunoprecipitação foi utilizado o clone Dm28c, para os demais ensaios foi utilizada a cepa CL de *T. cruzi*.

As formas tripomastigotas metacíclicas foram obtidas através do processo de diferenciação *in vitro* (BONALDO et al., 1988). Para isto, formas epimastigotas foram cultivadas em meio LIT até atingirem o início da fase estacionária e coletadas por centrifugação a $3.000 \times g$ por 10 minutos. Os parasitas foram submetidos ao estresse nutricional em meio TAU (Triatomine Artificial Urine) por 2 horas a 28°C na concentração de 5×10^8 células/mL. Após o estresse nutricional, os parasitas foram submetidos à diferenciação em meio TAU3AAG (meio TAU suplementado com 10 mM L-prolina 10, 50 mM glutamato sódico, 2 mM aspartato sódico e 10 mM glicose) na densidade de 5×10^6 parasitas/mL por 6 dias a 28°C . O sobrenadante do meio de diferenciação foi coletado e centrifugado por 15 minutos a $3.000 \times g$. Os parasitas foram contados em câmara de Neubauer.

Para a obtenção de tripomastigotas e amastigotas derivados de infecção *in vitro*, células VERO (ATCC® número: CRL-2783™) foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina 100 UI/mL, estreptomicina 10 µg/mL e glutamina 2 mM a 37°C com 5% de CO_2 . Culturas de células VERO com confluência entre 50% – 70% foram infectadas com formas tripomastigotas metacíclicas na razão de 100 parasitas para cada célula hospedeira em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium). Após 4 horas de interação, os parasitas livres no sobrenadante foram retirados com a troca do meio. Para liberação dos amastigotas intracelulares, as células VERO foram lisadas 48 horas após a infecção pelo método de cavitação, utilizando 180 psi de pressão por 5 minutos com uma bomba SPAN com gás nitrogênio pressurizado (*Parr Instrument Company*™). Células VERO não lisadas foram removidas por centrifugação a $800 \times g$ por 10 minutos, e os amastigotas foram recuperados do sobrenadante conforme descrito previamente (BATISTA et al., 2015). Para a obtenção das formas tripomastigotas, as culturas de células VERO infectadas foram incubadas por 4 dias e o sobrenadante foi coletado e centrifugado por 15 minutos a $3.000 \times g$.

4.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO PROTEICO DE *T. cruzi*

Os parasitas foram contados, lavados em PBS, centrifugados por 5 minutos a 3.000 x g e ressuspensos em uma concentração final de 1 x 10⁶ parasitas/mL em tampão de amostra [Tris HCl 40 mM, SDS 1%, β-mercaptoetanol 2,5%, Glicerol 6%, azul de bromofenol 0,005%, 1 mM PMSF e 10 μM E-64 ou coquetel de inibidores de proteases (Sigma®) em PBS]. Em seguida, as amostras foram fervidas por 5 minutos. Os extratos foram mantidos a -20 °C.

4.5 *Western blot*

Western blot foi realizado de acordo com protocolo de Towbin e colaboradores (1979), com modificações. Os extratos proteicos de *T. cruzi* (5 x 10⁶ células/poço) foram separados por SDS-PAGE e transferidos para uma membrana de nitrocelulose (Optitran BA-S 83; GE Healthcare Life Sciences) em tampão de transferência para *western blot* (Tris-base 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20%). A membrana foi bloqueada com solução de bloqueio (PBS pH 8,0/Tween 0,05% e leite desnatado 4%). Após o bloqueio, a membrana foi lavada por 3 vezes com PBS/Tween e incubada com o anticorpo primário diluído em solução de bloqueio por uma hora a temperatura ambiente. Após esse tempo a membrana foi lavada por 3 vezes com PBS/Tween, incubada com o anticorpo secundário diluído na solução de bloqueio por 1 hora à temperatura ambiente e lavada por 3 vezes com PBS/Tween. Os imunocomplexos foram revelados por quimioluminescência pela atividade da peroxidase (SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate; Thermo Scientific) e fotodocumentada em transluminador L-Pix Chemi Express (Loccus Biotecnologia, São Paulo – SP).

4.6 EXTRAÇÃO DE DNA DE *T. cruzi*

A obtenção do DNA foi realizada mediante extração em pequena escala utilizando cloreto de lítio. Para isso, foi utilizada cultura de 3 dias de *T. cruzi* (aproximadamente 1 x 10⁷ parasitas por mL). Da cultura foi retirado 1 mL, centrifugado

por 5 minutos a 6.000 x *g*. O *pellet* foi lavado 2 vezes com PBS, ressuspenso em 500 μ L de TELT (Tris-HCl 50 mM, EDTA 62,5 mM, LiCl 2,5 mM e Triton X-100 4%) e incubado por 5 minutos, invertendo o tubo algumas vezes. Foram adicionados 300 μ L de fenol/clorofórmio e o material foi centrifugado a 13.000 x *g* por 5 minutos. A fase superior da solução foi coletada e transferida para um novo tubo, onde foram adicionados mais 300 μ L de fenol/clorofórmio e o material foi centrifugado novamente. A fase aquosa foi coletada, seguida da adição de 2 volumes de etanol 100%. O material foi centrifugado por 5 minutos a 9.000 x *g*. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 1 mL de etanol 70% e centrifugado novamente. O sobrenadante foi descartado e o DNA foi desidratado em termobloco a 42 °C. O *pellet* foi ressuspenso em 50 μ L de TE/RNase (Tris HCl 10 mM pH 7,4, EDTA 1 mM pH 8, RNase 1 μ g/mL).

4.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

As reações de PCR foram realizadas em solução contendo dNTP 0,2 mM; MgCl₂ 1,5 mM; tampão da Taq DNA polimerase 1x (Invitrogen); 0,5 μ M dos pares de iniciadores; 1 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen), e aproximadamente 100 ng de DNA molde em H₂O ultrapura. As condições da reação foram: um ciclo de desnaturação inicial a 92 °C por 5 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 92 °C por 30 segundos seguido de anelamento a 57 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto; um ciclo de extensão final a 72 °C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram purificados com kit de purificação QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) de acordo com o protocolo do fabricante.

4.8 ELETROFORESE DE DNA

A eletroforese de DNA foi realizada em gel de agarose 1% em cuba horizontal (SAMBROOK et al., 1989). Para a corrida eletroforética, foi utilizado o tampão TBE 1X. Após a corrida, o gel foi tratado com brometo de etídeo (0,5 μ g/mL) e fotodocumentado em transluminador L-PIX EX (Loccus Biotecnologia, São Paulo – SP) sob luz ultravioleta a 312 nm.

4.9 TRANSFEÇÃO DE EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi*

Formas epimastigotas de *T. cruzi* cultivadas por 3 dias foram coletadas por centrifugação. As células (1×10^6) foram ressuspensas em 100 μ L do tampão de eletroporação Tb-BSF (KCl 5 mM, CaCl₂ 0,15 mM, Na₂HPO₄ 90 mM, HEPES 50 mM, pH 7,3) e transferidas para cubetas de eletroporação estéreis. Foram adicionados cerca de 20 μ g do DNA a ser transfectado. Uma cubeta contendo apenas a suspensão de parasitas foi utilizada como controle. As amostras foram transfectadas utilizando o programa U-033 com 1 pulso no eletroporador Amaxa Nucleofector 2b (Lonza Cologne AG, Germany). Após o choque, os parasitas foram transferidos para garrafas de cultura contendo meio LIT e incubados por 24 horas. Após este período, o antibiótico G418 foi adicionado na concentração de 500 μ g/mL. As culturas foram mantidas com passagens até a ausência de proliferação celular na cultura controle (PACHECO-LUGO et al., 2017).

4.10 OBTENÇÃO DO ANTÍSSORO CONTRA TcAct4 RECOMBINANTE

Para a obtenção de soro policlonal, três camundongos da linhagem Swiss (30 a 45 dias de vida) foram inoculados com a proteína TcAct4 recombinante previamente obtida (ROSA, 2015).

Antes das imunizações, foi retirado o soro pré-imune da veia caudal de todos os animais para teste de reatividade do soro. Os camundongos foram imunizados com uma suspensão contendo 50 μ g da proteína recombinante e 77 μ L de adjuvante Alu-Gel (Serva), por via intraperitoneal. Foram realizadas quatro inoculações com intervalo de duas semanas cada. Três dias após a última inoculação, o sangue dos animais foi coletado por punção cardíaca, centrifugado por 10 minutos a 4.000 x g para a coleta do soro, que foi aliquoteado e mantido a - 70 °C.

A especificidade do soro produzido foi verificada por ensaio de *Western blot* e imunofluorescência.

O uso de animais seguiu as normas do Comitê de Ética para Utilização de Animais da Fiocruz (CEUA protocolo P-47/12-3, licença LW 15/13).

4.11 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE TcAct4

O perfil de expressão da TcAct4 foi analisado por *Western blot*, conforme item 4.5, onde extratos proteicos de formas epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos, amastigotas e tripomastigotas celulares de *T. cruzi* foram submetidos a separação proteica por SDS-PAGE e transferidos para membrana de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com o antissoro anti-TcAct4 na diluição de 1:500. Após 3 lavagens em PBS, as membranas foram incubadas com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Anti-Mouse IgG (whole molecule)–Peroxidase antibody produced in goat; Sigma-Aldrich) na diluição de 1:10.000. A membrana foi revelada por quimioluminescência pela atividade da peroxidase (SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate; Thermo Scientific) e fotodocumentada em transluminador L-Pix Chemi Express (Loccus Biotecnologia, São Paulo – SP).

4.12 IMUNOLocalização por Imunofluorescência

Para os ensaios de imunofluorescência, os parasitas foram fixados em formaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,2 por 30 minutos e depositados em lâminas tratadas com poli-L-lisina. Após 30 minutos de incubação, as lâminas foram lavadas três vezes por 10 minutos (cada lavagem) com PBS e incubadas por 5 minutos com Triton X-100 a 0,1% diluído em PBS à temperatura ambiente. As lâminas foram novamente lavadas com PBS e incubadas em solução de bloqueio (PBS pH 8,0 e BSA 3%) por uma hora a temperatura ambiente. A solução de bloqueio foi retirada e as lâminas foram incubadas, por 1 hora, com o antissoro anti-TcAct4 (produzido em camundongo) ou com o antissoro anti-GFP (produzido em coelho) diluídos em solução de bloqueio (1:150). As lâminas foram lavadas 3 vezes em solução de bloqueio e incubadas por uma hora com o anticorpo secundário apropriado, anti-IgG de camundongo conjugado ao fluorocromo Alexa-Fluor 594 ou 546 ou ao anti-IgG de coelho conjugado ao fluorocromo Alexa-Fluor 488 (Sigma®) diluído em solução de bloqueio (1:600). As lâminas foram lavadas 3 vezes em solução de bloqueio, seguida de 3 vezes em PBS. O corante de DNA Hoechst 33258 foi adicionado na concentração de 1 µg/µL e incubado por 20 minutos. As lâminas foram lavadas em água e seladas com o reagente *Prolong® Gold antifade* com uma lamínula de microscopia ótica, e

observadas em microscópio óptico invertido de fluorescência DMI 6000 B (Leica Biosystems) associado a *software* de deconvolução ou microscópio Confocal Leica SP5 (Leica Biosystems).

4.13 IMUNOCITOQUÍMICA

Para os ensaios de imunocitoquímica, os parasitas foram fixados em solução contendo 4% de paraformaldeído, 0,1% de glutaraldeído em tampão fosfato 0,1 M por 1 hora. Após fixação, os parasitas foram lavados com tampão fosfato 0,1 M, desidratados em concentrações crescentes de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%) e emblocados em resina Lowicryl Monostep (EMS®). Os blocos foram cortados em ultramicrótomo (Leica® EM UC6), e os cortes ultrafinos (70 nm) foram coletados em grades de níquel (EMS®). Os cortes foram bloqueados e hidratados em cloreto de amônio 50 mM por 30 minutos, e bloqueados novamente por 30 minutos em solução de bloqueio (PBS pH 8 e BSA 3%). As grades foram incubadas com anticorpo anti-TcAct4 diluído em solução de bloqueio (1:10) por 1 hora, lavadas com solução de bloqueio e posteriormente incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à ouro coloidal de 15 nm diluído em solução de bloqueio (1:40) por 1 hora. As grades foram lavadas em tampão de bloqueio, PBS pH 8 e água. As amostras foram contrastadas com acetato de uranila 5% em água por 40 minutos e por 5 minutos em citrato de chumbo. As amostras foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão JEM-1400Plus (Jeol USA inc.) operando a 80 KeV.

4.14 OBTENÇÃO DE LINHAGEM DE *T. cruzi* MUTANTE PARA O GENE *TcAct4* (TcAct4 KO)

Os parasitas TcAct4 KO (ID TcCLB.503841.40, www.tritrypdb.org) foram obtidos utilizando o sistema CRISPR-Cas9, conforme descrito anteriormente por Peng e colaboradores (2015). Para isso o oligonucleotídeo iniciador senso Cas9Act4KoF' foi desenhado com o auxílio da plataforma online CRISPR gRNA (guide RNA) - Design Tool for Eukaryotic Pathogens (disponível no site <https://grna.ctegd.uga.edu>), com a qual foi possível identificar e selecionar a sequência do gRNA

(GCAACAGTTGGACGCGTCAT). Na extremidade 5' desta sequência foi adicionado o sítio promotor da T7 RNA polimerase (em azul) e na porção 3' do gRNA foi adicionada a sequência iniciadora senso da sequência *scaffold* (em verde) resultando no primer Cas9Act4KoF' (GGAGGCCGGAGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCAACAGTTGGACGCGTCATGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG). O oligonucleotídeo antissenso *ScaffoldR'* contém a sequência AAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTT. Os oligonucleotídeos Cas9Act4KoF' e *ScaffoldR'* foram utilizados para realizar a reação de amplificação da sequência *scaffold* (inserida no vetor pX330) (PENG et al., 2015), gerando o DNA molde para a reação da transcrição *in vitro* e obtenção do RNA guia. A reação de transcrição foi realizada utilizando o kit Megashortscript (Thermo Fisher Scientific) com 4 µL T7 Transcription 5x Buffer, 6 µL rNTPs, 2 µL Enzyme Mix T7, 10 µg DNA molde em volume final de 20 µL. A reação foi incubada a 37 °C por 4 horas. Após o término da reação, o RNA guia foi precipitado com etanol e ressuspenso em água Ambion® DEPC-treated (Thermo Fisher). A concentração de RNA foi determinada por NanoDrop® (Thermo Scientific). O RNA guia foi mantido a - 80 °C até o momento da transfecção.

Formas epimastigotas de *T. cruzi* expressando a SpCas9 (Peng et al., 2015) foram transfectadas com aproximadamente 20 µg do gRNA para *TcAct4* e 20 µg do DNA molde 5' TGCAACAAATTGAGCAACAGTTGGACGCGTTAGATAGATAGCATTGGCTGAAAA GAGTGTTTTTTGGGTGG 3', que consiste em uma sequência homóloga ao gene alvo *TcAct4*, com a inserção de códons de parada (em vermelho) nas três possíveis fases de leitura.

Três dias após a transfecção, os parasitas foram separados por *sorting single cell* (Citômetro de Fluxo - FACSaria II; Becton & Dickson Biosciences) em placas de 96 poços, contendo 200 µL/poço de meio de cultura. Aproximadamente um mês após a transfecção foi realizada a triagem dos parasitas por PCR, com combinações de oligonucleotídeos iniciadores que anelam somente no DNA dos parasitas *TcAct4* KO ou nos parasitas selvagens (conforme descrito no item 4.7). Para a triagem dos clones foram desenhados o oligonucleotídeo senso Act4F' (TGAAGGTCACAATAGCAGGTGA) que hibridiza tanto no alelo selvagem quanto no alelo mutado, e os oligonucleotídeos antissenso Act4KoR' (TTTCAGCCAATGCTATCTATCTAAC, que hibridiza somente no alelo mutado), e

Act4WTR' (CTCTTTTCAGCCAATGACGC, que hibridiza somente no alelo selvagem). Os possíveis clones nocautes para o gene *TcAct4* foram selecionados e o produto de PCR do gene *TcAct4* destes clones foi sequenciado para confirmação da obtenção dos parasitas nocaute. Após o resultado do sequenciamento foi escolhido um clone da população *TcAct4* KO para as análises seguintes.

4.15 CURVA DE CRESCIMENTO E QUANTIFICAÇÃO DA METACICLOGÊNESE

Formas epimastigotas de *T. cruzi* CL selvagem e *TcAct4* KO foram cultivadas em meio LIT (inóculo de 1×10^6 células/mL). A contagem dos parasitas foi realizada diariamente, por 14 dias, usando o contador Coulter Counter (Beckman Coulter, CA, EUA). As contagens foram realizadas em triplicatas técnicas e os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida de pós teste de Bonferroni usando o *software* GraphPad versão 5 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, EUA).

Para quantificar a metaciclogênese, formas epimastigotas de *T. cruzi* CL selvagem e *TcAct4* KO foram submetidas ao processo de metaciclogênese *in vitro* (conforme descrito no item 4.3). Os tripomastigotas metacíclicos foram contados em câmara de Neubauer após 6 dias de incubação em meio TAU3AAG. As contagens foram realizadas em triplicatas biológicas e os dados foram analisados com o teste *t* usando o *software* GraphPad versão 5 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, EUA).

4.16 AVALIAÇÃO DA INFECTIVIDADE DOS PARASITAS *TcAct4* KO

Células VERO (ATCC® número: CRL-2783™) foram semeadas em placas de 96 poços com uma densidade de 5×10^3 células/poço com formas metacíclicas de *T. cruzi* derivadas *in vitro* (taxa de células hospedeira:parasitas de 1:100). Após 4 horas de interação, as placas foram lavadas duas vezes com PBS, foi adicionado meio DMEM e as placas foram incubadas durante 4 dias a 37 °C em 5% de CO₂. Após a incubação, as placas foram lavadas em PBS e as células foram fixadas durante 5 minutos com metanol gelado. Em seguida, as placas foram incubadas com 100 µL de DAPI ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) em PBS e fotografadas em microscópio óptico invertido de fluorescência Leica com magnificação de 40 X. As imagens foram analisadas com

auxílio do programa Adobe Photoshop CS5.1 para contagem dos amastigotas intracelulares.

Esses dados foram utilizados para calcular o índice de infectividade, usando a seguinte fórmula: índice de infectividade = % células infectadas x número de amastigotas por célula infectada. Os valores do índice de infectividade para cada condição representam dados de triplicatas biológicas com triplicatas técnicas. A análise estatística foi realizada pelo método ANOVA, seguida pelo pós teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer, usando o *software* GraphPad Prism versão 5 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, EUA).

4.17 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Culturas de parasitas selvagem e TcAct4 KO em fase exponencial de 3 dias foram coletadas por centrifugação por 5 minutos a 3.000 x *g* e lavadas duas vezes com PBS. As células foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2 por 40 minutos. Após fixação, o material foi lavado com o mesmo tampão por 2 vezes. Em seguida, as células foram aderidas em lamínulas recobertas com poli-L-lysina 0,01% e pós-fixadas com uma solução contendo tetróxido de ósmio 1%, ferrocianeto de potássio 0,8% e cloreto de cálcio 1 mM em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2 por 30 minutos, no escuro, à temperatura ambiente. Após a incubação, as células foram lavadas 2 vezes com água ultrapura. O material foi desidratado gradativamente em soluções com concentrações crescentes de etanol e mantidos em etanol 100%. Na sequência foi realizada secagem do material pelo método do ponto crítico utilizando equipamento Leica EM CPD300 e a metalização com ouro foi feita em sistema de revestimento Leica EM ACE200. As amostras foram observadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL, modelo JSM6010, operando a 20 kV, utilizando detector de elétrons secundários, com distância de trabalho de 6 mm, e spot size 50.

