

**INSTITUTO CARLOS CHAGAS/FIOCRUZ-PR**  
**Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia**

**DENISE ANDRÉA SILVA DE SOUZA**

**RECONSTRUÇÃO FILOGENÉTICA E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE  
GENES DA FAMÍLIA DAS MIOSINAS EM *Trypanosoma cruzi***

**CURITIBA - PARANÁ**

**2018**

**INSTITUTO CARLOS CHAGAS/FIOCRUZ-PR**

**Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia**

**DENISE ANDRÉA SILVA DE SOUZA**

**RECONSTRUÇÃO FILOGENÉTICA E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE  
GENES DA FAMÍLIA DAS MIOSINAS EM *Trypanosoma cruzi***

**Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Biociências e Biotecnologia do Instituto Carlos  
Chagas/Fiocruz-PR, como parte dos requisitos para  
obtenção do título de doutora em Biociências e  
Biotecnologia.**

**Orientador: Dr. Marco Aurélio Krieger**

**Co-orientador: Dr. Christian Macgnan Probst**

**CURITIBA - PARANÁ**

**2018**

Souza, Denise Andréa Silva de.

Reconstrução filogenética e caracterização funcional de genes da família das miosinas em *Trypanosoma cruzi* / Denise Andréa Silva de Souza. - Curitiba, 2018.  
105 f.

(Doutorado) - Instituto Carlos Chagas, Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, 2018.

Orientador: Marco Aurélio Krieger.  
Co-orientador: Christian Macgnan Probst.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Miosinas. 3. Reconstrução filogenética. 4. Genômica funcional. 5. Doença de Chagas. I. Título.

**Aos meus queridos pais, que sempre acreditaram em mim e foram meus maiores motivadores. Ao meu irmão, cuja aprovação é o meu melhor selo de qualidade. E ao meu querido marido-companheiro que aguentou firme a tormenta e veio com o bote salva-vidas. Amo vocês.**

## AGRADECIMENTOS

“Amigo é coisa para se guardar debaixo de sete chaves, dentro do coração”, já dizia o poeta. Comigo, não poderia ser diferente, afinal, sem eles, os companheiros da lida diária, não teria ido chegando até aqui com algum equilíbrio emocional. Foram eles que me deram o riso, o incentivo e o empurrão para frente. Citarei apenas os amigos mais próximos, mas muitos contribuíram nesta jornada: agradeço do fundo do meu coração à imensa ajuda, amizade e exemplo da Adriana Ludwig; agradeço ao riso fácil e as gargalhadas nervosas (que foram muitas) com a minha melhor companheira, Juliana Amorim, sem ela, estaria maluquinha agora, além da querida amiga Karla (baiana) que dividia comigo a bancada, discussões científicas e, o mais importante, a amizade. Agradeço àquelas que me ajudaram em alguns experimentos, Cyndia Mara e Aline Lucena, e àquelas que muito me ensinaram: Luz Helena, Yasmin Ribeiro, Rosiane Valeriano e Lígia Kalb. Agradeço à Fer Cleto, cuja amizade e doçura percebiam quando eu estava precisando de um abraço e incentivo, e cujo competente trabalho facilitava a nossa vida no laboratório.

Agradeço àquele que me abriu as portas do instituto, Christian Probst, que me aceitou em uma hora de conversa.

Agradeço ao Marco Krieger, que me aceitou também, em um momento de desespero, me dando o suporte que eu precisava.

Agradeço à pós-graduação, particularmente, Juliano Bordignon, Alejandro Dominguez, Sheila, Raquel e membros do Colegiado, que me estenderam ambas as mãos durante estes cinco anos de luta. Também, sem a infinita paciência e compreensão de vocês, este trabalho não teria saído.

Agradeço aos pesquisadores que me ajudaram nos aspectos técnicos e também cederam um “golinho” de seus reagentes: Maurílio Soares, Stênio Fragoso e Daniela Pavoni.