4.18 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Culturas dos parasitas selvagem e TcAct4 KO em fase exponencial de 3 dias foram coletadas por centrifugação por 5 minutos a 3.000 x g e lavadas duas vezes com tampão fosfato 0,1 M. As células foram fixadas em solução contendo paraformaldeído a 4%, glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 por 40 minutos. Após fixação, o material foi lavado com tampão cacodilato de sódio por 3 vezes. Em seguida, as células foram pós-fixadas com uma solução contendo tetróxido de ósmio 1%, ferrocianeto de potássio 0,8% e cloreto de cálcio 1 mM em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 por 30 minutos, no escuro, à temperatura ambiente. Após a incubação, as células foram lavadas 3 vezes em tampão cacodilato de sódio. O material foi desidratado gradativamente em soluções com concentrações crescentes de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%) e incubado por 16 horas em uma mistura de acetona 100%/Epon EMbed 812 (EMS, Hatfield, PA, USA) na proporção 1:1 (v/v). Após, o material foi incubado por 4 horas em Epon puro e, posteriormente, incluído em novo Epon e polimerizado por 72 horas a 60 °C. Cortes ultrafinos (60 nm) foram obtidos em ultramicrótomo (Leica Reichert Ultracuts). Os cortes foram coletados em grades de cobre de 300 mesh, contrastados por 40 minutos em acetato de uranila a 5% em água, e por 5 minutos em citrato de chumbo. As amostras foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão JEOL, modelo JEM-1400Plus operando a 80 KeV.

4.19 COMPLEMENTAÇÃO GÊNICA

Para a complementação gênica, os parasitas TcAct4 KO foram transfectados com uma cópia ectópica do gene *TcAct4*. Para isso o gene *TcAct4* foi inserido no vetor de entrada da plataforma Gateway®, pDONR221, e posteriormente subclonado em dois plasmídeos distintos: pTcNeoGFP-N e pTcNeoGFP-C, que contém a etiqueta GFP na porção amino-terminal e carboxi-terminal, respectivamente. Ambos os vetores conferem resistência ao antibiótico G418 e foram construídos no ICC.

O gene *TcAct4* foi obtido por PCR de DNA gênomico de *T. cruzi* utilizando o par de oligonucleotídeos iniciadores Act4GWF' 5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCATGCAAAGTACCATCGTGCTG 3'

e Act4GWR' 5'
 GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCGCCACACGGCGGTTGTGCA 3'.

Para a inserção dos genes no vetor de entrada, na extremidade 5' de cada iniciador foi inserida a sequência *attB* (em vermelho), responsável pela recombinação do produto de PCR ao vetor de entrada pDONR™221 da plataforma Gateway®. Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados com base no banco de dados TriTrypDB - The Kinetoplastid Genomics Resource (disponível no site <http://tritrypdb.org>), utilizando o programa Snapgene® e analisados com o auxílio do programa online Oligo Analyzer da IDT - <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>.

O produto da PCR com tamanho de 1.340 pares de base (pb) foi clonado em vetor de entrada pDONR221. A reação de clonagem continha 150 ng do produto de PCR, 150 ng do vetor, 1 µL de BP clonase em tampão T.E (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 0,5 mM) no volume final de 10 µL de reação. A reação foi incubada por aproximadamente 16 horas a 25 °C e transformada em *E. coli* TOP10 (conforme item 4.2) e semeadas em meio contendo canamicina (25 µg/mL). Colônias positivas foram triadas por PCR de colônia. Uma colônia positiva foi escolhida, cultivada em meio LB e o plasmídeo recombinante (pDONRact4) foi purificado utilizando kit de mini-preparação QIAprep® Spin (QIAGEN), de acordo com as recomendações do fabricante.

O gene *TcAct4* clonado no vetor pDONRact4 foi então recombinado nos vetores pTcNeoGFP-N e pTcNeoGFP-C dando origem aos vetores pTcGFPn-Act4 e pTcGFPc-Act4 (Figura 5), respectivamente. Para tanto, 150 ng do vetor recombinante pDONRact4 foram misturados com 150 ng dos vetores de destino, 1 µL de LR clonase em tampão T.E no volume final de 10 µL de reação. As reações foram incubadas conforme descrito anteriormente e transformadas em *E. coli* TOP10 e plaqueadas em meio contendo ampicilina (100 µg/mL). Colônias positivas foram triadas por PCR de colônia. Uma colônia positiva foi escolhida, crescida em meio LB e os plasmídeos recombinantes foram purificados utilizando kit de mini-purificação QIAprep® Spin (QIAGEN).

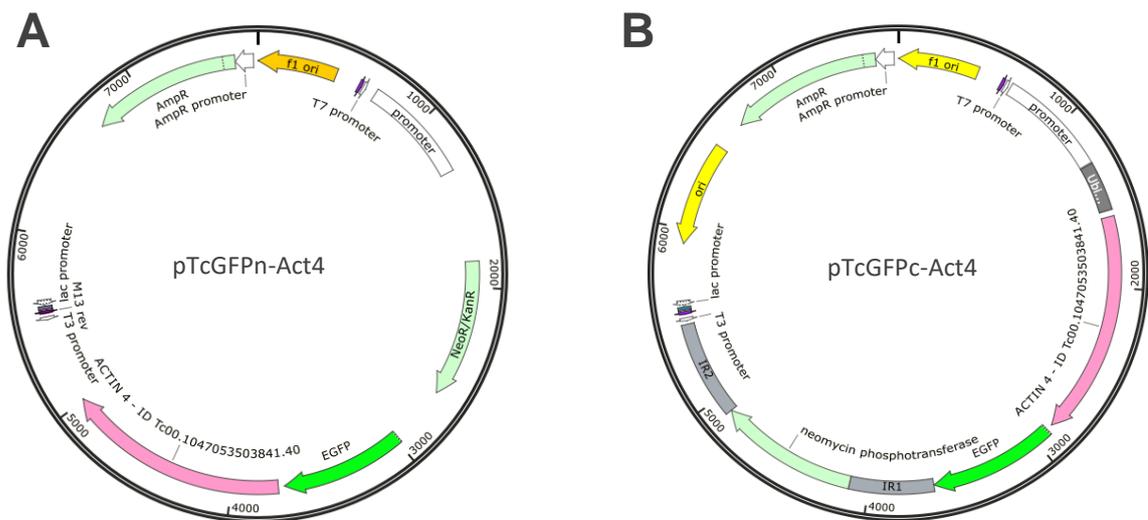


Figura 5: Mapa dos vetores de expressão da actina 4. (A) Vetor pTcGFPn-Act4. Vetor para expressão da actina 4 fusionada a GFP na porção amino-terminal. (B) Vetor pTcGFPc-Act4. Vetor para expressão da actina 4 fusionada a GFP na porção carboxi-terminal. Ambos os vetores contêm gene de resistência a neomicina.

Formas epimastigotas dos parasitas TcAct4 KO foram transfectadas com os vetores pGFPnAct4 ou pGFPcAct4 conforme o item 4.9. Os parasitas foram selecionados em meio LIT na presença de G418 (500 µg/mL). A população TcAct4 KO complementada foi analisada para a expressão ectópica de TcAct4 por *western blot*, usando o antissoro anti-TcAct4.

Os parasitas complementados foram avaliados em relação à proliferação celular e organização intracelular por microscopia eletrônica de transmissão, conforme descrito anteriormente nos itens 4.15 e 4.18, respectivamente.

4.20 IMUNOPRECIPITAÇÃO DE TcAct4

4.20.1 Obtenção de linhagem de *T. cruzi* expressando TcAct4 fusionada a GFP.

Formas epimastigotas de *T. cruzi* selvagem foram transfectadas com o mesmo vetor utilizado para a complementação gênica, pGFPcAct4 (item 4.19). Os parasitas transfectados foram selecionados em meio LIT contendo G418 (500 µg/mL). Como controle, parasitas selvagens foram transfectados com o plasmídeo pTcGW-GFP, para a expressão do gene GFP apenas (*T. cruzi*-GFP).

4.20.2 Obtenção da fração solúvel de extratos proteicos de *T. cruzi*

Formas epimastigotas de *T. cruzi* Dm28c selvagem, *T. cruzi*-GFP (parasitas expressando somente a etiqueta GFP) e TcAct4GFP (parasitas expressando TcAct4 fusionada a GFP na porção amino-terminal) foram cultivadas em LIT até a densidade de 3×10^7 células/mL. Os parasitas (5×10^8 células) foram coletados por centrifugação a $3.000 \times g$ por 10 minutos a 4°C e lavados 3 vezes em PBS. O material foi centrifugado e o sobrenadante foi removido. As células foram lisadas em 1 mL do tampão A (HEPES sódio 20 mM; MgCl_2 1 mM; CaCl_2 10 μM , citrato de sódio 50 mM, TritonX-100 0,5%) ou tampão B (HEPES sódio 20 mM; MgCl_2 1 mM; CaCl_2 10 μM , NaCl 50 mM, TritonX-100 0,5%) contendo inibidores de proteases (COMPLETE Mini Protease inhibitor cocktail tablet, Roche) em banho de gelo. Os lisados foram então centrifugados a $20.000 \times g$ por 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram coletados e incubados com microesferas revestidas (*nanobodies*) anti-GFP, como descrito abaixo.

4.20.3 Purificação dos nanobodies anti-GFP

Os nanobodies foram purificados de acordo com Peter C. Fridy e colaboradores (2014). A cepa Artic Express (DE3) de *E. coli* contendo o vetor pelB-fused nanobodies, foi gentilmente cedida pelo mesmo grupo. As células foram crescidas até atingir D.O._{600nm} 0,7 e então foram induzidas durante 18-20 h a 12°C com 0,1 mM IPTG. Após a indução, as células foram sedimentadas por centrifugação de 10 minutos a $5.000 \times g$. Os *Nanobodies* anti-GFP foram purificados da fração periplasmática em resina de afinidade de níquel. Para isso, as células foram submetidas a choque osmótico em tampão TES (0,2 M Tris-HCl, pH 8,0, 0,5 mM EDTA, pH 8,0, 0,5 M sacarose), e a fração periplasmática foi centrifugada por 15 minutos a $48.000 \times g$ a 4°C . O sobrenadante foi incubado com a resina Ni-NTA (Thermo Fisher Scientific) (500 μL para cada 1 L de cultura induzida). A resina foi lavada com 6 volumes de tampão de lavagem I (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,9 M NaCl) e posteriormente lavada com 6 volumes de tampão de lavagem II (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,15 M NaCl, 10mM imidazol pH 8,0). Os *Nanobodies* anti-GFP foram eluídos em tampão de eluição (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,15 M NaCl, 250 mM imidazol pH 8,0), e a fração eluída foi dialisada em PBS.

4.20.4 Ligação dos *nanobodies* anti-GFP à microesferas magnéticas

Nanobodies anti-GFP foram ligados a microesferas magnéticas (Dynabeads® M270 epoxy, Life technologies) (30 mg), previamente lavadas com 1 mL de tampão fosfato 100 mM, pH 7,4 e ressuspensas em 100 µL do mesmo tampão. Os *nanobodies* anti-GFP (100 µL contendo 300 µg) foram então acoplados às microesferas magnéticas. Em seguida, sulfato de amônio 3 M (100 µL) foi adicionado gota a gota, para evitar a precipitação de proteínas. As microesferas associadas aos *nanobodies* foram incubadas durante 72 horas a 30 °C, com agitação constante. Posteriormente, elas foram lavadas sequencialmente, com 1 mL das seguintes soluções: tampão fosfato 100 mM, pH 7,4; Glicina 100 mM, pH 2,5; Tris-HCl 10 mM, pH 8,8; Trietilamina 100 mM; PBS; Triton X-100 0,5% em PBS e, novamente, PBS. As microesferas revestidas com *nanobodies* anti-GFP foram ressuspensas em 150 µL de PBS e armazenadas a 4 °C até o momento do uso.

4.20.5 Imunoprecipitação de TcAct4-GFP

A fração solúvel dos extratos proteicos de *T. cruzi* (item 4.20.2) (1 mL) foi incubada com 1 µL das microesferas magnéticas acopladas aos *nanobodies* anti-GFP sob agitação constante a 4 °C durante 2 horas. Em seguida, com o auxílio de uma estante magnética, as esferas foram lavadas três vezes com o mesmo tampão de lise sem Triton-X100 e incubadas a 95 °C com 20 µL de tampão de amostra 1x (Tris-HCl 10 mM pH 6,8, SDS 0,25%, β-mercaptoetanol 0,625%, glicerol 1,5% e azul de bromofenol 0,005%). Metade da amostra (10 µL) foi usada para análise por SDS-PAGE e o gel de acrilamida foi posteriormente submetido a coloração com prata (SAMBROOK et al., 1989) e a outra metade da amostra foi submetida à análise por *western blot*.

Após a padronização do tampão, a imunoprecipitação foi repetida com réplica biológica somente com o tampão A, seguindo o procedimento descrito acima. Toda a amostra foi aplicada em gel de poli(acrilamida) 12% e submetida à corrida eletroforética até que ultrapassasse o gel de empilhamento (aproximadamente 30 minutos). Posteriormente, o gel foi corado com prata. As bandas correspondentes a cada amostra (selvagem, *T. cruzi*-GPF e TcAct4GFP) foram cortadas em cubos de aproximadamente 1mm x 1mm, e colocadas em tubos de microcentrífuga (1,7 mL).

As amostras foram tratadas com solução de descoloração para prata (tiosulfato de sódio 100 mM e Ferricianeto de Potássio 30 mM, na proporção 1:1) sob agitação a 800 rpm por 10 minutos a 25 °C. Em seguida, as amostras foram lavadas com tampão ABC (Bicarbonato de amônio 50 mM). As amostras foram desidratadas em etanol 100% e secas em *speed-vac* (Thermo Scientific) por 7 minutos (*vacuum pressure* = 0,1). Após a secagem, as amostras foram tratadas com tampão de redução (Ditiotreitol 10 mM em ABC) por 60 minutos a 56 °C sob agitação a 800 rpm, e em seguida com solução de alquilação (Iodoacetamida 55 mM em ABC) por 45 min a 25 °C sob agitação a 800 rpm, protegido da luz. As amostras foram então lavadas em tampão ABC e desidratadas novamente em etanol 100%, e secas em *speed-vac* por 7 minutos (*vacuum pressure* = 0,1). A amostra foi reidratada em solução de tripsina 12,5 ng/μL a 4 °C por 20 minutos. Em seguida foi adicionado tampão ABC (suficiente para cobrir os pedaços de gel), e as amostras foram submetidas a digestão a 37 °C por 16-18 horas. A reação foi interrompida pela adição de ácido trifluoroacético (concentração final 0,5%). Todo o líquido foi coletado em um tubo de 2,0 mL e foi então adicionada solução de extração (ácido trifluoroacético 3%, acetonitrila 30%), em quantidade suficiente para cobrir os fragmentos de gel, seguida de incubação por 10 minutos a 25 °C sob agitação a 800 rpm. Esta etapa foi repetida mais uma vez. Acetonitrila 100% foi adicionada até cobrir os pedaços de gel, e as amostras foram incubadas por 10 minutos a 25 °C sob agitação a 800 rpm. Todo o sobrenadante foi transferido para o tubo de 2,0 mL, e esta etapa foi repetida mais uma vez. Todo o volume coletado (aproximadamente 2 mL) foi seco em *speed-vac* (*vacuum pressure* = 0,1) até 10 a 20% do volume original.

4.20.6 Análise por espectrometria de massas

Os peptídeos foram submetidos à análise de LC-MS/MS com um sistema de cromatografia líquida de alta performance (UPLC) Thermo Scientific Easy-nLC 1000 acoplado a um espectrômetro de massa LTQ-Orbitrap XL ETD (Facility-RPT02H PDTIS/Instituto Carlos Chagas -Fiocruz Paraná), da seguinte forma: as misturas de peptídeos foram carregadas em uma coluna (75 mm de diâmetro e 15 cm de comprimento) com a resina ReproSil-Pur C18-AQ de 3,2 μm com um fluxo de 500 nL/minuto e posteriormente eluída com um fluxo de 250 nL/minuto de 5% a 40% de acetonitrila em 0,5% de ácido fórmico e 0,5% de DMSO, em um gradiente de 120

minutos. O espectrômetro de massa foi configurado no modo dependente de dados para alternar automaticamente entre MS e MS/MS (MS2).

Os dados foram analisados no software PatternLab (Carvalho et al., 2016). Para a identificação das proteínas, os espectros experimentais foram comparados com os espectros teóricos, utilizando o proteoma de referência de *T. cruzi* CL Brener composto por 19.242 sequências, obtido a partir do consórcio UniProt (<http://www.uniprot.org>) em 12 de dezembro de 2017. As proteínas identificadas em cada extrato (selvagem, *T. cruzi*-GPF e TcAct4GFP) foram analisadas utilizando a ferramenta *Approximately area-proportional Venn Diagrams*, através da qual foram observadas as proteínas exclusivas do extrato precipitado TcAct4GFP. O parâmetro para a busca foi a identificação da proteína nas duas réplicas biológicas.

5 RESULTADOS

5.1 Análise *in silico* da TcAct4

O gene que codifica a actina 4 em *T. cruzi* (*TcAct4*) (gene ID TcCLB.503841.40, www.tritrypdb.org) possui 1.281 pb e codifica uma proteína de massa molecular estimada de 45,9 kDa. Em *T. cruzi*, outros 3 genes estão anotados como codificantes para actinas: a actina 1 (*TcAct1*) (TcCLB.510571.30), actina 2 (*TcAct2*) (TcCLB.507969.50) e a actina 3 (*TcAct3*) (TcCLB.510945.30). TcAct1 é a isoforma mais conservada em relação a outros eucariotos, e ortólogos são encontrados em diversos tripanosomatídeos relacionados, como *T. brucei* e *Leishmania* sp. TcAct4 é a isoforma menos conservada, tanto quando comparada com actinas de outros organismos, quanto quando comparada com outras actinas de *T. cruzi* (Tabela 1).

Tabela 1 – Comparação entre as seqüências de actina de *T. cruzi* (%Identidade/%similaridade)

X	TcAct1	TcAct2	TcAct3	TcAct4
TcAct1	-	50,5/69,1	36,4/55,1	32,8/48,7
TcAct2	50,5/69,1	-	34,7/52,6	28,9/46,0
TcAct3	36,4/55,1	34,7/52,6	-	26,8/42,0
TcAct4	32,8/48,7	28,9/46,0	26,8/42,0	-

O gene que codifica a actina 4 está presente em diversos tripanosomatídeos, em regiões sintênicas do genoma. Apesar do bloco gênico estar conservado, a seqüência peptídica da actina 4 apresenta uma baixa conservação. Quando comparado a diversas espécies de *Leishmania* a identidade é de cerca de 35%. Em CL Brener, clone padrão de CL, nos genótipos não Esmeraldo-like, são observados dois fragmentos gênicos para a actina 4.

Na busca pelas proteínas mais semelhantes à actina TcAct4 usando o algoritmo BLAST, os melhores *hits* foram com a beta-centractina, ou Arp 1, e com a própria actina. O resultado da modelagem tridimensional, utilizando o *software* Phyre2 (disponível em: <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>), indicou novamente que os melhores alinhamentos foram com ARPs, neste caso as ARPs nucleares 4 (*S. cerevisiae*) e 8 (humana), que possuem estruturas no PDB (protein data bank, <https://www.rcsb.org>). Observa-se claramente que as estruturas tridimensionais das actinas de *T. cruzi* são bem conservadas em relação a actina de mamífero, sendo possível observar a presença dos dois subdomínios característicos (alfa e beta). A TcAct4 apresenta duas grandes inserções em sua sequência quando comparada a actina consenso, às ARPs e em relação às outras actinas de *T. cruzi* (Figura 8). Não foi identificado sítio de ligação ao ATP na modelagem de TcAct4. A TcAct1 apresentou 71% de identidade com a actina muscular de *Drosophila melanogaster* e foi a única em que o sítio de ligação a ATP foi identificado na modelagem.