Agradeço à equipe técnica, sempre disposta à passar aquela amostra fora de hora (Beatriz, Paulo e Priscila Hiraiwa) e facilitando a nossa vida preparando os nossos reagentes (às Vanessas, Junior, Nilson, Sibelle, Silvio e Vânia).

Agradeço às plataformas PDTIS que nos possibilitam desenvolver um trabalho de alta tecnologia.

Agradeço a Capes, CNPq e Fiotec pelo suporte financeiro durante este período.

Agradeço aos meus pais, Manoel e Nilcéa, que sempre acreditaram em mim, comemoraram todas as vitórias e não me deixaram desistir nas derrotas. Meu trabalho é fruto dessa árvore de comprometimento e amor por aquilo que nos dedicamos a fazer que vocês plantaram em mim.

Agradeço ao meu irmão, Manoel Roberto, que tão prontamente e inteligentemente contribui para um pensamento crítico e científico em todos os aspectos da nossa vida. Obrigada por ser esse exemplo.

Agradeço ao meu companheiro, Jean, que viu o amor e o horror durante estes cinco anos, e mesmo assim, continua comigo. Obrigada por trazer leveza para a minha vida e compreender os sacrifícios durante a jornada.

E, por fim, agradeço à vida, que me trouxe muitos desafios, mas que me abençoou com pessoas maravilhosas para seguir comigo este caminho.

OBRIGADA.

**“Nothing in biology makes sense except in the light of evolution”.**

Theodosius Dobzhansky 'Nothing in Biology makes Sense except in the Light of Evolution', artigo publicado em The American Biology Teacher (Mar 1973).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO CARLOS CHAGAS

### Reconstrução filogenética e caracterização funcional de genes da família das miosinas em *Trypanosoma cruzi*

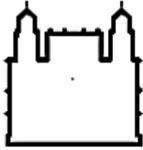
Tese de doutorado

Denise Andréa Silva de Souza

#### RESUMO

O *Trypanosoma cruzi* (Classe Kinetoplastea) é o agente etiológico da doença de Chagas, uma doença endêmica de populações rurais que possui uma história de negligência à sua prevenção, diagnóstico e tratamento. A partir do sequenciamento de seu genoma, em 2005, a maioria dos cerca de nove mil genes codificadores de proteínas foi classificada como de função desconhecida/putativa. Dentre estes nove mil genes, há a família das miosinas que, embora sejam conhecidas, tem um alto nível de divergência quando comparada com as miosinas dos demais eucariotos, apresentando domínios até então não associados a esta família. Miosinas são proteínas motoras dependentes de actina, com uma variedade de funções e têm sido usadas para reconstruir a árvore da vida eucariótica, sendo que a inclusão de ramos basais (de origem precoce), como os Kinetoplastea, é fundamental para entender a origem e evolução dos genes dessa família. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo fazer a reconstrução filogenética da família das miosinas em Kinetoplastea, além de realizar a caracterização funcional de genes de miosinas de *T. cruzi* por meio de nocaute gênico, avaliação do crescimento e diferenciação, infecção de células Vero, análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão e varredura, isolamento de microvesículas (exocitose) e ensaios de endocitose. Os nocautes obtidos para TcMyoA e TcMyoD apresentaram diminuição da metacicloênese, posição/morfologia dos reservossomos alterada, além de diminuição do conteúdo de transferrina endocitada. A reconstrução filogenética das miosinas em Kinetoplastea revelou ainda que *T. cruzi* manteve grande parte das miosinas ancestrais, assim como *Bodo saltans* e alguns tripanossomatídeos. Apesar disto, grande parte da variedade de miosinas encontrada neste grupo foi perdida pela maioria dos tripanossomatídeos, embora interessantes eventos de neofuncionalização tenham ocorrido no decorrer da evolução dessas espécies. Assim, nós apresentamos aqui uma bela história evolutiva da família das miosinas em tripanossomatídeos e a caracterização funcional de alguns desses genes mostrou sua importância em processos celulares como endocitose e metacicloênese.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, miosinas, reconstrução filogenética, caracterização funcional, reservossomos, endocitose, metacicloênese.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO CARLOS CHAGAS

### Phylogenetic analysis and functional characterization of myosin gene family in *Trypanosoma cruzi*

Doctoral thesis

Denise Andréa Silva de Souza

#### ABSTRACT

*Trypanosoma cruzi* (Class Kinetoplastida) is the etiologic agent of Chagas' disease, an endemic disease of rural populations that have a history of negligence in its prevention, diagnosis, and treatment. With the sequencing of the parasite genome in 2005, most of the approximately 9,000 protein-encoding genes were classified as of unknown/putative function. However, the myosin family could be fully annotated despite their high level of divergence from other eukaryotes. Myosins are actin-dependent motor proteins with a variety of functions and have been used to reconstruct the tree of eukaryotic life. The inclusion of basal branches (of early origin), such as Kinetoplastida, is fundamental to understand the origin and evolution of myosin genes. Therefore, we aimed to reconstruct the phylogeny of the myosin family in Kinetoplastida. Also, we performed the functional characterization of some of the *T. cruzi* myosin genes by gene knockout, by analyzing the growth and differentiation, the infection of Vero cells, analyzed the morphology by transmission and scanning electron microscopy, and performed exocytosis (microvesicle isolation) and endocytosis assays. The knockouts obtained for TcMyoA and TcMyoD presented a decrease in metacyclogenesis and endocytosis, and an alteration in position/morphology of the reservosomes. The phylogenetic reconstruction of the myosin family found in Kinetoplastida revealed that *T. cruzi* retained a great part of the ancestral myosins, as well as *Bodo saltans* and some trypanosomatids. Despite this, a great number of these genes was lost by most trypanosomatids, although interesting events of neofunctionalization had occurred during the evolution of these species. Thus, we present here an amazing evolutionary history of the myosin family in trypanosomatids and the functional characterization of some of these genes showed its importance in cellular processes such as endocytosis and metacyclogenesis.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, myosin, phylogenetic analysis, functional characterization, reservosomes, endocytosis, metacyclogenesis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1-1 Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	11
Figura 1.1-2 Distribuição mundial dos casos de doença de Chagas.....	12
Figura 1.1-3 Distribuição geográfica das seis DTUs de <i>T. cruzi</i> com relação aos ciclos silvático e doméstico .....	13
Figura 1.3-1 Componentes moleculares envolvidos no controle da expressão gênica em cinetoplastídeos .....	17
Figura 1.4-1 Componentes celulares da forma epimastigota de <i>T. cruzi</i> .....	19
Figura 1.5-1 Representação da via endocítica em epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	28
Figura 1.6-1 Representação da estrutura de miosinas convencionais e não-convencionais.....	30
Figura 1.6.2-1 História evolutiva das principais inovações em genes de miosinas de unikontes e bikontes.....	34
Figura 1.7-1 Três passos da análise de <i>bootstrapping</i> .....	38
Figura 5.1-1 Esquema para construção de cassetes de nocaute baseado em PCR de fusão e para confirmação dos nocautes.....	75
Figura 5.1-2 Resultado da PCR de confirmação dos nocautes SKO_MyoD e DKO_MyoA ..	76
Figura 5.2-1 Crescimento e diferenciação de parasitos-nocaute de miosinas de <i>T. cruzi</i> .....	80
Figura 5.3-1 Infecção de células Vero por parasitos-nocaute de miosinas .....	81
Figura 5.4-1 Análise de vesículas extracelulares (VEs) isoladas de epimastigotas selvagem e nocautes de miosinas .....	82
Figura 5.5-1 Aspectos morfológicos do semi-nocaute de TcMyo1 (SKO_Myo1) comparado ao parasito selvagem (WT).....	83
Figura 5.5-2 Aspectos morfológicos do semi-nocaute de TcMyo13 (SKO_Myo13) comparado ao parasito selvagem (WT).....	84
Figura 5.5-3 Aspectos morfológicos do semi-nocaute de TcMyoE (SKO_MyoE) comparado ao parasito selvagem (WT).....	85
Figura 5.5-4 Aspectos morfológicos do nocaute total de TcMyoA (DKO_MyoA) comparado ao parasito selvagem (WT).....	86
Figura 5.6-1 Efeito da deleção do gene TcMyoA (DKO_MyoA) na endocitose de transferrina por formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	87