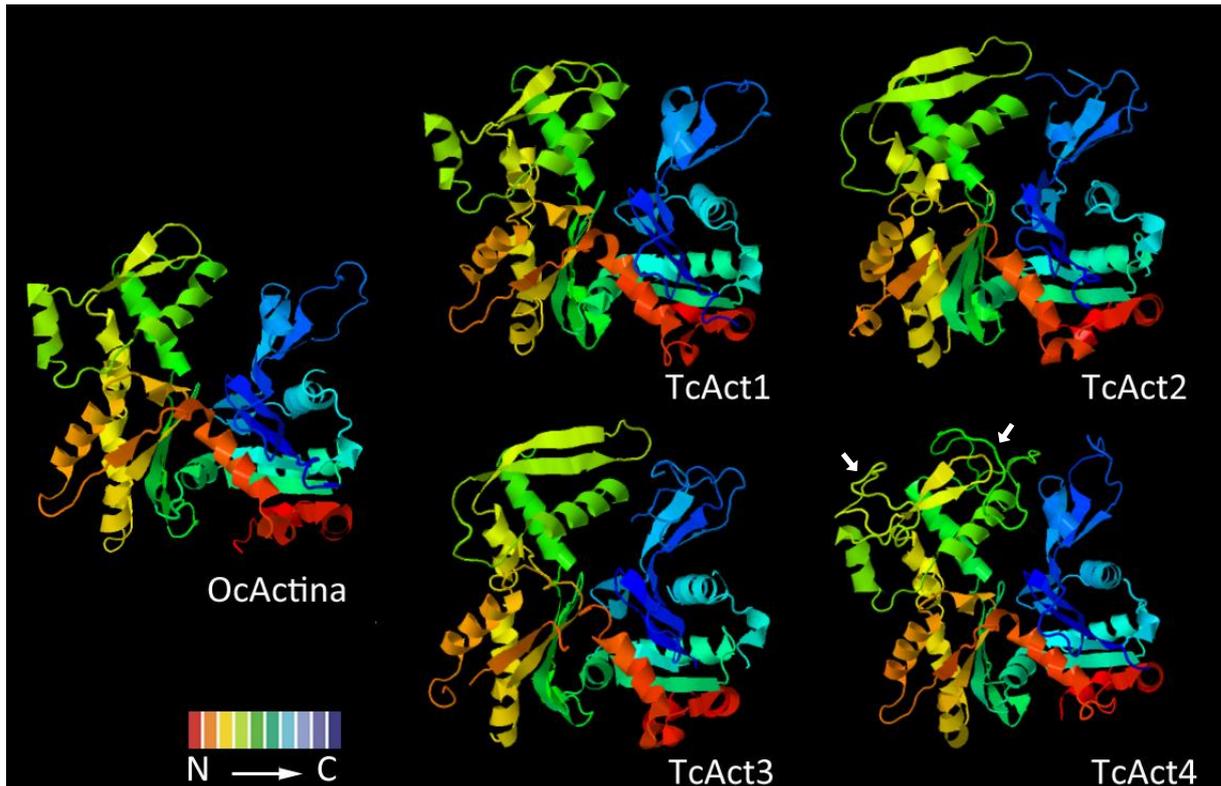


Figura 8 – Comparação da estrutura tridimensional das actinas de *T. cruzi* com a actina de coelho. Modelo tridimensional gerado no Phyre2. OcActina (actina de *Oryctolagus cuniculus*, (coelho), ID UniProt P68135); TcAct1 (actina 1 de *T. cruzi*, ID TcCLB.510571.30); TcAct2 (actina 2 de *T. cruzi*, ID TcCLB.507969.50); TcAct3 (actina 3 de *T. cruzi*, ID TcCLB.510945.30); TcAct4 (actina 4 de *T. cruzi*, ID TcCLB.503841.40). Setas representam as inserções.

5.2 Expressão e localização da TcAct4

Para a caracterização da expressão, localização e possíveis funções da proteína actina 4 em *T. cruzi* foi obtido o antissoro anti-TcAct4. Para isto, a proteína recombinante actina TcAct4, previamente obtida (Rosa, 2015), foi utilizada para a imunização de camundongos e obtenção do soro imune. O antissoro anti-TcAct4 reconheceu uma proteína de aproximadamente 46 kDa em extrato de epimastigotas, compatível com o tamanho esperado para a actina TcAct4 (Figura 9).

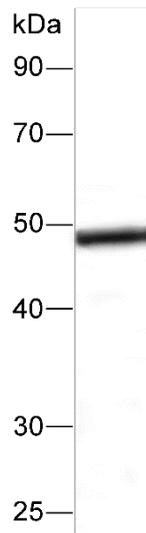


Figura 9 – Reconhecimento da actina TcAct4 pelo antissoro anti-TcAct4. *Western blot* do extrato proteico de epimastigotas de *T. cruzi* incubado com o antissoro anti-TcAct4 na diluição 1:500 e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase na diluição de 1:10.000. A membrana foi revelada por quimioluminescência pela atividade da peroxidase e fotodocumentada em transluminador L-Pix Chemi Express.

O antissoro anti-TcAct4 também reconheceu TcAct4 nas formas tripomastigotas metacíclicas, tripomastigotas de cultura e amastigotas, demonstrando que esta proteína é expressa em todos os estágios de desenvolvimento do parasita (Figura 10).

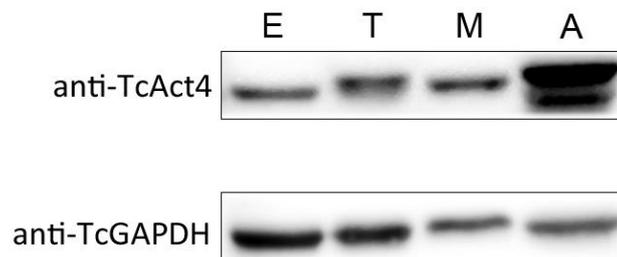


Figura 10 – Análise da expressão da actina TcAct4 nas diferentes formas de desenvolvimento do parasita. *Western blot* de extratos proteicos de formas (E) epimastigotas, (T) tripomastigotas de cultura, (M) tripomastigotas metacíclicas e (A) amastigotas de *T. cruzi* incubado com o antissoro anti-TcAct4 na diluição 1:500 e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase na diluição de 1:10.000. A membrana foi revelada por quimioluminescência pela atividade da peroxidase e fotodocumentada em transluminador L-Pix Chemi Express. GAPDH de *T. cruzi* foi utilizada como normalizador.

Estudos anteriores, utilizando anticorpos contra um peptídeo da TcAct1 de *T. cruzi*, identificaram a proteína somente na fração solúvel de extratos obtidos com o uso de detergente, sugerindo que a proteína estava na forma monomérica ou em filamentos curtos que foram dissociados do citoesqueleto de microtúbulos (DE MELLO et al. 2008). Mais recentemente, utilizando anticorpo contra a proteína completa, a TcAct1 foi identificada na fração solúvel, e mais fracamente na fração insolúvel (CEVALLOS et al. 2011). Portanto, decidimos avaliar a solubilidade da TcAct4 em extratos proteicos de formas epimastigota de *T. cruzi*. A actina TcAct4 foi detectada somente na fração solúvel (Figura 11), sugerindo que a proteína, assim como TcAct1, está majoritariamente na forma monomérica ou formando filamentos curtos. Como controle foi utilizado o anticorpo anti-TcAct1 de *T. cruzi*, e conforme esperado houve uma partição dessa actina nas frações solúvel e insolúvel, como previamente descrito (CEVALLOS et al., 2011).

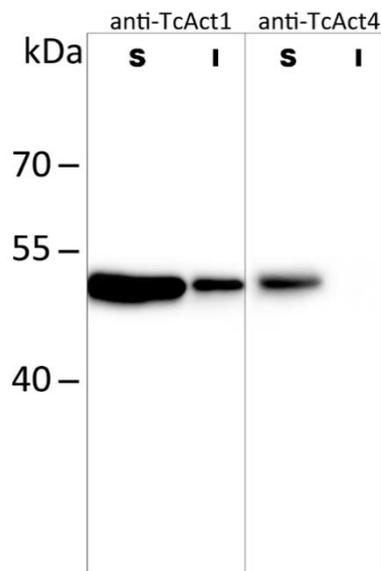


Figura 11 - Solubilidade da actina TcAct4 de *T. cruzi*. Western blot de extratos celulares de formas epimastigotas fracionados em extratos solúvel (S) e insolúvel (I) incubados com o antissoro anti-TcAct4 na diluição 1:500 e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase na diluição de 1:10.000. A membrana foi revelada por quimioluminescência pela atividade da peroxidase e fotodocumentada em transluminador L-Pix Chemi Express. Como controle foi utilizado o antissoro anti-TcAct1.

Diferenças na localização subcelular da actina ao longo do desenvolvimento já foram bem descritas em plantas e animais. Em protozoários, alguns exemplos também foram descritos. Em *T. brucei*, por exemplo, a actina TryARP é expressa somente no flagelo (ERSFELD & GULL, 2001). A actina TcAct1 de *T. cruzi*, em formas epimastigotas encontra-se distribuída por todo o corpo celular, com concentração da marcação ao longo do flagelo. Nas formas tripomastigotas, TcAct1 está distribuída uniformemente em toda a célula. Enquanto que nas formas amastigotas, TcAct1 está concentrada na periferia celular (CEVALLOS et al. 2011). Entretanto, ao contrário de TcAct1, a análise da localização de TcAct4 por imunofluorescência mostrou que essa actina está dispersa ao longo do citoplasma, com regiões de concentração da marcação, em todas as formas do ciclo de vida do *T. cruzi* analisadas (Figura 12).

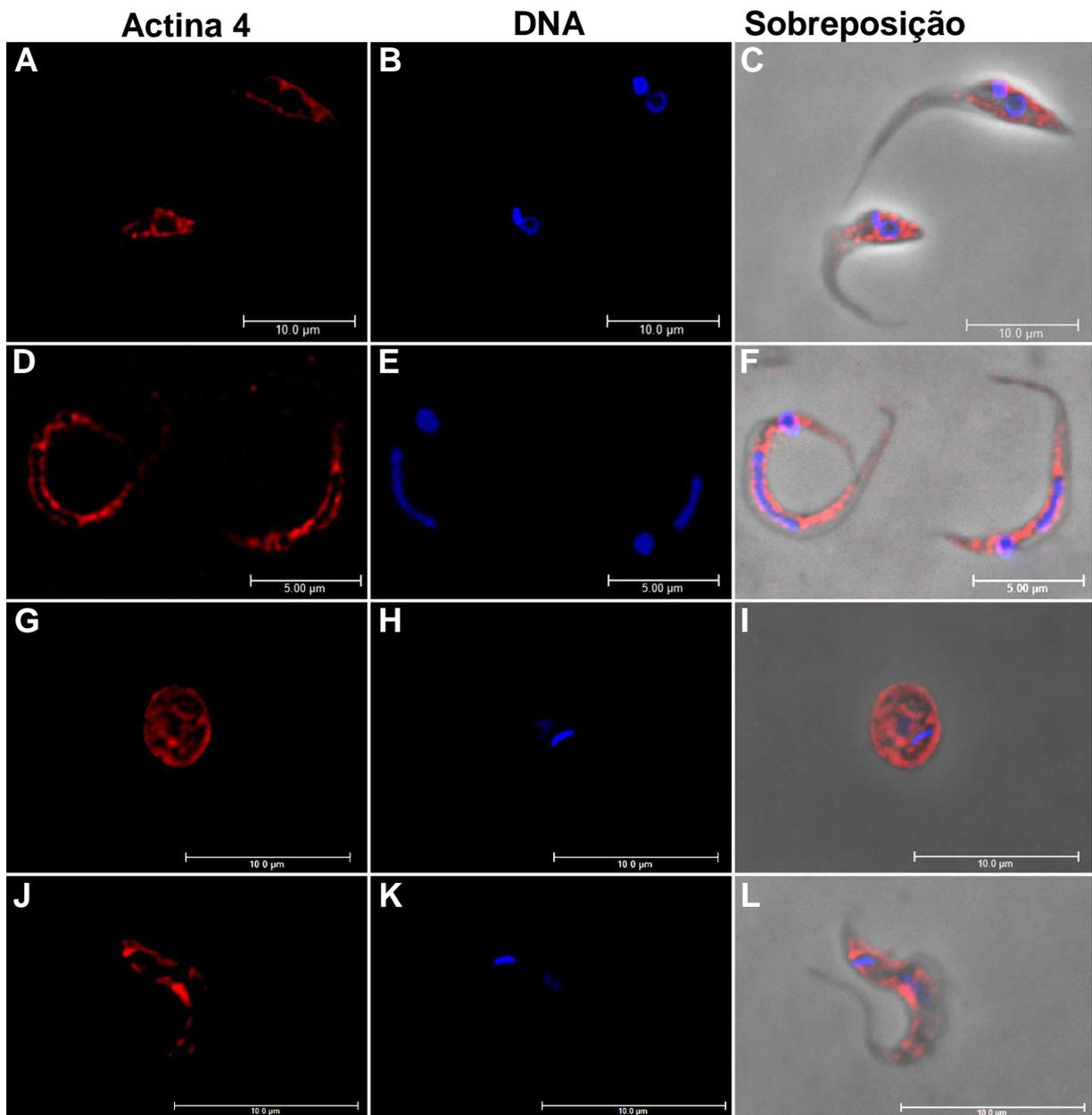


Figura 12 – Distribuição subcelular da actina TcAct4 em *T. cruzi*. Imunolocalização da actina 4 mostrando sua distribuição ao longo do corpo celular. Microscopia ótica de fluorescência das formas epimastigota (A-C), tripomastigota metacíclico (D-F), amastigota (G-I) e tripomastigota de cultura (J-L) de *T. cruzi* CL. (B, E, H e K) com antissoro anti-TcAct4 na diluição de 1:150 e secundário Alexa-Fluor 594 na diluição 1:600. DNA do núcleo e cinetoplasto foram corados com Hoechst 33258 (1 µg/µL). A sobreposição foi feita com as imagens da Actina 4, do DNA e do contraste de fase.

A análise por microscopia eletrônica de transmissão revelou características peculiares no padrão de marcação de TcAct4 nas diferentes formas do ciclo de vida do parasita. Em epimastigotas, TcAct4 foi identificada na forma de pequenos agregados, muitas vezes formando pequenas estruturas lineares distribuídas ao longo do corpo celular e também no flagelo (Figura 13). Em tripomastigotas metacíclicos e

amastigotas o perfil de distribuição de TcAct4 é mais homogêneo e poucos agregados foram observados (Figura 14 A, B, C e D). Assim como em epimastigotas, pequenos agregados também foram observados em tripomastigotas de cultura (Figura 14 E e F).

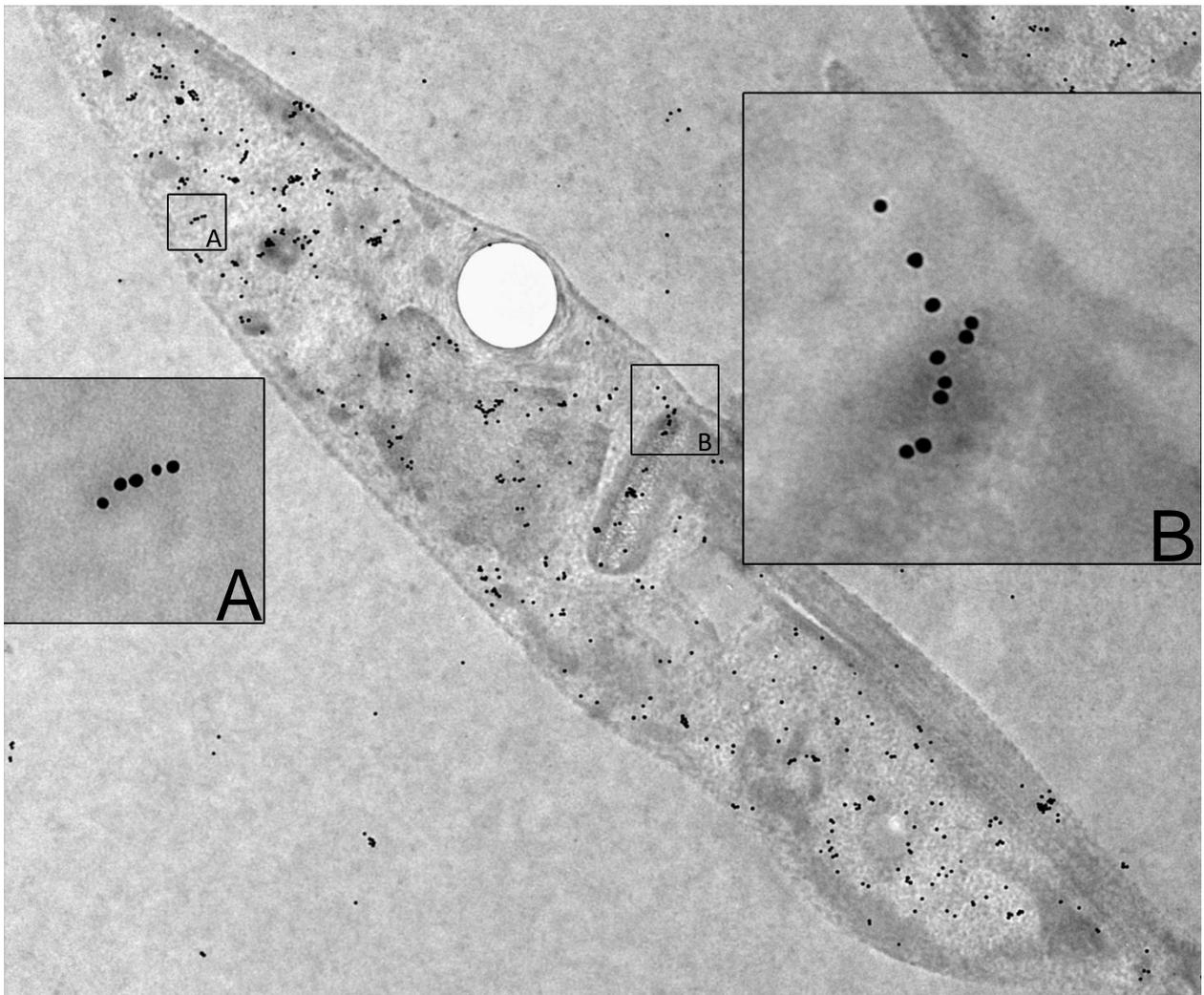


Figura 13 – Distribuição subcelular da actina TcAct4 em formas epimastigotas de *T. cruzi* por imunoelétrico microscopia. Micrografia eletrônica de transmissão de epimastigota de *T. cruzi*. As células foram marcadas com antissoro anti-TcAct4 (1:10) e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (1:40) conjugado a ouro coloidal de 15 nm.

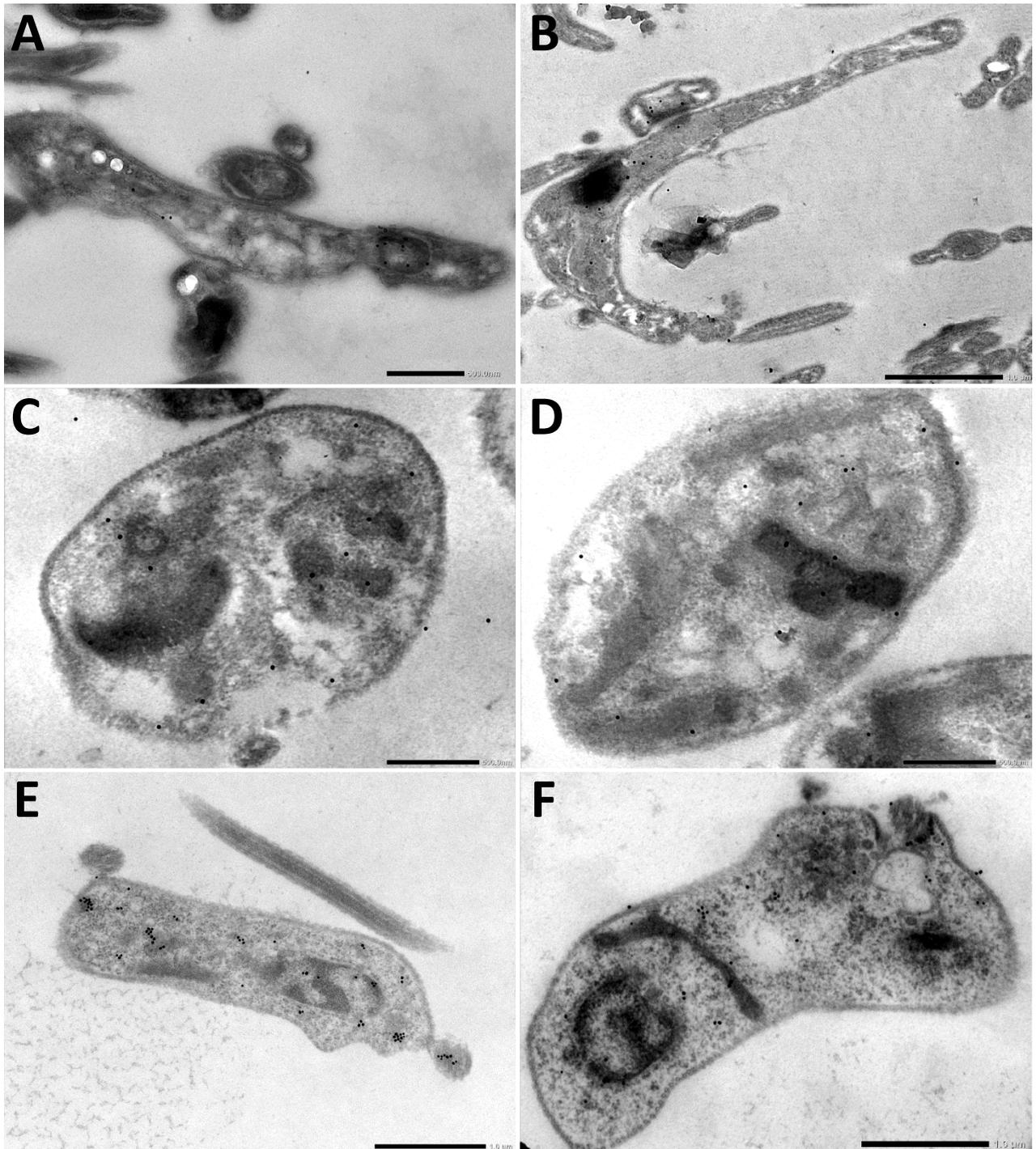


Figura 14. Localização subcelular da actina TcAct4 ao longo do ciclo de *T. cruzi* por imunoelctro microscopia. Micrografia eletrônica de transmissão de tripomastigota metacíclico (A – B), amastigota (C – D) e tripomastigota de cultura (E – F) de *T. cruzi*. As amostras foram incubadas com antissoro anti-TcAct4 (1:10) e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (1:40) conjugado a ouro coloidal de 15 nm.