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 5.1-1 Número de acesso das miosinas de acordo com a base de dados TritrypDB e lista de iniciadores para construção dos cassetes de nocaute, confirmação dos cassetes de nocaute por PCR convencional e RT-PCR e clonagem gênica com etiquetas FLAG.....	77
--	----

## SUMÁRIO

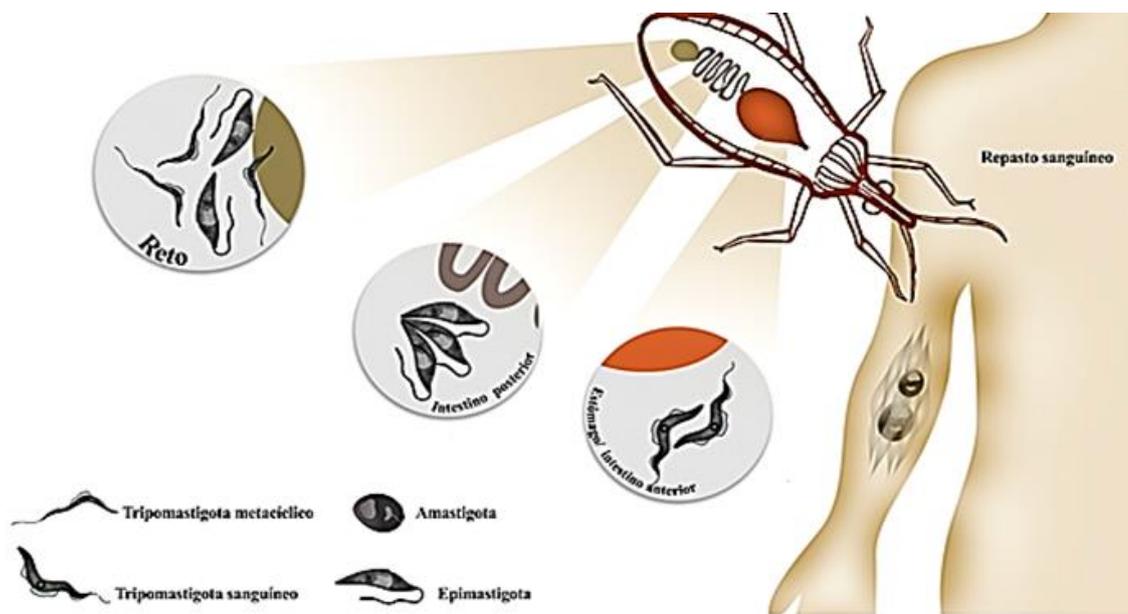
1	INTRODUÇÃO.....	10
1.1	<i>Trypanosoma cruzi</i> e ciclo de vida .....	10
1.2	Classificação e filogenia de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	14
1.3	Características moleculares de tripanossomatídeos .....	15
1.4	Morfologia geral de <i>T. cruzi</i> .....	18
1.4.1	Reservossomos .....	21
1.4.2	Superfície celular: membrana plasmática e suas especializações .....	23
1.4.3	Citoesqueleto .....	24
1.5	Transporte intracelular .....	27
1.6	Miosinas.....	29
1.6.1	Função das miosinas em protozoários .....	30
1.6.2	Classificação das miosinas e a evolução da vida eucariótica .....	33
1.7	Métodos de filogenética.....	35
2	OBJETIVOS.....	39
2.1	Geral.....	39
2.2	Específicos .....	39
3	CAPÍTULO 1 – EVOLUÇÃO DA FAMÍLIA DAS MIOSINAS EM <i>T. cruzi</i> .....	40
4	CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA MIOSINA TcMyoD EM <i>T. cruzi</i> .....	50
5	RESULTADOS PRELIMINARES DA CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DAS DEMAIS MIOSINAS DE <i>T. cruzi</i> .....	74
5.1	Comprovação dos nocautes de miosinas de <i>T. cruzi</i> .....	74
5.2	Crescimento e diferenciação de parasitos-nocaute de miosinas de <i>T. cruzi</i> .....	80
5.3	Infecção de células Vero por parasitos-nocaute de miosinas de <i>T. cruzi</i> .....	81
5.4	Análise da atividade exocítica de parasitos-nocaute de miosinas de <i>T. cruzi</i> .....	82
5.5	Análise da morfologia de parasitos-nocaute de miosinas de <i>T. cruzi</i> .....	83
5.6	Análise da atividade endocítica do nocaute total de TcMyoA (DKO_MyoA).....	87
6	DISCUSSÃO.....	88
7	CONCLUSÃO.....	95
8	REFERÊNCIAS USADAS NA INTRODUÇÃO E DISCUSSÃO .....	96
9	ANEXO: DEMAIS PUBLICAÇÕES DURANTE O DOUTORADO .....	104

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 *Trypanosoma cruzi* e ciclo de vida

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário uniflagelar pertencente à família Tripanosomatidae da classe Kinetoplastea (ou Kinetoplastida). Em 1909, o médico sanitarista Carlos Chagas, ao examinar uma criança com sinais de uma doença até então desconhecida, descobriu não apenas o agente causador (o qual nomeou como *Trypanosoma cruzi* em homenagem ao seu mentor Oswaldo Cruz), mas também seu vetor (triatomíneos da família Reduviidae) e mamíferos contaminados que serviam como reservatórios, além de descrever os sinais clínicos da doença a qual chamou de tripanossomíase americana (ou doença de Chagas) (CHAGAS, 1909).

O *T. cruzi* apresenta um ciclo de vida complexo, alternando entre os dois hospedeiros (invertebrado e mamífero) e entre quatro formas evolutivas, duas das quais encontradas no inseto vetor: formas epimastigota (replicativa) e tripomastigota metacíclica (infectiva); e duas no hospedeiro mamífero: formas amastigota (intracelular, replicativa) e tripomastigota sanguínea (infectiva) (Figura 1.1-1). Durante o repasto sanguíneo, insetos triatomíneos ingerem sangue de mamíferos contaminados com formas tripomastigotas sanguíneas (e algumas formas amastigotas) que seguem pelo tubo digestivo até atingir o intestino médio, quando transformam-se em epimastigotas (replicativos); o flagelo das formas epimastigotas começa a alongar-se progressivamente e, ao atingirem a porção final do intestino, aderem por meio do flagelo à cutícula intestinal e começam a se diferenciar em tripomastigotas metacíclicos (infectivos), em um processo chamado metaciclogênese. Durante um novo repasto sanguíneo, o triatomínio infectado defeca formas tripomastigotas metacíclicas, capazes de invadir as células do hospedeiro mamífero ao entrar pela picada do inseto ou mucosas. A partir da invasão de células mamíferas, diferenciam-se em amastigotas que replicam-se continuamente até atingirem uma densidade na qual diferenciam-se nas formas flageladas tripomastigotas sanguíneas, que rompem a célula e são liberados na corrente sanguínea e linfa podendo infectar novos sítios e reiniciar o ciclo ao serem ingeridos por triatomínios durante o repasto sanguíneo (DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010; TYLER; ENGMAN, 2001).