5.3 Nocaute gênico de *TcAct4* usando o sistema CRISPR-Cas9

Para investigar a função da actina *TcAct4* na biologia celular de *T. cruzi*, o gene *TcAct4* foi mutado utilizando o sistema CRISPR-Cas9 (PENG et al. 2015). Para isto, parasitas expressando a endonuclease SpCas9 foram transfectados com RNA guia para o gene *TcAct4* e com um DNA doador contendo códons de parada. Com esta estratégia ambos os alelos do gene foram clivados no início da sequência codificadora e, com a inserção dos códons de parada, foi gerada uma versão truncada e não funcional do gene *TcAct4* (Figura 15). A ausência da proteína actina *TcAct4* nos parasitas mutantes nulos (*TcAct4* KO) foi confirmada por *western blot* e por imunofluorescência utilizando o antissoro anti-*TcAct4* (Figura 16).

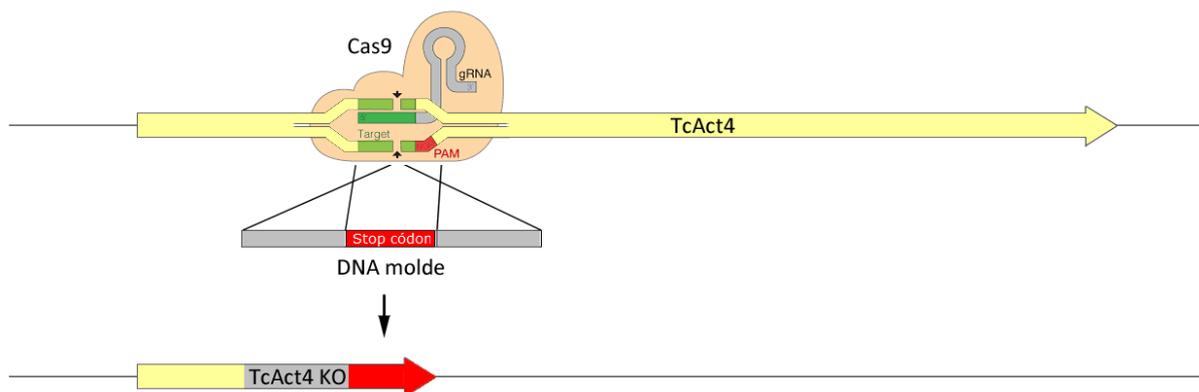


Figura 15 – Estratégia para obtenção do *TcAct4* KO por CRISPR-Cas9. O gene *TcAct4* foi clivado pelo complexo Cas9-gRNA, e o DNA molde foi utilizado pela maquinaria de reparo do parasita para regenerar o DNA clivado inserindo códons de parada à sequência da *TcAct4*, gerando assim uma versão truncada do gene (*TcAct4* KO).

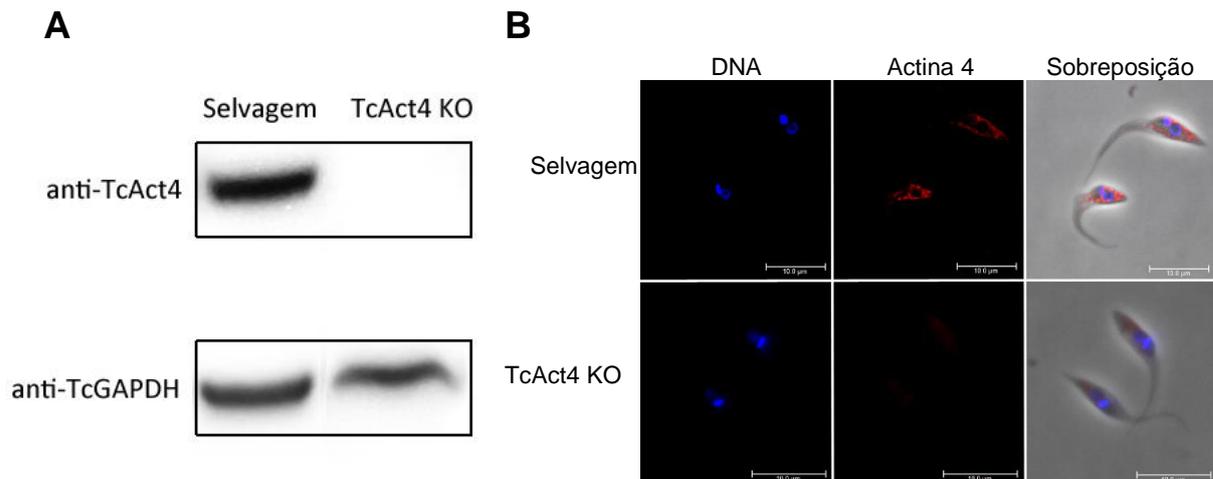


Figura 16 – Confirmação dos parasitas TcAct4 KO. (A) *Western blot* de extratos proteicos de formas epimastigotas de *T. cruzi* selvagem e TcAct4 KO incubados com o antissoro anti-TcAct4 na diluição 1:500 e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase na diluição de 1:10.000. A membrana foi revelada por quimioluminescência pela atividade da peroxidase e fotodocumentada em transluminador L-Pix Chemi Express. A actina TcAct4 foi detectada somente nos parasitas selvagens. GAPDH de *T. cruzi* foi utilizada como normalizador. (B) Microscopia de fluorescência das formas epimastigota selvagem e TcAct4 KO com antissoro anti-TcAct4 na diluição de 1:150 e secundário Alexa-Fluor 594 na diluição 1:600. DNA do núcleo e cinetoplasto foram corados com Hoechst 33258 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). A sobreposição foi feita com as imagens da Actina 4, do DNA e do contraste de fase. A actina TcAct4 foi localizada somente nos parasitas selvagens.

Para avaliar a participação da actina TcAct4 no processo de multiplicação celular, foi determinada a curva de crescimento de formas epimastigotas selvagem e TcAct4 KO. A proliferação dos parasitas TcAct4 KO apresentou diferenças significativas quando comparada a dos parasitas selvagens (Figura 17) indicando que a actina TcAct4 interfere na proliferação das formas epimastigotas.

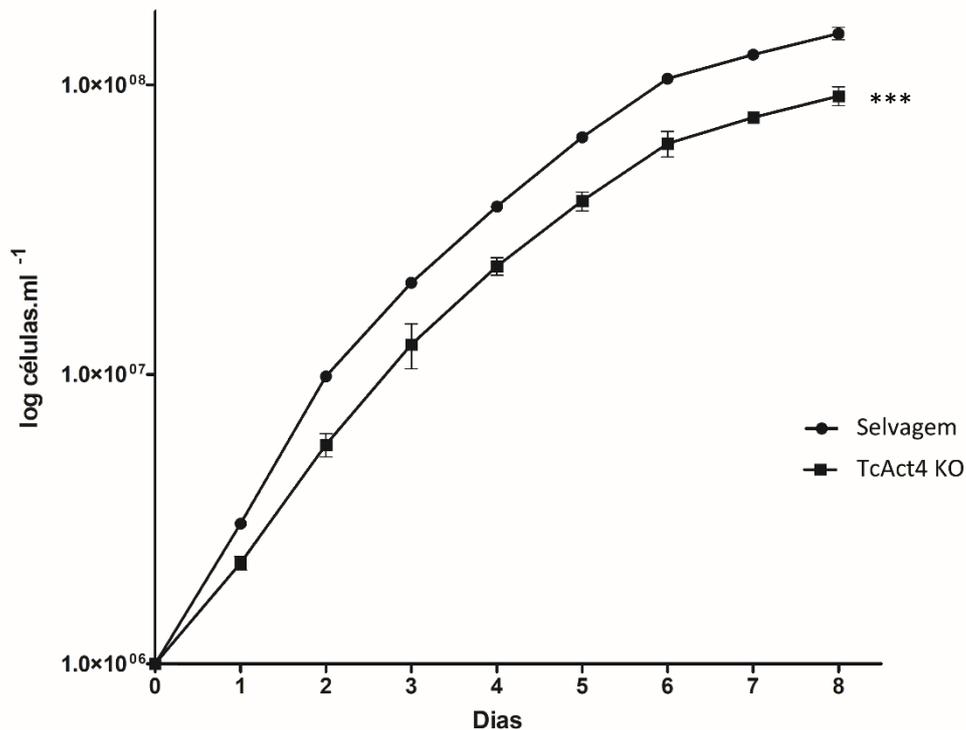


Figura 17 – Efeito do nocaute da actina TcAct4 na proliferação de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Curva de crescimento de parasitas selvagem (circulo) e parasitas TcAct4 KO (quadrado). Dados representam a média e desvio padrão de triplicatas biológicas. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida de pós teste de Bonferroni. com significância 0,1%. *** $p \leq 0.001$

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram submetidas à diferenciação para tripomastigotas metacíclicos em meio TAU. Contudo, não foram observadas diferenças significativas no número de tripomastigotas metacíclicos nas culturas dos parasitas TcAct4 KO em comparação às culturas dos parasitas selvagens (Figura 18). Também não foram observadas diferenças significativas quanto a infectividade das formas tripomastigotas metacíclicas dos parasitas TcAct4 KO e selvagens em células VERO, tanto em relação a percentagem de células infectadas (Figura 19 A), quanto ao número de amastigotas intracelulares (Figura 19 B), resultando em índices de infectividade similares (Figura 19 C).

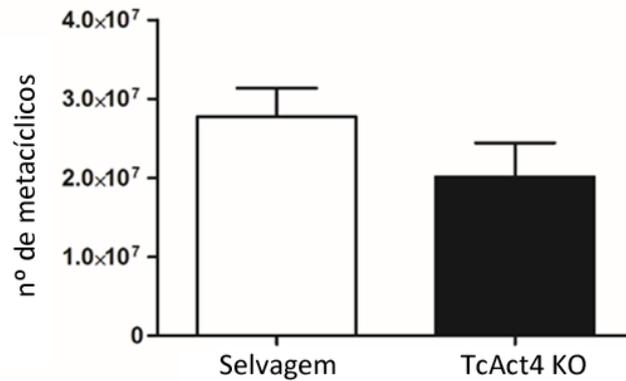


Figura 18 – Efeito do nocaute da actina TcAct4 na diferenciação de *T. cruzi* em tripomastigotas metacíclicos. Número de tripomastigotas metacíclicos obtidos após diferenciação *in vitro* de parasitas selvagem e TcAct4 KO. Dados representam a média e desvio padrão de triplicatas biológicas. Os dados foram analisados por teste t com significância 5%.

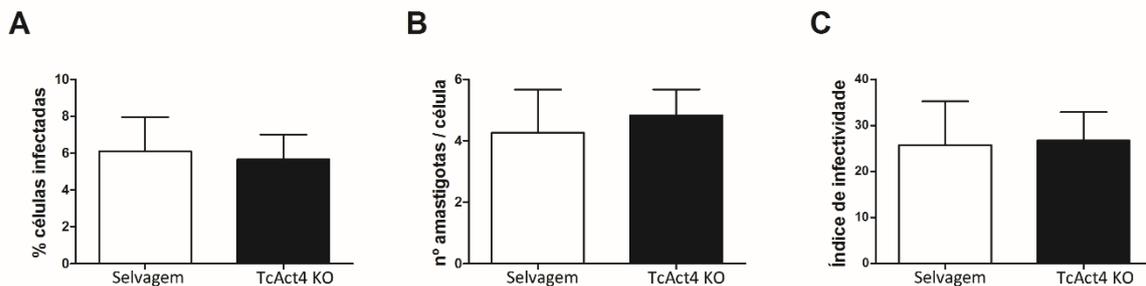


Figura 19 – Efeito do nocaute da actina TcAct4 na infecção de células VERO. (A) porcentagem de células infectadas, (B) número de amastigotas por célula, (C) índice de infectividade. Dados representam a média e desvio padrão de triplicatas biológicas com triplicatas técnicas. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida de pós teste de Tukey-Kramer com significância 5%.

Os parasitas mutantes TcAct4 KO também foram analisados por microscopia eletrônica de varredura, e foi possível determinar que não houve alteração na superfície e forma desses parasitas (Figura 20). No entanto, a análise por microscopia eletrônica de transmissão, mostrou diversas alterações da organização intracelular nos parasitas TcAct4 KO. Os parasitas mutantes apresentaram intensa formação de vesículas (Figura 21 C, D e E), algumas delas apresentando características de corpos multivesiculares, desorganização do DNA mitocondrial (Figura 21 B e D) e presença de perfis de membrana (Figura 21 B, C e E) de origem desconhecida.

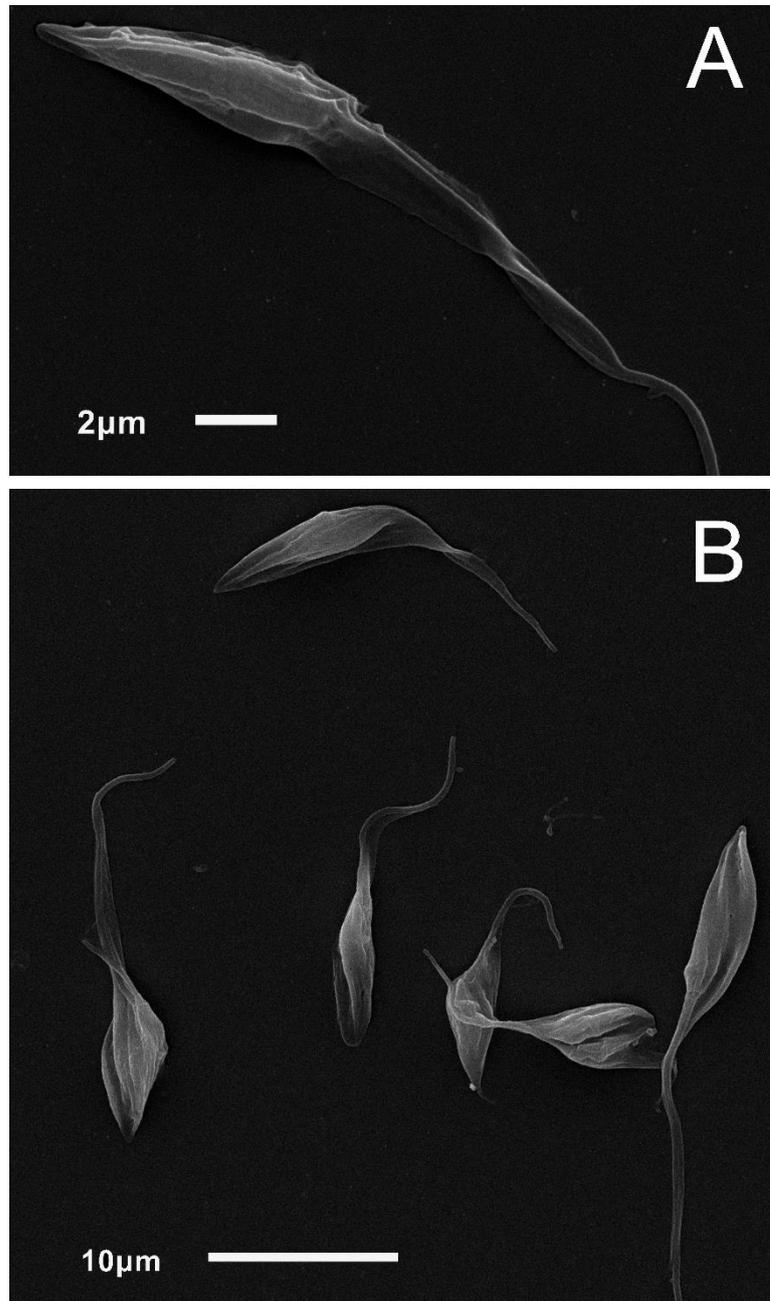


Figura 20 – Avaliação morfológica ultraestrutural da superfície dos parasitas TcAct4 KO. Micrografia eletrônica de varredura de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Os parasitas TcAct4 KO (B) não apresentaram alterações morfológicas quando comparados com os parasitas selvagem (A).

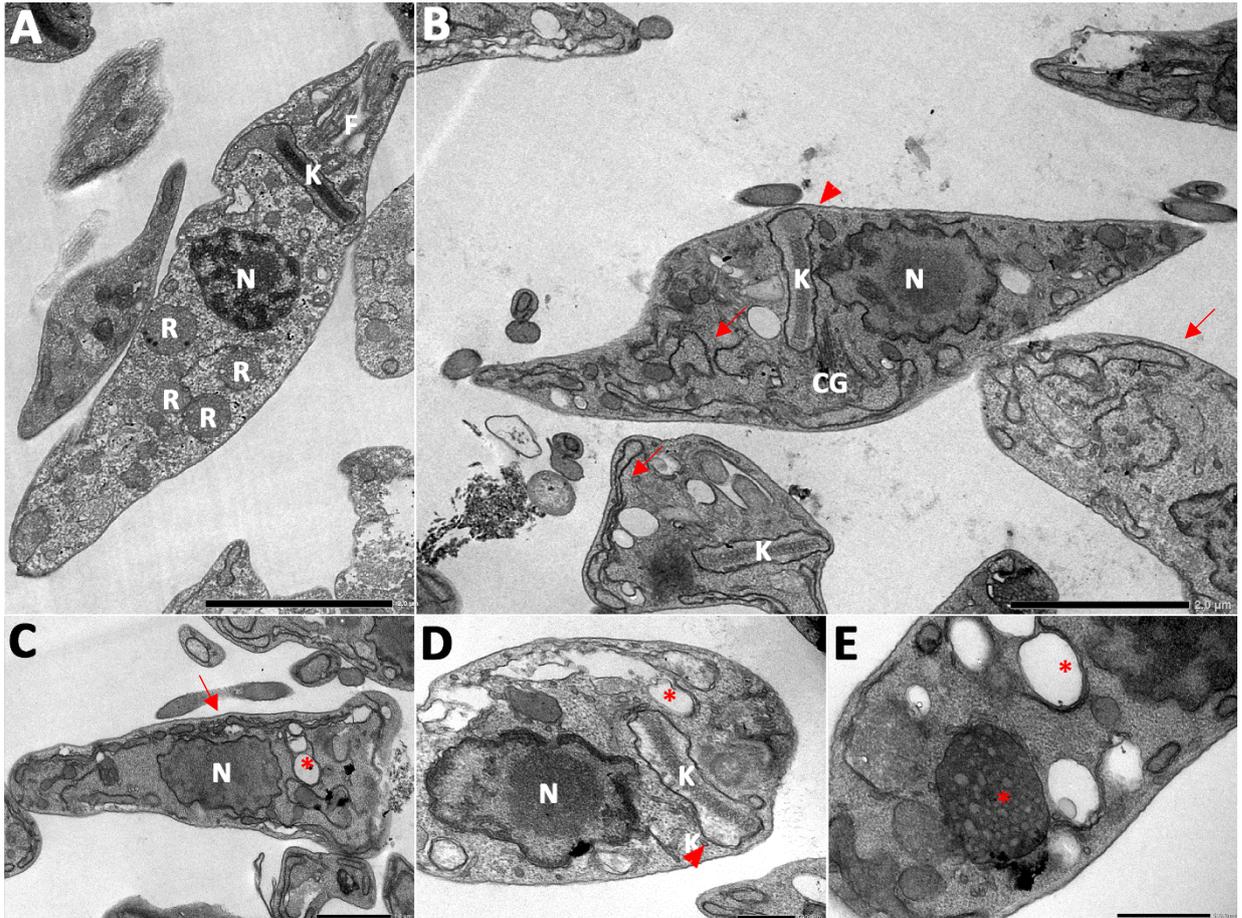


Figura 21 – Avaliação ultraestrutural intracelular dos parasitas TcAct4 KO. Micrografia eletrônica de transmissão de formas epimastigotas de *T. cruzi*. (A) organização ultraestrutural do parasita selvagem. (B - E) parasitas nocaute. (N) núcleo. (K) cinetoplasto. (R) reservossomo. (CG) complexo de Golgi. (*) vesículas com aspectos anormais; setas mostram perfis de membrana; pontas de seta mostram cinetoplasto alterado.

Para avaliar se o fenótipo dos parasitas TcAct4 KO é revertido com a inserção de uma cópia ectópica do gene *TcAct4*, formas epimastigotas TcAct4 KO foram transfectados com vetores de expressão contendo uma cópia do gene *TcAct4* em fase com o gene que codifica a proteína GFP. Foram realizadas duas construções, a primeira com o gene *GFP* em fase com a extremidade 5' do gene *TcAct4* (expressão amino-terminal, GFP-TcAct4) e a segunda com o gene *GFP* em fase com a extremidade 3' do gene *TcAct4* (expressão carboxi-terminal, TcAct4-GFP). Extratos proteicos dos transfectantes TcAct4 KO (pTcGFPn-Act4) e TcAct4 KO (pTcGFPc-Act4) foram analisados por western blot, que indicou que ambas as proteínas (GFPn-TcAct4 e TcAct4-GFPc) estavam expressas nesses parasitas (Figura 22).

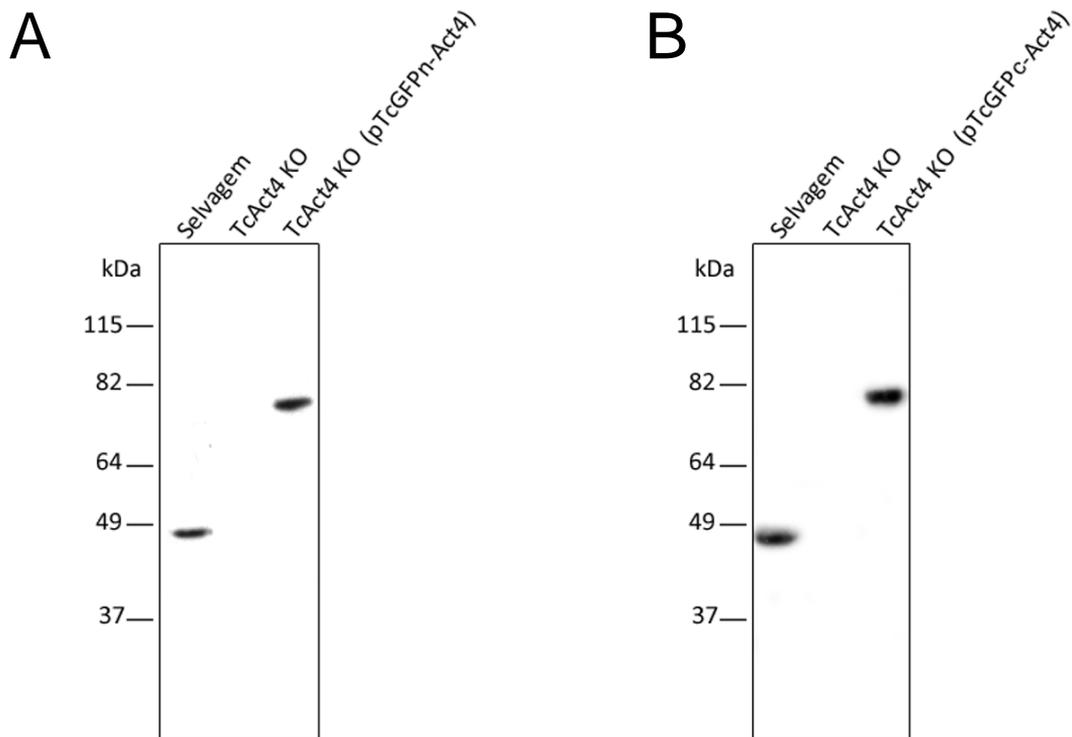


Figura 22 – Avaliação da expressão da actina TcAct4 nos parasitas TcAct4 KO complementados. *Western blot* dos transfectantes (A) TcAct4 KO (pTcGFPn-Act4) e (B) TcAct4 KO (pTcGFPC-Act4) com antissoro anti-TcAct4 na diluição 1:500 e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase na diluição de 1:10.000. A membrana foi revelada por quimioluminescência pela atividade da peroxidase e fotodocumentada em transluminador L-Pix Chemi Express.

As curvas de crescimento dos parasitas transfectantes TcAct4 KO (pTcGFPn-Act4) e TcAct4 KO (pTcGFPC-Act4) mostraram que apenas a população TcAct4 KO (pTcGFPC-Act4), que expressa a proteína TcAct4 fusionada com GFP carboxi-terminal (TcAct4-GFPc) foi capaz de reverter o fenótipo de reduzida proliferação celular observada em TcAct4 KO (Figura 23).

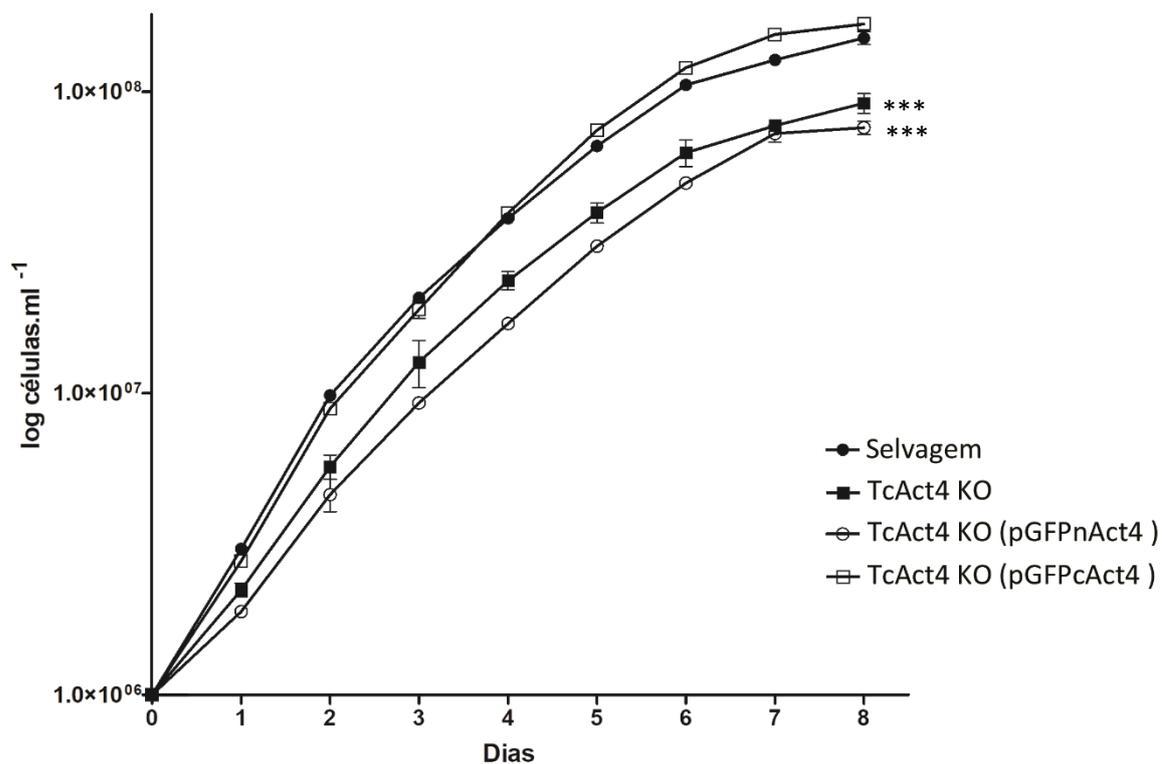


Figura 23 – Efeito da complementação gênica na proliferação de epimastigotas de TcAct4 KO. Curva de crescimento de parasitas selvagem (círculo fechado), TcAct4 KO (quadrado fechado), complementado com pGFPnAct4 (círculo aberto) e complementado com pGFPcAct4 (quadrado aberto). Dados representam a média e desvio padrão de três contagens. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida de pós teste de Bonferroni com significância 1%. *** $p \leq 0.001$

Análises por microscopia eletrônica de transmissão também confirmaram que os parasitas TcAct4 KO expressando GFPn-TcAct4 continuavam com as mesmas alterações ultraestruturais observadas na população TcAct4 KO (Figura 24 A e B), enquanto que os parasitas TcAct4 KO expressando GFPc-TcAct4 recuperaram a organização ultraestrutural observada nos parasitas selvagens (Figura 24 C e D).

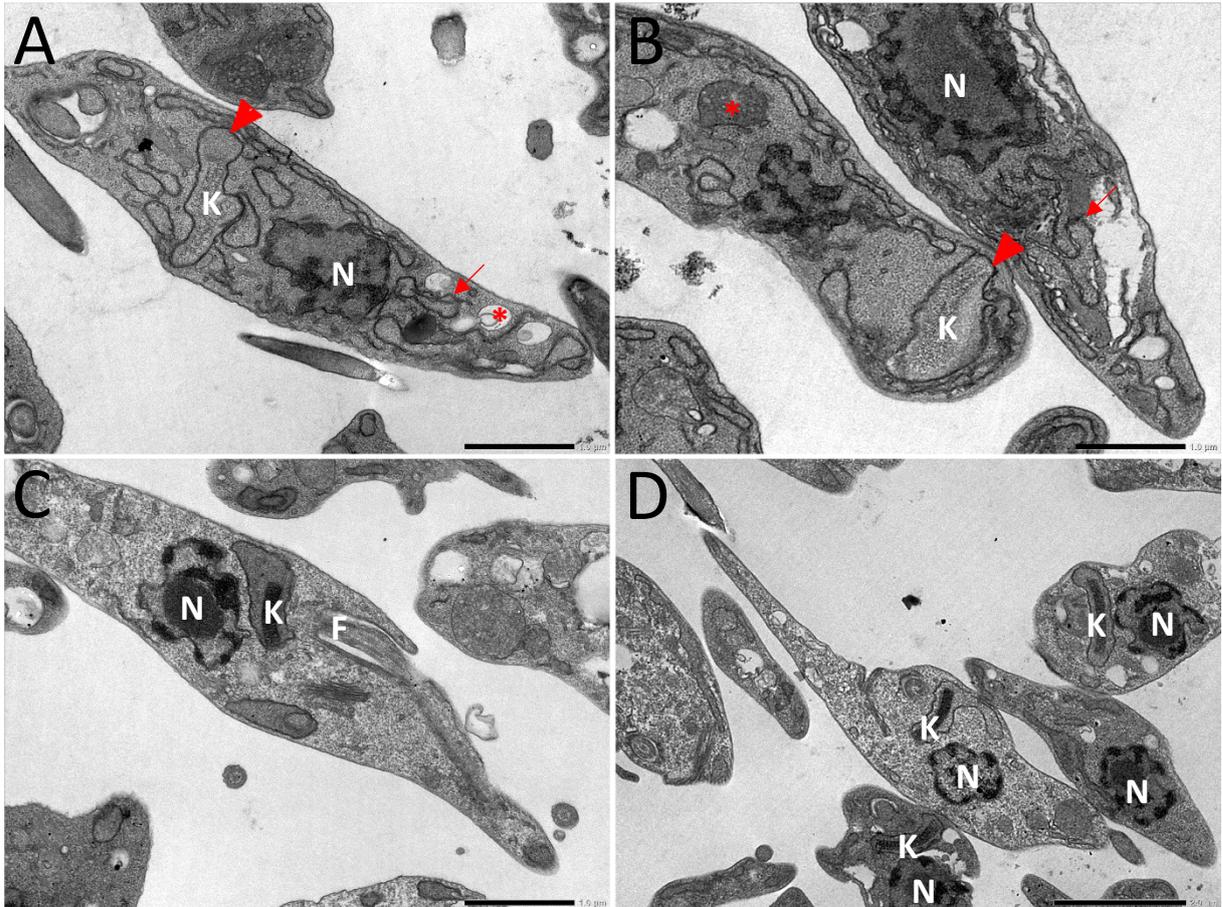


Figura 24 – Avaliação ultraestrutural intracelular dos parasitas TcAct4 KO complementados. Micrografia eletrônica de transmissão de formas epimastigotas de *T. cruzi* complementados com a actina 4. (A-B) TcAct4 KO complementado com pTcGFPn-Act4. (C-D) TcAct4 KO complementado com pTcGFPc-Act4. (N) núcleo. (K) cinetoplasto. (F) flagelo. (*) vesículas com aspectos anormais; setas mostram perfis de membrana; ponta de seta mostra cinetoplasto alterado;

5.4 Imunoprecipitação e espectrometria de massas

Uma vez que o fenótipo da população TcAct4 KO foi revertido com a expressão da actina TcAct4 fusionada a etiqueta GFP na porção carboxi-terminal, esta mesma estratégia foi escolhida para os ensaios de imunoprecipitação. Para isso formas epimastigotas de *T. cruzi* selvagem foram transfectadas com o vetor pTcGFPc-Act4 (vetor de expressão da actina 4 fusionada a etiqueta GFP na posição carboxi-terminal), dando origem a população TcAct4GFP. A expressão da actina 4 fusionada a GFP foi avaliada por *western blot*, usando o antissoro anti-TcAct4 (Figura 25 A). No extrato proteico dos parasitas transfectados foi possível observar duas bandas, compatíveis com os tamanhos esperados para a actina TcAct4 selvagem, de

aproximadamente 46 kDa, e para a fusão TcAct4-GFP, de aproximadamente 74 kDa. A localização subcelular da TcAct4-GFP foi determinada por imunofluorescência com dupla marcação, utilizando o antissoro anti-TcAct4 e o antissoro anti-GFP (Figura 25 B). Análise por microscopia confocal mostrou co-localização entre a marcação para actina TcAct4 selvagem e para a fusão TcAct4-GFP.

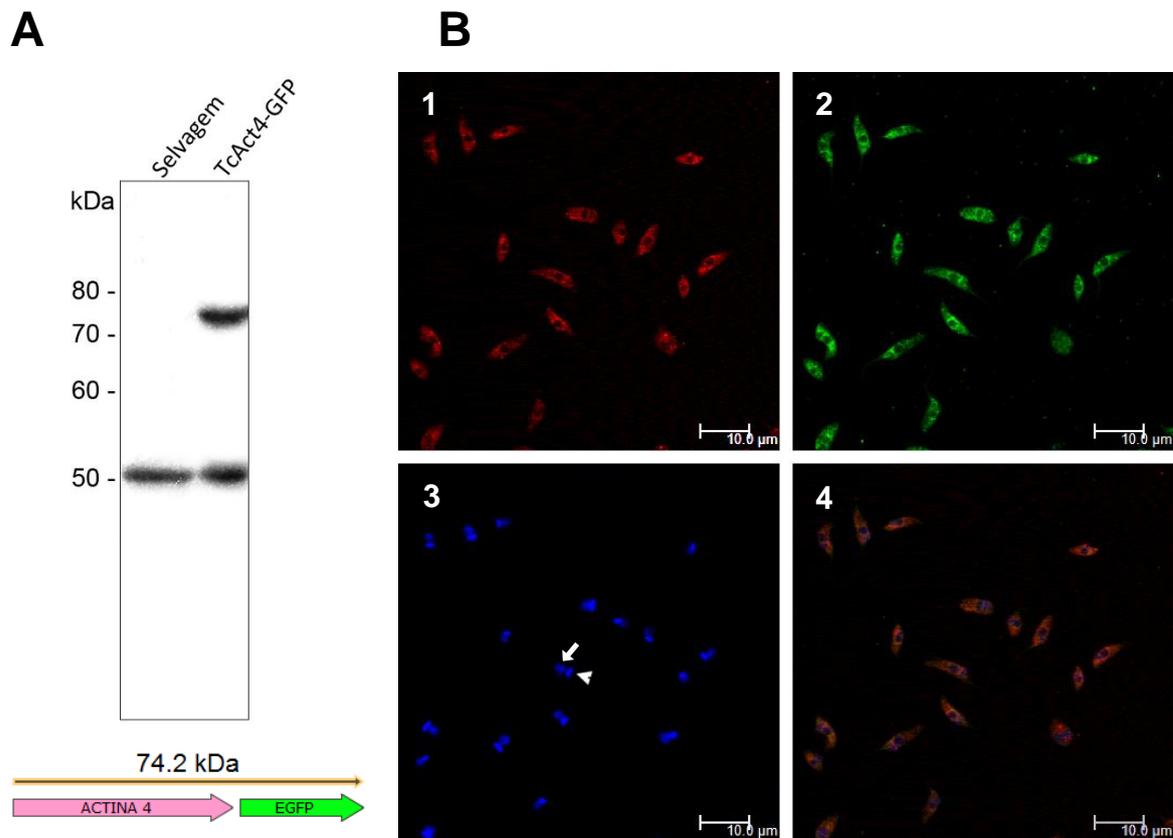


Figura 25 – Expressão e distribuição subcelular da actina 4 fusionada a etiqueta GFP na porção carboxi-terminal. (A) *Western blot* dos extratos proteicos de *T. cruzi* selvagem e TcAct4-GFP incubados com o antissoro anti-TcAct4 na diluição 1:500 e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase na diluição de 1:10.000. (B) Microscopia confocal de formas epimastigota com o antissoro anti-TcAct4 (1) na diluição 1:150 e com antissoro anti-GFP (2) na diluição 1:150; (3) núcleo (seta) e cinetoplasto (ponta de seta); (4) sobreposição das fluorescências.

Após a confirmação da expressão e localização subcelular da TcAct4-GFP, os extratos dos parasitas TcAct4GFP foram submetidos a ensaios de imunoprecipitação.

Testes com diferentes tampões foram realizados para encontrar as melhores condições para a imunoprecipitação. Em ambos os tampões testados, A (HEPES sódio 20 mM; cloreto de magnésio 1 mM; cloreto de cálcio 10 μ M, citrato de sódio 50 mM, TritonX-100 0,5%) ou B (HEPES sódio 20 mM; cloreto de magnésio 1 mM; cloreto de cálcio 10 μ M, cloreto de sódio 50 mM, TritonX-100 0,5%), foi possível precipitar a TcAct4-GFP (Figuras 26 e 27). Porém, o tampão A apresentou os melhores resultados, uma vez que nesse tampão houve enriquecimento da actina TcAct4, em relação ao tampão B (Figuras 26 B e 27 B). As amostras da imunoprecipitação com o tampão A foram escolhidas para a análise por espectrometria de massas.

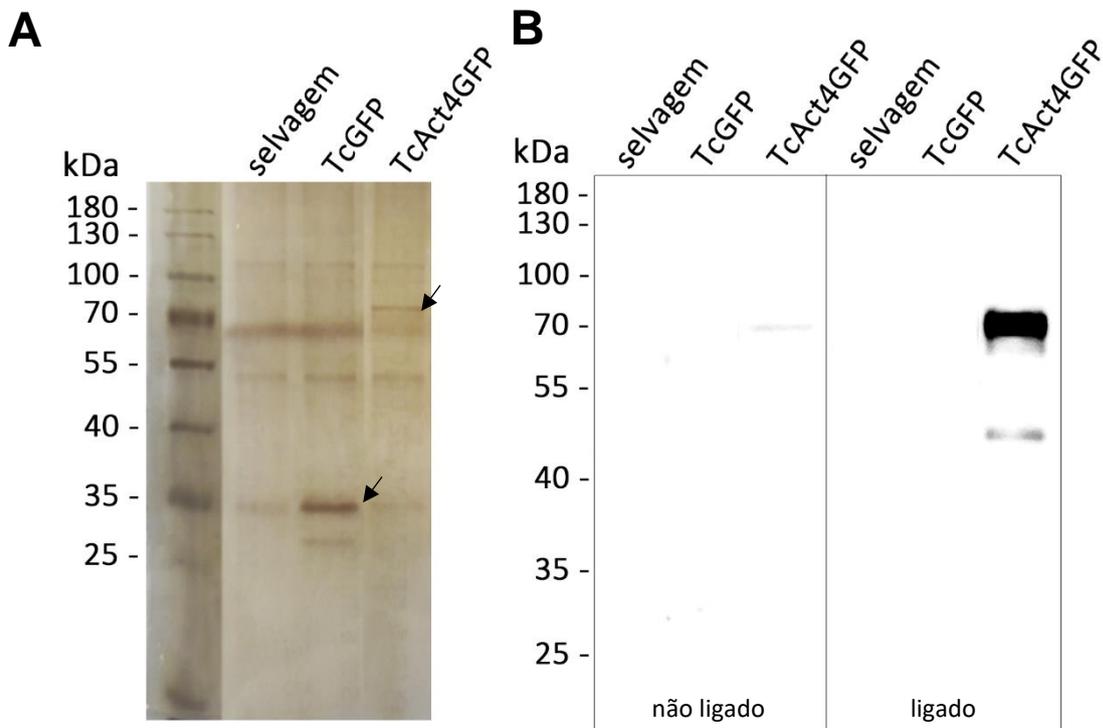


Figura 26 – Imunoprecipitação da Act4GFP em tampão A. (A) coloração com prata das frações eluídas da imunoprecipitação com os extratos de parasitas selvagem, controle expressando GFP, e expressando a actina 4 fusionada a GFP na posição carboxi-terminal. Setas apontam para a banda controle (GFP) nos parasitas TcGFP e para a actina 4 nos parasitas TcAct4GFP. (B) detecção da actina 4-GFP por *western blot* nas frações não ligadas e eluídas (ligado) da imunoprecipitação dos mesmos extratos. Os Extratos foram incubados com o antissoro anti-TcAct4 na diluição 1:500 e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase na diluição de 1:10.000.

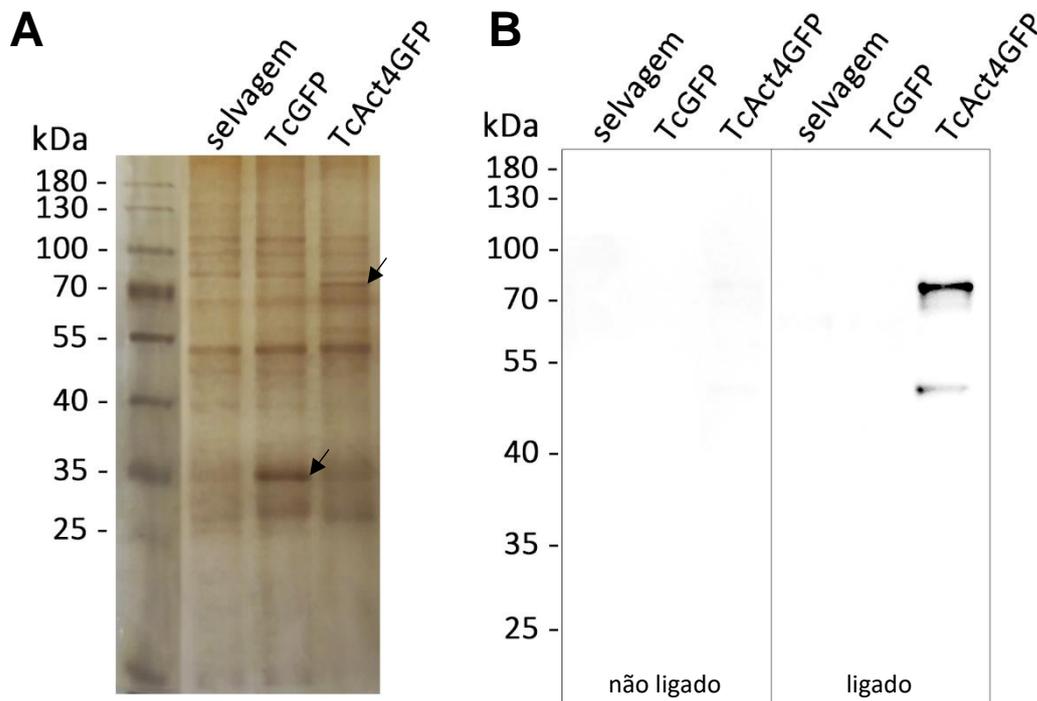


Figura 27 – Imunoprecipitação da Act4GFP em tampão B. (A) coloração com prata das frações eluídas da imunoprecipitação com os extratos de parasitas selvagem, controle expressando GFP, e expressando a actina 4 fusionada a GFP na posição carboxi-terminal. Setas apontam para a banda controle (GFP) nos parasitas TcGFP e para a actina 4 nos parasitas TcAct4GFP. (B) detecção da actina 4-GFP por *western blot* nas frações não ligadas e eluídas da imunoprecipitação dos mesmos extratos. Os Extratos foram incubados com o antissoro anti-TcAct4 na diluição 1:500 e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase na diluição de 1:10.000.

Para identificar possíveis ligantes da actina TcAct4, a imunoprecipitação foi realizada em duplicata, os extratos precipitados foram submetidos a eletroforese em gel SDS-PAGE, seguida de digestão em gel com tripsina e então os peptídeos foram identificados por cromatografia de fase reversa seguida de espectrometria de massas. Os dados foram analisados no software PatternLab (Carvalho et al., 2016). Foram selecionadas as proteínas presentes exclusivamente no extrato de TcAct4GFP. As proteínas foram classificadas de acordo com a intensidade do sinal (do maior para o menor), e a predição de função gênica foi realizada por ontologia gênica (GO) utilizando o módulo Gene Ontology Explorer no software PatternLab (Carvalho et al., 2016) (Tabela 2).

Tabela 2 – Proteínas identificadas na imunoprecipitação da TcAct4-GFP por LC-MS.

ID UniProt	ID TriTrypDB	Sinal	Descrição	GO	Função predita
V5DJL3	TCDM_03638	8.42E-03	Actina 4	Componente celular	Citoesqueleto, microfilamentos
V5DS84	TCDM_01067	2.36E-03	Fosfoglicerato quinase	Processos biológicos	Glicólise
V5DPC1	TCDM_02049	1.31E-03	Flavoproteína de transferência de elétrons	Função molecular	Transportador de elétrons
V5BT90	TCDM_03488	1.18E-03	Proteína não caracterizada		Desconhecida
V5BME4	TCDM_05847	8.93E-04	Cruzipaina	Processos biológicos	Proteólise
V5BRH3	TCDM_04252	8.93E-04	Proteína de ligação a centrômero / microtúbulo cbf5	Processos biológicos	Ligação ao DNA; Ligação ao RNA
V5BFS2	TCDM_08913	8.78E-04	Membro da família da fosfoproteína nuclear 32		Desconhecida
V5DCK9	TCDM_06593	8.23E-04	Desidrogenase de cadeia curta	Função molecular	Oxidorrredutase
V5ASQ0	TCDM_13462	7.42E-04	Retrotransposon hot spot		Desconhecida
V5BBX3	TCDM_10473	7.25E-04	Retrotransposon hot spot		Desconhecida
V5BDE4	TCDM_09878	6.98E-04	Gamma-glutamilcisteína sintetase	Função molecular	Gamma-glutamil-L-cisteína sintetase
V5ACF5	TCDM_12384	5.72E-04	Retrotransposon hot spot		Desconhecida
V5BHV6	TCDM_05854	5.22E-04	Subunidade 3 -ATPase reguladora de proteossomo	Função molecular	Proteossomo, ATPase
V5AKG4	TCDM_11268	4.93E-04	Proteína não caracterizada		Desconhecida
V5DQS5	TCDM_01508	4.89E-04	Proteína não caracterizada		Desconhecida
V5CYN1	TCDM_12142	4.77E-04	Retrotransposon hot spot		Desconhecida
V5CKM9	TCDM_12557	4.67E-04	N-acetiltransferase	Função molecular	Transferência de grupo acetil
V5DN25	TCDM_02357	4.26E-04	Metalopeptidase de zinco dependente de ATP	Processos biológicos	Proteólise
V5AIX6	TCDM_13336	4.23E-04	Retrotransposon hot spot		Desconhecida
V5DLC9	TCDM_02960	4.17E-04	Subunidade 26S reguladora de proteossoma não-ATPase	Processos biológicos	Regulação do processo catabólico proteico
V5AR65	TCDM_12415	4.15E-04	Retrotransposon hot spot		Desconhecida
V5DPM3	TCDM_01902	4.11E-04	Glucosamina-frutose-6-fosfato aminotransferase	Processos biológicos	Metabolismo de carboidratos
V5B6L2	TCDM_08993	3.82E-04	Retrotransposon hot spot		Desconhecida
V5ATG9	TCDM_13132	3.70E-04	Proteína 1 da família de genes dispersos (DGF-1)	Componente celular	Constituinte da membrana celular, faz ligação às proteínas de matriz extracelular (Kawashita et al.,2009)
V5D5V0	TCDM_09411	3.50E-04	Proteína de montagem de nucleossomos (NAP)	Processos biológicos	Montagem de nucleossomos
V5B1B3	TCDM_11070	3.49E-04	Retrotransposon hot spot		Desconhecida
V5D3T5	TCDM_10259	3.48E-04	Proteína 1 da família de genes dispersos (DGF-1)	Componente celular	Constituinte da membrana celular, faz ligação a proteínas de matriz extracelular (Kawashita et al.,2009)
V5B816	TCDM_01924	3.29E-04	ATOM36 associado periféricamente	Processos biológicos	Transporte de proteínas na matriz mitocondrial
V5BEW2	TCDM_07308	3.27E-04	Carnosina N-metiltransferase	Componente celular	Componente de granulos de estresse
V5BFE6	TCDM_07058	3.22E-04	Proteína não caracterizada	Componente celular	Presente no proteoma da membrana mitocondrial externa
V5AQQ9	TCDM_09247	3.13E-04	Retrotransposon hot spot		Desconhecida
V5AKH1	TCDM_12760	3.10E-04	Retrotransposon hot spot		Desconhecida
V5B4Y4	TCDM_09677	3.09E-04	Retrotransposon hot spot		Desconhecida

V5B8C0	TCDM_08164	3.03E-04	Proteína ativadora de GTPase	Processos biológicos	Regulação da atividade GTPásica
V5BMH4	TCDM_02283	2.99E-04	Proteína associada à classificação de proteínas para o vacúolo	Processos biológicos	Em mamíferos recupera os receptores de enzimas lisossômicas dos endossomas à rede trans-Golgi (Shi et al., 2006)
V5CJC9	TCDM_13045	2.92E-04	Retrotransposon hot spot		Desconhecida
V5BWE8	TCDM_00659	2.85E-04	ATPase de transporte de ânions	Função molecular	ATPase
V5BY50	TCDM_00189	2.62E-04	Glicerol quinase	Processos biológicos	Metabolismo de carboidratos
V5D1L0	TCDM_11050	2.47E-04	Proteína 1 da família de genes dispersos (DGF-1)	Componente celular	Constituinte da membrana celular, faz ligação às proteínas de matriz extracelular (Kawashita et al.,2009)
V5BAE3	TCDM_01046	2.42E-04	Piruvato desidrogenase (lipoamido) quinase	Processos biológicos	Regulação do complexo piruvato desidrogenase
V5BMZ6	TCDM_14025	2.42E-04	Fosfoglucomutase	Processos biológicos	Metabolismo de carboidratos
V5ASU0	TCDM_13413	2.37E-04	Proteína 1 da família de genes dispersos (DGF-1)	Componente celular	Constituinte da membrana celular, faz ligação às proteínas de matriz extracelular (Kawashita et al.,2009)
V5A473	TCDM_12980	2.35E-04	Retrotransposon hot spot		Desconhecida
V5ALZ9	TCDM_10659	2.34E-04	Proteína reguladora do complemento	Processos biológicos	Atividade de exo-alfa-sialidase, patogênese
V5DLB7	TCDM_02944	2.27E-04	Proteína 1 da família de genes dispersos (DGF-1)	Componente celular	Constituinte da membrana celular, faz ligação às proteínas de matriz extracelular (Kawashita et al.,2009)
V5A615	TCDM_12497	2.26E-04	Proteína 1 da família de genes dispersos (DGF-1)	Componente celular	Constituinte da membrana celular, faz ligação às proteínas de matriz extracelular (Kawashita et al.,2009)
V5ASV7	TCDM_08172	2.17E-04	Proteína de transporte de proteínas Sec23A	Processos biológicos	Transporte do RE para o CG mediado por vesículas
V5ANL3	TCDM_13312	2.08E-04	Proteína 1 da família de genes dispersos (DGF-1)	Componente celular	Constituinte da membrana celular, faz ligação às proteínas de matriz extracelular (Kawashita et al.,2009)
V5B5R0	TCDM_11076	1.99E-04	Proteína 1 da família de genes dispersos (DGF-1)	Componente celular	Constituinte da membrana celular, faz ligação às proteínas de matriz extracelular (Kawashita et al.,2009)
V5D2D2	TCDM_10792	1.96E-04	Proteína 1 da família de genes dispersos (DGF-1)	Componente celular	Constituinte da membrana celular, faz ligação às proteínas de matriz extracelular (Kawashita et al.,2009)
V5A466	TCDM_12991	1.71E-04	Proteína 1 da família de genes dispersos (DGF-1)	Componente celular	Constituinte da membrana celular, faz ligação às proteínas de matriz extracelular (Kawashita et al.,2009)

V5B1R9	TCDM_04320	1.69E-04	Proteína não caracterizada		Desconhecida
V5BGC6	TCDM_06638	1.66E-04	2OG-Fe (II) oxigenase	Processos biológicos	Atividade oxidoreductora
V5CVR5	TCDM_12272	1.64E-04	Proteína 1 da família de genes dispersos (DGF-1)	Componente celular	Constituinte da membrana celular, faz ligação às proteínas de matriz extracelular (Kawashita et al.,2009)
V5BG77	TCDM_06677	1.36E-04	Importina subunidade beta-4	Função molecular	Receptor de transporte nuclear
V5AN37	TCDM_10243	1.35E-04	Proteína 1 da família de genes dispersos (DGF-1)	Componente celular	Constituinte da membrana celular, faz ligação às proteínas de matriz extracelular (Kawashita et al.,2009)
V5B5N6	TCDM_11111	1.26E-04	Proteína 1 da família de genes dispersos (DGF-1)	Componente celular	Constituinte da membrana celular, faz ligação às proteínas de matriz extracelular (Kawashita et al.,2009)
V5D2B1	TCDM_10813	1.25E-04	Proteína transportadora Mg ⁺² semelhante a CorA	Função molecular	Transportador transmembrana de íons metálicos
V5ANL0	TCDM_13316	1.25E-04	Proteína 1 da família de genes dispersos (DGF-1)	Componente celular	Constituinte da membrana celular, faz ligação às proteínas de matriz extracelular (Kawashita et al.,2009)
V5B6S9	TCDM_10694	1.20E-04	Proteína 1 da família de genes dispersos (DGF-1)	Componente celular	Constituinte da membrana celular, faz ligação às proteínas de matriz extracelular (Kawashita et al.,2009)
V5AUT9	TCDM_12325	1.15E-04	Proteína 1 da família de genes dispersos (DGF-1)	Componente celular	Constituinte da membrana celular, faz ligação às proteínas de matriz extracelular (Kawashita et al.,2009)
V5B9H6	TCDM_09634	1.02E-04	Proteína 1 da família de genes dispersos (DGF-1)	Componente celular	Constituinte da membrana celular, faz ligação às proteínas de matriz extracelular (Kawashita et al.,2009)
V5B5D3	TCDM_12226	1.01E-04	Proteína 1 da família de genes dispersos (DGF-1)	Componente celular	Constituinte da membrana celular, faz ligação às proteínas de matriz extracelular (Kawashita et al.,2009)
V5CYV5	TCDM_12058	9.85E-05	Proteína 1 da família de genes dispersos (DGF-1)	Componente celular	Constituinte da membrana celular, faz ligação às proteínas de matriz extracelular (Kawashita et al.,2009)
V5B4C6	TCDM_11612	9.56E-05	Proteína 1 da família de genes dispersos (DGF-1)	Componente celular	Constituinte da membrana celular, faz ligação às proteínas de matriz extracelular (Kawashita et al.,2009)
V5AUS9	TCDM_12331	9.39E-05	Proteína 1 da família de genes dispersos (DGF-1)	Componente celular	Constituinte da membrana celular, faz ligação às proteínas de matriz extracelular (Kawashita et al.,2009)
V5BPP6	TCDM_01530	9.37E-05	Repetições de armadillo / beta-catenina	Função molecular	Sinalização intracelular e a regulação do citoesqueleto (Hatzfeld M., 1999)

V5AI55	TCDM_12179	9.20E-05	Proteína 1 da família de genes dispersos (DGF-1)	Componente celular	Constituinte da membrana celular, faz ligação às proteínas de matriz extracelular (Kawashita et al.,2009)
V5B4J9	TCDM_11541	8.87E-05	Proteína 1 da família de genes dispersos (DGF-1)	Componente celular	Constituinte da membrana celular, faz ligação a proteínas de matriz extracelular (Kawashita et al.,2009)
V5BBR5	TCDM_10539	8.51E-05	Proteína 1 da família de genes dispersos (DGF-1)	Componente celular	Constituinte da membrana celular, faz ligação às proteínas de matriz extracelular (Kawashita et al.,2009)
V5BAK5	TCDM_10978	8.44E-05	Proteína 1 da família de genes dispersos (DGF-1)	Componente celular	Constituinte da membrana celular, faz ligação às proteínas de matriz extracelular (Kawashita et al.,2009)
V5B0M7	TCDM_12241	8.37E-05	Proteína 1 da família de genes dispersos (DGF-1)	Componente celular	Constituinte da membrana celular, faz ligação às proteínas de matriz extracelular (Kawashita et al.,2009)
V5B9L4	TCDM_09588	8.10E-05	Proteína 1 da família de genes dispersos (DGF-1)	Componente celular	Constituinte da membrana celular, faz ligação às proteínas de matriz extracelular (Kawashita et al.,2009)
V5B286	TCDM_10725	7.84E-05	Proteína 1 da família de genes dispersos (DGF-1)	Componente celular	Constituinte da membrana celular, faz ligação às proteínas de matriz extracelular (Kawashita et al.,2009)
V5CUL8	TCDM_12305	7.40E-05	Proteína 1 da família de genes dispersos (DGF-1)	Componente celular	Constituinte da membrana celular, faz ligação às proteínas de matriz extracelular (Kawashita et al.,2009)
V5AWQ4	TCDM_12395	7.16E-05	Proteína 1 da família de genes dispersos (DGF-1)	Componente celular	Constituinte da membrana celular, faz ligação às proteínas de matriz extracelular (Kawashita et al.,2009)
V5B1X3	TCDM_10883	7.15E-05	Proteína 1 da família de genes dispersos (DGF-1)	Componente celular	Constituinte da membrana celular, faz ligação às proteínas de matriz extracelular (Kawashita et al.,2009)
V5BFK1	TCDM_09008	7.12E-05	Proteína 1 da família de genes dispersos (DGF-1)	Componente celular	Constituinte da membrana celular, faz ligação às proteínas de matriz extracelular (Kawashita et al.,2009)
V5AIY5	TCDM_11886	6.55E-05	Proteína 1 da família de genes dispersos (DGF-1)	Componente celular	Constituinte da membrana celular, faz ligação às proteínas de matriz extracelular (Kawashita et al.,2009)
V5APH4	TCDM_09673	6.39E-05	Proteína 1 da família de genes dispersos (DGF-1)	Componente celular	Constituinte da membrana celular, faz ligação às proteínas de matriz extracelular (Kawashita et al.,2009)

V5B8Z8	TCDM_11589	6.20E-05	Proteína 1 da família de genes dispersos (DGF-1)	Componente celular	Constituinte da membrana celular, faz ligação às proteínas de matriz extracelular (Kawashita et al.,2009)
V5AI88	TCDM_12145	5.91E-05	Proteína 1 da família de genes dispersos (DGF-1)	Componente celular	Constituinte da membrana celular, faz ligação às proteínas de matriz extracelular (Kawashita et al.,2009)
V5D6F2	TCDM_14469	4.99E-05	Proteína 1 da família de genes dispersos (DGF-1)	Componente celular	Constituinte da membrana celular, faz ligação às proteínas de matriz extracelular (Kawashita et al.,2009)
V5BFF7	TCDM_06977	4.93E-05	Proteína 1 da família de genes dispersos (DGF-1)	Componente celular	Constituinte da membrana celular, faz ligação às proteínas de matriz extracelular (Kawashita et al.,2009)
V5B0A9	TCDM_11466	4.82E-05	Proteína 1 da família de genes dispersos (DGF-1)	Componente celular	Constituinte da membrana celular, faz ligação às proteínas de matriz extracelular (Kawashita et al.,2009)
V5B7C8	TCDM_10451	4.73E-05	Proteína 1 da família de genes dispersos (DGF-1)	Componente celular	Constituinte da membrana celular, faz ligação às proteínas de matriz extracelular (Kawashita et al.,2009)
V5AL06	TCDM_11058	4.16E-05	Proteína 1 da família de genes dispersos (DGF-1)	Componente celular	Constituinte da membrana celular, faz ligação às proteínas de matriz extracelular (Kawashita et al.,2009)
V5D482	TCDM_13867	4.06E-05	Proteína 1 da família de genes dispersos (DGF-1)	Componente celular	Constituinte da membrana celular, faz ligação às proteínas de matriz extracelular (Kawashita et al.,2009)

6 DISCUSSÃO

A actina é uma das proteínas mais abundantes nas células eucarióticas e participa de diversos processos celulares, tais como: formação e transporte de vesículas, mudanças da forma celular, divisão celular, motilidade, entre outras. Esses eventos requerem a formação de filamentos de actina, de uma maneira regulada temporal e espacialmente. A actina também é uma das proteínas mais conservadas ao longo da evolução.

O protozoário *T. cruzi*, que pertence a um grupo de organismos que divergiu muito cedo ao longo da evolução, possui várias isoformas de actinas, bem como um repertório de proteínas relacionadas à actina (ARPs) (DE MELO et al., 2008; CEVALLOS et al., 2011). Contudo, as funções dessas proteínas ainda não foram estabelecidas em *T. cruzi*, uma vez que não foram observados filamentos de actina nesse parasita, como ocorre em outros eucariotos (DE SOUZA, 2009.)

Entretanto, mesmo classificadas como actinas devido à similaridade com actinas de outros eucariotos, não há nenhuma evidência experimental que prove se todas as isoformas de actina de *T. cruzi* desempenham funções similares as actinas eucarióticas e até mesmo se elas formam filamentos. Além disso, as análises de busca de sequências mostraram que nem todas elas estão conservadas em todos os tripanosomatídeos, sugerindo que elas tenham funções diversificadas. Das quatro isoformas de actina de *T. cruzi*, a TcAct4 é a isoforma menos conservada, tanto quando comparada a actinas de outros modelos eucarióticos, quanto quando comparada com as outras isoformas de actina de *T. cruzi*, estando filogeneticamente mais próxima a ARPs (CEVALLOS et al., 2011). Actinas de protozoários são descritas como menos conservadas. O percentual de identidade entre sequências de actina de *Paramecium tetraurelia*, por exemplo, varia entre 80% a 30% (SEHRING et al. 2007).

A actina TcAct4 apresenta ortólogos em diversos tripanosomatídeos e, curiosamente, não foi identificado um ortólogo em *T. brucei*. Uma hipótese provável é que a actina TcAct4 estava presente na linhagem ancestral de *Leishmania* e *Trypanosoma*, antes da diversificação de ambos os gêneros e houve uma perda secundária em *T. brucei* (Cevallos et al., 2011). Nos tripanosomatídeos em que há a presença de gene ortólogo de *TcAct4*, este é mantido em sintonia.

Os resultados das análises *in silico* mostraram que embora a sequência da actina TcAct4 apresente uma grande variação em relação às demais actinas, sua

estrutura parece estar conservada quando comparada à actina e ARPs de diversos outros organismos. No modelamento tridimensional, os melhores hits foram para proteínas actina e para as ARPs 1 (humana, *P. falciparum*), 4 (*S. cerevisiae*) e 8 (humana). As ARPs mostram grande similaridade estrutural com as actinas (OMA & HARATA, 2011) e podem hidrolisar ATP (MULLER et al., 2005). Nem todas as ARPs são expressas em todos eucariotos e, a partir de suas propriedades estruturais, bioquímicas e funcionais elas são classificadas em subfamílias (JOCKUSCH & GRAUMANN, 2011). A Arp1 é a única ARP conhecida capaz de formar filamentos curtos, que servem de estrutura base para a montagem do complexo conhecido com dinactina. Este complexo faz a ligação entre vesículas e organelas delimitadas por membrana e a proteína motora dineína, durante o transporte vesicular através dos microtúbulos (SCHAFER et al., 1994). As Arps 4 e 8 são proteínas nucleares encontradas em complexos de remodelamento da cromatina (SHEN et al. 2000).

Para analisar a expressão e localização subcelular da TcAct4, foi produzido o antissoro anti-TcAct4, que foi capaz de reconhecer uma única banda de aproximadamente 46 kDa em extrato proteico de epimastigota de *T. cruzi*. Assim como observado para a TcAct1 (CEVALLOS et al., 2011), a TcAct4 também é expressa em todas as fases do ciclo de vida do parasita, sugerindo que essa actina atua em diferentes processos celulares estágio-específicos. Nas formas amastigotas, obtidas por cavitação, foram detectadas duas bandas, uma com tamanho esperado para a TcAct4, e outra provavelmente devido a uma reação inespecífica com proteínas derivadas da célula hospedeira (células VERO).

Ao contrário da TcAct2, que está concentrada na região perinuclear nas formas epimastigotas (BORGES, 2016), a localização subcelular da TcAct4 é semelhante a observada para a TcAct1 (DE MELLO et al., 2008; CEVALLOS et al., 2011), dispersa por todo o corpo celular do parasita, com pontos de concentração da marcação. Por microscopia eletrônica de transmissão foi possível observar estruturas lineares compatíveis com microfilamentos curtos. Uma vez que TcAct4 também apresenta similaridade estrutural com Arp1, que forma filamentos curtos (SHEN et al. 2000), é razoável considerar a hipótese de que TcAct4 seja um ortólogo de Arp1. Mais improvável é a ortologia com as proteínas Arp4 e Arp8, uma vez que ambas são nucleares (SHEN et al. 2000) e TcAct4 é predominantemente citoplasmática.

Além disso, TcAct4 foi observada somente na fração solúvel de extratos proteicos de formas epimastigotas, indicando que ela não está na forma filamentosa.

Uma vez que actinas formam filamentos, esse resultado sugere que TcAct4 pode ter funções distintas daquelas das actinas canônicas. Não podemos excluir, entretanto, que as actinas de *T. cruzi* sejam muito divergentes e não formem filamentos longos ou tenham ocorrência transitória, quer pela sua estrutura ancestral, quer pela ausência de maquinaria para auxiliar nessa função. Em *T. gondii*, a actina também está presente quase que exclusivamente como monômeros (DOBROWOLSKI et al., 1997). Contudo, usando técnica de congelamento rápido associado à microscopia eletrônica, filamentos de actina foram observados abaixo da membrana citoplasmática do *T. gondii* e se mostraram essenciais para a invasão da célula hospedeira, sugerindo que a formação dos filamentos de actina neste protozoário é transitória (WETZEL et al., 2003).

Para avaliar a função da TcAct4, foram obtidos parasitas nocaute utilizando o sistema CRISPR-Cas9 (PENG et al., 2015). Esta estratégia possui a vantagem de não necessitar de marcadores de seleção e de se conhecer a região onde ocorre a quebra do DNA, possibilitando diferentes estratégias para a obtenção e triagem dos parasitas. A estratégia escolhida foi a inserção de códons de parada nas três possíveis fases de leitura ancorados por regiões de homologia de 30 pb de cada lado. Esta estratégia foi eficiente na obtenção dos parasitas TcAct4 KO, com triagem realizada por PCR e posteriormente, por sequenciamento, foi confirmada a inserção dos códons de parada na região de escolha. A ausência da TcAct4 foi demonstrada tanto por western blot quanto por imunofluorescência. A ausência de TcAct4 acarretou redução no crescimento do parasita nocaute em relação ao selvagem. Para os processos de diferenciação e infecção não foram observadas diferenças significativas entre a população TcAct4 KO e a população selvagem. Contudo, em *T. brucei*, o silenciamento da actina por RNAi cessou a endocitose, causou imediata interrupção da divisão celular, alterações na morfologia e morte celular depois de no máximo três dias após a indução do RNAi nas formas sanguíneas, e não teve nenhum efeito nas formas procíclicas (GARCIA-SALCEDO et al., 2004). Uma vez que os parasitas TcAct4 KO são viáveis, é possível que TcAct4 desempenhe funções mais especializadas e que não estejam necessariamente relacionadas com aquelas da(s) actina(s) propriamente dita(s). Uma outra possibilidade é que a presença de mais de uma isoforma de actina em *T. cruzi* resulte em redundância de funções, de tal maneira que a ausência de TcAct4 não torna o parasita inviável. As análises de localização celular e solubilidade indicam que, pelo menos em epimastigotas, TcAct1 (CEVALOS

et al., 2011) e TcAct4 estão organizadas de maneira similar no corpo do *T. cruzi*. Essa hipótese pode explicar porque os parasitas mutantes nulos para TcAct4 mesmo possuindo alterações ultraestruturais significativas em relação ao conteúdo de vesículas e ao kDNA, sejam viáveis. Houve descompactação parcial do DNA mitocondrial, além de ser observada uma distensão da membrana do cinetoplasto. Foi observada também a presença de perfis de membrana, que nós acreditamos serem membranas mitocondriais. Outra alteração observada foi a formação de vesículas com característica de corpos multivesiculares e a presença de grandes vesículas que acreditamos ser reservossomos alterados. Desta forma, os resultados nos levam a acreditar que a TcAct4 é importante nos processos de tráfego vesicular e que sua ausência leva a alterações mitocondriais pela inibição parcial do transporte de vesículas contendo proteínas mitocondriais para a organela. Além disso, a presença de vesículas e corpos multivesiculares pode ser causada por um congestionamento, causado pelo mau funcionamento dos processos de tráfego vesicular.

Para avaliar se o fenótipo observado nos parasitas TcAct4 KO pode ser revertido na presença da actina 4, foi realizado o resgate gênico com a inserção de uma cópia ectópica do gene *TcAct4* em duas construções distintas, a primeira que insere a etiqueta GFP na porção amino-terminal e outra que insere na porção carboxi-terminal. Já é bem descrita na literatura a expressão de proteínas actina de protozoários fusionadas a diferentes etiquetas sem perda de função (WETZEL et al., 2003; ANGRISANO et al., 2012). Em *Plasmodium berghei*, por exemplo, a actina manteve preservadas suas funções após o etiquetamento com GFP na posição amino-terminal, o que possibilitou a visualização dos eventos após a invasão celular (ANGRISANO et al., 2012). Uma estratégia similar foi utilizada para o etiquetamento da actina em *T. gondii* utilizando como etiqueta a proteína fluorescente amarela (YFP). Neste caso, a adição da etiqueta não causou modificações nos padrões de expressão e distribuição subcelular da actina (WETZEL et al., 2003). Ao contrário do observado nesses trabalhos, a adição da etiqueta GFP na porção amino-terminal interferiu na atividade da TcAct4. Com esta construção, os fenótipos observados nos parasitas TcAct4 KO não foram revertidos. Os parasitas TcAct4 KO complementados com TcAct4 com GFP-N-terminal tiveram crescimento inferior aos parasitas TcAct4 KO, provavelmente devido a presença da proteína não funcional, somada ao efeito causado pela adição do antibiótico de seleção. Já a construção TcAct4 com GFP-C-terminal foi capaz de reverter totalmente o fenótipo dos parasitas TcAct4 KO. Nesses

parasitas não foi observada a presença dos perfis de membrana, bem como dos corpos multivesiculares ou de qualquer alteração na ultraestrutura mitocondrial.

Como a construção TcAct4-GFP-C-terminal foi a única capaz de reverter o fenótipo do nocaute, esta mesma estratégia foi escolhida para a imunoprecipitação, a fim de analisar proteínas com que TcAct4 interage. Para executarem suas funções celulares, Actinas e ARPs interagem com um vasto catálogo de proteínas. A inibição e estimulação da formação de filamentos, bem como ligação com diferentes compartimentos celulares são regulados por tais complexos (CHHABRA & HIGGS, 2007). Para isso, parasitas selvagens foram transfectados com o vetor ectópico de expressão gerando a população TcAct4GFP. Como controles foram utilizados extratos de parasitas selvagem e expressando somente a etiqueta GFP. Foram selecionadas as proteínas presentes somente no extrato de TcAct4GFP.

A análise das proteínas co-precipitadas, contudo, mostrou um número bem diversificado de proteínas associadas com diferentes processos metabólicos e com distintas localizações celulares, não permitindo fazer muitas inferências sobre quais dessas proteínas são realmente parceiras de TcAct4 ou em que vias TcAct4 atua.

Grande parte das proteínas co-precipitadas fazem parte da família DGF-1 e retrotransposon *hot spot* (proteínas RHS). As proteínas da família DGF-1 são expressas no citoplasma de epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas (LANDER et al., 2010), e na superfície celular de tripomastigotas (KAWASHITA et al., 2009). Foi demonstrada a presença de fragmentos peptídicos de proteínas da família DGF-1 no sobrenadante de meio de cultura de diferenciação *in vitro* (de tripomastigota para amastigota), indicando a secreção dessas proteínas (LANDER et al., 2010). As proteínas DGF-1 apresentam motivos conservados de adesina e acredita-se que tenham função associada com a habilidade do *T. cruzi* se ligar a proteínas da matriz extracelular, como fibronectina e laminina (KAWASHITA et al., 2009). Um grande número de proteínas RHS também foi co-precipitada com TcAct4. Essas proteínas foram caracterizadas em *T. brucei* e compartilham entre 13 a 96% de identidade entre si. Análise por imunofluorescência mostrou que elas são majoritariamente nucleares (BRINGAUD et al., 2002). Entretanto, a análise do fenótipo dos parasitas TcAct4 KO, não parece sugerir que essas proteínas atuem diretamente nas vias que TcAct4 opera.

Dentre as proteínas identificadas, contudo, a proteína Sec23a, que faz parte do complexo adaptador II (COPII), a subunidade Sec23 possui papel fundamental na

montagem do revestimento COPII e interage fisicamente e funcionalmente com proteínas envolvidas tanto na ligação de vesículas quanto no transporte ao longo de microtúbulos, vinculando os eventos de formação de vesículas com o de transporte anterógrado (FROMME et al., 2008); e uma proteína que participa de um complexo proteico envolvido no transporte retrógrado de proteínas dos endossomos para a rede *trans*-Golgi (UniProt:V5BMH4) (SEAMAN et al., 1998) parecem ser bastante promissoras como parceiras de TcAct4, assumindo que essa actina participa de processos de formação/tráfego de vesículas em *T. cruzi*, como evidenciado nos parasitas TcAct4 KO.

Foram identificadas também algumas proteínas mitocondriais entre elas a ATOM36. A proteína ATOM36 faz parte de um complexo presente na membrana da mitocôndria que medeia o transporte de proteínas para a matriz (PUSNIK et al., 2011; revisto por HARSMAN e SCHNEIDER, 2016). Interessante notar que os parasitas TcAct4 KO apresentaram, além da intensa formação de vesículas, uma desorganização do DNA mitocondrial e presença de perfis de membrana compatíveis com membranas mitocondriais, colocando o sistema de translocase mitocondrial como provável sítio de interação com TcAct4.

Ensaio de imunoprecipitação usando essas proteínas como iscas poderão confirmar se de fato TcAct4 interage com elas, resultando em importante contribuição para estabelecer o papel dessa actina na biologia do *T. cruzi*.

7 CONCLUSÕES

A sequência da TcAct4 apresenta uma grande variação em relação às demais actinas, porém a sua estrutura parece estar conservada quando comparada a actina e ARPs.

A TcAct4 é expressa em todas as fases de desenvolvimento do parasita, e sua localização subcelular mostrou um padrão disperso por todo o citoplasma, com concentração parcial em estruturas citoplasmáticas lineares, compatível com microfilamentos curtos, que podem ser observadas distribuídas ao longo do corpo celular e também no flagelo.

A presença da TcAct4 na fração solúvel dos extratos proteicos das formas epimastigotas sugere que a proteína está majoritariamente na forma monomérica.

O nocaute do gene *TcAct4* causou redução na proliferação celular. Contudo, não houve alterações nos processos de infectividade ou diferenciação *in vitro* nos parasitas TcAct4 KO.

Os parasitas TcAct4 KO apresentaram intensa formação de vesículas no citoplasma, com característica de corpos multivesiculares, sugerindo que a proteína TcAct4 está envolvida na formação e transporte de vesículas.

Os parasitas TcAct4 KO também apresentam alterações mitocondriais, tais como descompactação do kDNA, distensão da membrana do cinetoplasto, e presença de perfis de membrana compatíveis com a mitocôndria.

Os fenótipos dos parasitas TcAct4 KO foram revertidos quando transfectados com construções expressando a proteína TcAct4 fusionada a GFP-C-terminal.

Ensaio de imunoprecipitação seguidos da análise por espectrometria de massas identificaram a associação de TcAct4 com proteínas de diversas vias metabólicas e processos celulares, algumas delas envolvidas com tráfego de vesículas e translocação de proteínas para a mitocôndria, vias que se bloqueadas são compatíveis com os fenótipos encontrados nos parasitas TcAct4 KO.

8 PERSPECTIVAS

Realizar imunoprecipitação reversa das proteínas que co-precipitaram com a TcAct4GFPe avaliar a presença da actina 4 por *western blot*.

Avaliar a capacidade de hidrólise de ATP *in vitro* da TcAct4, por espectrofotometria.

Avalia a capacidade de polimerização *in vivo* da TcAct4, por microscopia eletrônica.

Avaliar a atividade e a função mitocondrial dos parasitas TcAct4 KO por ensaio de determinação do potencial de membrana em citometria de fluxo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADUNG'A, V. O., GADELHA, C., & FIELD, M. C. **Proteomic Analysis of Clathrin Interactions in Trypanosomes Reveals Dynamic Evolution of Endocytosis.** *Traffic*, 14(4), 440–457, 2013. <https://doi.org/10.1111/tra.12040>
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula.** 6ª ed. Porto Alegre: Artmed 2017.
- ALLEN, C. L., LIAO, D., CHUNG, W.-L., FIELD, M. C. **Dileucine signal-dependent and AP-1-independent targeting of a lysosomal glycoprotein in *Trypanosoma brucei*.** *Molecular & Biochemical Parasitology*, 156, 175–190, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.07.020>
- ARAVINDCORRESPONDING, L., KOONIN E. V. **The DNA-repair protein AlkB, EGL-9, and leprecan define new families of 2-oxoglutarate- and iron-dependent dioxygenases.** *Genome Biology*. 2001.
- BATISTA, C. M., KESSLER, R. L., EGER, I., SOARES, M. J. **Trypanosoma cruzi Intracellular Amastigotes Isolated by Nitrogen Decompression Are Capable of Endocytosis and Cargo Storage in Reservosomes.** *Plos One*. v.10 (6), 2015.
- BATISTA, C. M., SOARES MEDEIROS, L. C., EGER, I., SOARES, M. J. **mAb CZP-315.D9: An Antirecombinant Cruzipain Monoclonal Antibody That Specifically Labels the Reservosomes of *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes.** *BioMed Research International*. 2014.
- BEN AMAR, M. F., PAYS, A., TEBABI, P., DERO, B., SEEBECK, T., STEINERT, M., PAYS, E. **Structure and transcription of the actin gene of *Trypanosoma brucei*.** *Molecular and Cellular Biology*, 8(5), 2166–76, 1988. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3386635>
- BORK P, SANDER C, VALENCIA A. **An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 7290-94, 1992.
- BOURGUIGNON, S. C., DE SOUZA, W., & SOUTO-PADRÃO, T. **Localization of lectin-binding sites on the surface of *Trypanosoma cruzi* grown in chemically defined conditions.** *Histochemistry and Cell Biology*, 110(5), 527–534, 1998. <https://doi.org/10.1007/s004180050314>
- BRENER, Z., CHIARI, E. **Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*.** *Rev Inst Med Trop São Paulo* 5: 220-224, 1963.
- BRINGAUD F, BITEAU N, MELVILLE SE, HEZ S, EL-SAYED NM, LEECH V, BERRIMAN M, HALL N, DONELSON JE, BALTZ T. **A new, expressed multigene family containing a hot spot for insertion of retroelements is associated with polymorphic subtelomeric regions of *Trypanosoma brucei*.** *Eukaryot Cell*, v. 1, p. 137-151, 2002.

BROADHEAD R., DAWE H. R., FARR H., GRIFFITHS S., HART S. R., PORTMAN N., SHAW M. K., GINGER M. L., GASKELL S. J., MCKEAN P. G. AND GULL, K. **Flagellar motility is required for the viability of the bloodstream trypanosome.** Nature. v. 440, p. 224–227, 2006.

CAMARGO, E. P. **Growth and differentiation of Trypanosoma cruzi. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media.** Rev Inst Med Trop. v. 6, p. 93-100, 1964

CAMPBELL, D. A. THOMAS S., STURM N. R. **Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal?** Microbes and infection. v. 5, P. 1231-41, 2003.

CAMPELLONE, K. G., WELCH, M. D. **A nucleator arms race: cellular control of actin assembly.** Nat Rev Mol Cell Biol. v. 11, p. 237-251, 2010.

CAVALIER-SMITH, T. **Kingdoms Protozoa and Chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree.** Biology Letters, v. 6, p. 342-5, 2010.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Disponível em: <http://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmerican/index.html>. Acesso em 15/07/2016.

CEVALLOS, A. M., LÓPEZ-VILLASEÑOR, I., ESPINOSA, N., HERRERA, J., HERNÁNDEZ, R. **Trypanosoma cruzi: allelic comparisons of the actin genes and analysis of their transcripts.** Experimental Parasitology, 103(1–2), 27–34, 2003.

CEVALLOS, A. M., SEGURA-KATO, Y. X., MERCHANT-LARIOS, H., MANNING-CELA, R., ALBERTO HERNÁNDEZ-OSORIO, L., MÁRQUEZ-DUEÑAS, C., HERNÁNDEZ, R. **Trypanosoma cruzi: Multiple actin isovariants are observed along different developmental stages.** Experimental Parasitology, 127(1), 249–259, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.08.003>

CHEN, M., SHEN, X. **Nuclear actin and actin-related proteins in chromatin dynamics.** Current Opinion in Cell Biology. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.04.009>

CHU, J.-W., VOTH, G. A. **Allostery of actin filaments: molecular dynamics simulations and coarse-grained analysis.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102(37), 13111–6, 2005. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503732102>

CONTRERAS, V. T., ARAUJO-JORGE, T. C., BONALDO, M. C., THOMAZ, N., BARBOSA, H. S., MEIRELLES, M. D. E. N., GOLDENBERG, S. **Biological aspects of the Dm 28c clone of Trypanosoma cruzi after metacyclogenesis in chemically defined media.** Mem Inst Oswaldo Cruz. v. 83(1), p. 123-33, 1988.

CONTRERAS, V. T., SALLES, J. M., THOMAS, N., MOREL, C. M., GOLDENBERG, S. **In vitro differentiation of Trypanosoma cruzi under chemically defined conditions.** Mol Biochem Parasitol. v. 16(3), p. 315-27, 1985.

DE ARRUDA, M. V., MATSUDAIRA, P. **Cloning and sequencing of the Leishmania major actin-encoding gene.** Gene. v. 139(1), p.123-5, 1994.

DE MELO, L. D. B., SANT'ANNA, C., REIS, S. A., LOURENÇO, D., DE SOUZA, W., LOPES, U. G., CUNHA E SILVA, N. L. **Evolutionary conservation of actin-binding proteins in *Trypanosoma cruzi* and unusual subcellular localization of the actin homologue.** *Parasitology*. v. 135, p. 955–965, 2008.

DE SOUZA, W. **Structural organization of *Trypanosoma cruzi*.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 104, p 89-100, 2009.

DE SOUZA, W., MEZA, I., MARTINEZ-PALOMO, A., SABANERO, M., SOUTO-PADRON, T., MEIRELLES, M. N. ***Trypanosoma cruzi*: distribution of fluorescently labeled tubulin and actin in epimastigotes.** *Journal of Parasitology*. v. 69, p. 138–142.1983.

DELIGIANNI E., MORGAN R. N., BERTUCCINI L., KOOIJ T. W., LAFORGE A., NAHAR C., POULAKAKIS N., SCHÜLER H., LOUIS C., MATUSCHEWSKI K., SIDENKIAMOS I. **Critical role for a stage-specific actin in male exflagellation of the malaria parasite.** *Cell. Microbiol*, v. 13, p. 1714–1730, 2011.

DOBROWOLSKI J. M., NIESMAN I. R., SIBLEY L. D. **Actin in the parasite *Toxoplasma gondii* is encoded by a single copy gene, ACT1 and exists primarily in a globular form.** *Cell Motil Cytoskeleton*, v. 37, p. 253–262, 1997.

ERSFELD, K., GULL, K. **Targeting of cytoskeletal proteins to the flagellum of *Trypanosoma brucei*.** *Journal of Cell Science*, 114(Pt 1), 141–148, 2000.

GARCÍA-SALCEDO, J. A., PÉREZ-MORGA, D., GIJÓN, P., DILBECK, V., PAYS, E., NOLAN, D. P. **A differential role for actin during the life cycle of *Trypanosoma brucei*.** *EMBO J*. v. 23(4), v. 780-9, 2004.

GOLEY E. D e WELCH, M. D. **The arp2/3 complex: an actin nucleator comes age.** *Nature Reviews. Mol. Cell Biol*, v. 7, p. 713-726, 2006.

GOLEY, E. D., WELCH, M. D. **The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age.** *Nat Rev Mol Cell Biol*. v. 10, p. 713-26, 2006.

GÖRLICH D., KUTAY U. **Transport between the cell nucleus and the cytoplasm.** *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 15, p. 607–660, 1999.

GRACEFFA, P., DOMINGUEZ, R. **Crystal structure of monomeric actin in the ATP state. Structural basis of nucleotide-dependent actin dynamics.** *The Journal of Biological Chemistry*, 278(36), 34172–80, 2003.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M303689200>

GULL, K. **The cytoskeleton of trypanosomatid parasites.** *Annual Review of Microbiology*. v. 53, p. 629–655, 1999.

GUPTA C. M., THIYAGARAJAN S., SAHASRABUDDHE A. A. **Unconventional actins and actin-binding proteins in human protozoan parasites.** *International Journal for Parasitology*. v. 45, p. 435-447, 2015.

- HANNAERT, V., et al. **Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida.** *Kinetoplastid Biology and Disease*, v. 2, n. 11, 2003.
- HANNAERT, V., BRINGAUD F., OPPERDOES F. R., MICHELS P. A. **Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida.** *Kinetoplastid Biology and Disease*, v. 2, n. 11, 2003.
- HARRISON J. A., KARTHA K. P. R., FOURNIER E. J. L., LOWARY T. L., MALET C., NILSSON U. J., HINDSGAUL O., SCHENKMAN S., NAISMITH J. H., FIELD R. A. **Probing the acceptor substrate binding site of Trypanosoma cruzi trans-sialidase with systematically modified substrates and glycoside libraries.** *Organic & Biomolecular Chemistry*, v. 9, p. 1653-1660. DOI: 10.1039/c0ob00826e
- HARSMAN A., SCHNEIDER A. **Mitochondrial protein import in trypanosomes: Expect the unexpected.** *Traffic*, v.18, 2017. DOI: 10.1111/tra.12463
- HATZFELD, M. **The armadillo family of structural proteins.** *International Review Cytology*, v. 186, p. 179-224, 1999.
- HERMAN, I. M. **Actin isoforms.** *Curr Opin Cell Biol.* v. 5(1), p. 48-55, 1993.
- HIDE, G. **History of Sleeping Sickness in East Africa.** *Clinical Microbiology Reviews*, v. 12, p. 112-125, 1999.
- HURLEY J. H. **The sugar kinase/heat shock protein 70/actin superfamily: implications of conserved structure for mechanism.** *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, v.25, p.137-162, 1996.
- KAPOOR, P., KUMAR, A., NAIK, R., GANGULI, M., SIDDIQI, M. I., SAHASRABUDDHE, A. A., GUPTA, C. M. **Leishmania actin binds and nicks kDNA as well as inhibits decatenation activity of type II topoisomerase.** *Nucleic Acids Res*, v. 38, p. 3308–3317, 2010.
- KAWASHITA S. Y., DA SILVA C. V., MORTARA R. A., BURLEIGH B. A., BRIONES M. R. **Homology, paralogy and function of DGF-1, a highly dispersed Trypanosoma cruzi specific gene family and its implications for information entropy of its encoded proteins.** *Mol Biochem Parasitol.* v. 165(1), p. 19-31, 2009.
- KELLEY L. A., MEZULIS S., YATES C. M., WASS M. N., STERNBERG M. J. E. **The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis.** *Nature Protocols*, v. 10, p. 845-858, 2015. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2015.053>
- KOHL, L., & GULL, K. **Molecular architecture of the trypanosome cytoskeleton.** *Molecular and Biochemical Parasitology*, 93(1), 1–9, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(98\)00014-0](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(98)00014-0)
- KORN, E. D. **Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells.** *Physiological Reviews*, 62(2), 1982.
- LAEMMLI, U. K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature.* v. 227, p. 680-685, 1970.

LANDER N., BERNAL C., DIEZ N., ANEZ N., DOCAMPO R., RAMIREZ J. L. **Localization and Developmental Regulation of a Dispersed Gene Family 1 Protein in *Trypanosoma cruzi***. *Infection and Immunity*, v. 78, p.231, 2010.

LUKES, J.; HASHIMI H., ZÍKOVÁ A. **Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates**. *Current Genetics*. v. 48, p. 277–299, 2005.

MANI M., LEE U. H. YOON N. A., YOON E. H. LEE B. J. CHO W. J. PARK J. W. **A proteína 2 de ligação GTP regulada pelo desenvolvimento é necessária para a estabilização de túbulos de membrana Rac1-positivos**. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v. 493, p. 758-764, 2017.

MAZZAROTTO, G. A., RABONI, S. M., STELLA, V., CARSTENSEN, S., DE NORONHA, L., LEVIS, S., ZANLUCA, C., ZANETTI, C. R., BORDIGNON, J., DUARTE DOS SANTOS, C.N. **Production and characterization of monoclonal antibodies against the recombinant nucleoprotein of *Araucaria hantavirus***. *J Virol Methods*. v. 162, p. 96-100, 2009.

MBINFO CONTRIBUTORS. **Actin binding proteins influence actin dynamics**. Disponível em: <http://www.mechanobio.info/figure/figure/1384242015241.jpg.html>. Acessado em 15/07/2016.

MILLER L. H., AIKAWA M., JOHNSON J. G., SHIROISHI T. **Interaction between cytochalasin B-treated malarial parasites and erythrocytes. Attachment and junction formation**. *J. Exp. Med.*, v.149, p.172–184, 1979.

MORTARA, R. A. **Studies on trypanosomatid actin. I. Immunochemical and biochemical identification**. *The Journal of Protozoology*, 36(1), 8–13, 1989.

MULLER, J. **Sequence and Comparative Genomic Analysis of Actin-related Proteins**. *Molecular Biology of the Cell*, 16(12), 5736–5748, 2005. <https://doi.org/10.1091/mbc.E05-06-0508>

MURTA A. C., PERSECHINI P. M., PADRON T. S., DE SOUZA W., GUIMARAES J. A., SCHARFSTEIN J. **Structural and functional identification of GP57/51 antigen of *Trypanosoma cruzi* as a cysteine proteinase**. *Mol Biochem Parasitol*. v. 43, p. 27–38, 1990.

NGÔ, H. M., YANG, M., PAPROTKA, K., PYPAERT, M., HOPPE, H., & JOINER, K. A. **AP-1 in *Toxoplasma gondii* mediates biogenesis of the rhoptry secretory organelle from a post-Golgi compartment**. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(7), 5343–52, 2003. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208291200>

OTTERBEIN, L. R., GRACEFFA, P., & DOMINGUEZ, R. **The Crystal Structure of Uncomplexed Actin in the ADP State**. *Science*, 293(5530), 2001.

PACHECO-LUGO, L., DÍAZ-OLMOS, Y., SÁENZ-GARCÍA, J., PROBST, C. M., DAROCHA, W. D. **Effective gene delivery to *Trypanosoma cruzi* epimastigotes through nucleofection**. *Parasitology International*, 2017. <https://doi:10.1016/j.parint.2017.01.019>

PENG, D., KURUP, S. P., YAO, P. Y., MINNING, T. A., TARLETON, R. L. **CRISPR-Cas9-mediated single-gene and gene family disruption in *Trypanosoma cruzi***. *mBio*, v. 6, p. 2097-14, 2015. <https://doi.org/10.1128/mBio.02097-14>

PEREIRA, M. **A developmentally regulated neuraminidase activity in *Trypanosoma cruzi***. *Science*, 219(4591), 1983.

PERIZ J., WHITELAW J., HARDING C., GRAS S., MININA M. I. D. R., LATORRE-BARRAGAN F., LEMGRUBER L. REIMER M. A., INSALL R., HEASLIP A., MEISSNER M. **Toxoplasma gondii F-actin forms an extensive filamentous network required for material exchange and parasite maturation**. *eLife*. v. 6, e24119, 2017. <http://doi.org/10.7554/eLife.24119>

PERRIN B. J., ERVASTI J. M. **The actin gene family: function follows isoform**. *Cytoskeleton*, v. 67, p. 630-634, 2010.

PHILLIPS, H. J. **Dye exclusions tests for cell viability**. *Tissue Culture, methods and applications*. New York, p. 406-408, 1973.

PODLIPAEV, S. **The more insect trypanosomatids under study-the more diverse Trypanosomatidae appears**. *International Journal of Parasitology*, v. 31, p. 648–52, 2001.

POLLARD, T. D., BORISY, G. G. **Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments**. *Cell*. v. 113(4), p. 549, 2003.

PUSNIK M., SCHMIDT O., PERRY A. J., OELJEKLAUS S., NIEMANN M., WARSCHEID B., LITHGOW T., MEISINGER C., SCHNEIDER A. **Mitochondrial preprotein translocase of trypanosomatids has a bacterial origin**. *Curr. Biol*, v. 21, p.1738–1743, 2011.

QUEIROZ R. M. L., CHARNEAU S., BASTOS I. M. D., SANTANA J. M., SOUSA M. V., ROEPSTORFF P., RICART C. A. O. **Cell Surface Proteome Analysis of Human-Hosted *Trypanosoma cruzi* Life Stages**. *Journal of Proteome Research*. v. 13, p. 3530–3541, 2014.

ROBERTO, D. **Tropomyosin: The Gatekeeper's View of the Actin Filament Revealed**. *Biophys J*. v. 100(4), p. 797–798, 2011.

ROSA., J. O. **Proteínas actina em *Trypanosoma cruzi*: expressão, localização e possível função celular da actina 4**. 68 f. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal Do Paraná, Curitiba, 2015.

SAHASRABUDDHE, A. A., BAJPAI, V. K., GUPTA, C. M. **A novel form of actin in *Leishmania*: molecular characterisation, subcellular localisation and association with subpellicular microtubules**. *Mol Biochem Parasitol*. v. 134, p. 105-14, 2004.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCHAFER, D. A., SCHROER, T. A. **Actin-Related Proteins**. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 15(1), 341–363, 1999. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.15.1.341>

SCHELLHAUS A. K., MORENO-ANDRÉS D., CHUGH M., YOKOYAMA H. MOSCHOPOULOU A., DE SUMAN., BONO F., HIPPI K. SCHÄFFER E., ANTONIN W. **Developmentally Regulated GTP binding protein 1 (DRG1) controls microtubule dynamics**. Scientific Reports. 2017.

SEAMAN M.N., MCCAFFERY J.M., EMR S.D. **A membrane coat complex essential for endosome-to-Golgi retrograde transport in yeast**. J. Cell Biol, v. 142, p. 665–681, 1998.

SEHRING, I. M., MANSFELD, J., REINER, C., WAGNER, E., PLATTNER, H., KISSMEHL, R. **THE actin multigene family of Paramecium tetraurelia**. BMC Genomics, 8, 82, 2007. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-82>

SEHRING, I. M., REINER, C., MANSFELD, J., PLATTNER, H., KISSMEHL, R. **A broad spectrum of actin paralogs in Paramecium tetraurelia cells display differential localization and function**. Journal of Cell Science. v. 120, p. 177-90, 2007.

SHEN, X., MIZUGUCHI, G., HAMICHE, A., WU, C. **A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing The packaging of the eukaryotic genome in chromatin presents barriers that restrict the access of enzymes that process DNA**. NATURE, 406(3), 2000.

SIMPSON, A. G.; STEVENS, J. R.; LUKES, J. **The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates**. Trends in Parasitology, v. 22(4), p. 168–74, 2006.

SIMPSON, A. G.; STEVENS, J. R.; LUKES, J. **The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates**. Trends in Parasitology, v. 22, n. 4, p. 168–74, 2006.

SIMPSON, L.; APHASIZHEV R., GAO G., KANG X. **Mitochondrial proteins and complexes in *Leishmania* and *Trypanosoma* involved in U-insertion/deletion RNA editing**. RNA, v. 10, p. 159–170, 2004.

SINGH, K., VELURU, N. K., TRIVEDI, V., GUPTA, C. M., SAHASRABUDDHE, A. A. **An actin-like protein is involved in regulation of mitochondrial and flagellar functions as well as in intra macrophage survival of *Leishmania donovani***. Molecular Microbiology. v. 91(3), p. 562–578, 2014.

SOUZA, L. C. K., PINHO, R. E. G. G., LIMA, C. V. DE P., FRAGOSO, S. P., SOARES, M. J. **Actin expression in trypanosomatids (Euglenozoa: Kinetoplastea)**. Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz, 108(5), 631–6, 2013. <https://doi.org/10.1590/0074-0276108052013015>

STRAUB, F. B. **Actin**. Stud. Inst. Med. Chem. Univ. Szeged. II:3–15. 1942.

TEIXEIRA, S. M., PAIVA, R. M. C., KANGUSSU-MARCOLINO, M. M., DA-ROCHA, W. D. **Trypanosomatid comparative genomics: Contributions to the study of parasite biology and different parasitic diseases.** Genetics and Molecular Biology. v. 35, p. 1-17, 2012.

TERMAN J. R., KASHINA A. **Post-translational Modification and Regulation of Actin.** Current opinion in cell biology, v. 25, p. 30-38, 2013

TOALDO, C., STEINDEL, M., SOUSA, M., TAVARES, C. **Molecular karyotype and chromosomal localization of genes encoding B-tubulin, cysteine proteinase, hsp 70 and actin in Trypanosoma rangeli.** Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz, 96(1), 113–121, 2001. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762001000100013>

TOWBIN, H., STAHELIN, T., GORDON, J. **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.** Biotechnology. v. 24, p. 145-9, 1979.

TYLER, K. M., ENGMAN, D. M. **The life cycle of Trypanosoma cruzi revisited.** International Journal of Parasitology. v. 31, p. 472-81, 2001.

VAHOKOSKI J, BHARGAV SP, DESFOSES A, ANDREADAKI M, KUMPULA E-P, MARTINEZ S. M., IGNATEV A., LEPPER S., FRISCHKNECHT F., SIDÉN-KIAMOS I., SACHSE C., KURSULA I. **Structural Differences Explain Diverse Functions of Plasmodium Actins.** PLoS Pathog, v.10, e1004091, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004091>.

VANDEKERCKHOVE, J., WEBER, K. **AT least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide.** J Mol Biol. v. 126(4), p. 783-802, 1978.

WESSELING J. G., SMITS M. A., SCHOENMAKERS J. G. **Extremely diverged actin proteins in Plasmodium falciparum.** Mol. Biochem. Parasitol, v. 30, p. 143–153, 1988.

WETZEL D. M., HAKANSSON S., HU K., ROOS D., SIBLEY L. D. **Actin Filament Polymerization Regulates Gliding Motility by Apicomplexan Parasites.** Mol. Biol. Cell, v.14 (2), p. 396–406, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease (American trypanosomiasis).** Disponível em: <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>