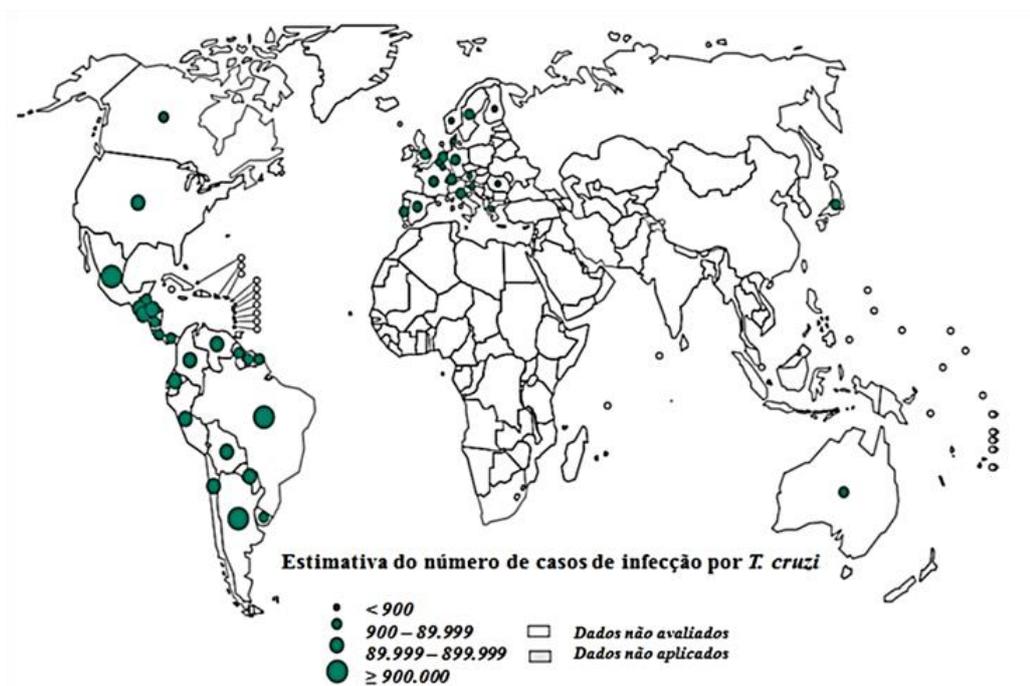
**Figura 1.1-1 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi***

FONTE: adaptado de AMORIM et al., 2017.

NOTA: o inseto vetor ingere sangue do hospedeiro mamífero contaminado com formas tripomastigotas sanguíneas. Ao atingir o intestino anterior do inseto, os parasitos transformam-se em epimastigotas com capacidade replicativa. Ao atingirem a região posterior do intestino, os epimastigotas aderem-se à parede intestinal e começam a metaciclogênese, liberando formas infectivas tripomastigotas metacíclicas que são evacuadas pelo inseto ao fazer o repasto sanguíneo. As formas metacíclicas infectam ativamente as células ao entrar pela ferida da picada ou pelas mucosas do mamífero. Ao invadir as células do mamífero, os tripomastigotas metacíclicos transformam-se em amastigotas que replicam-se no interior da célula até transformarem-se em tripomastigotas sanguíneos, que rompem as células e ficam livres para infectar novos sítios e serem ingeridos pelo inseto vetor durante o repasto sanguíneo, reiniciando o ciclo.

O modo clássico de transmissão do *T. cruzi* é por meio da transmissão vetorial em áreas endêmicas (que se estendem do sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina e do Chile (SOSA-ESTANI; SEGURA, 2015). Contudo, o número de casos decorrentes de transmissão vetorial foi reduzido drasticamente devido às iniciativas de âmbito continental realizadas na América Latina a partir da década de 90, conforme realizado no Cone Sul (Uruguai, Chile e Brasil), onde a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) certificou a interrupção da transmissão da doença de Chagas por *Triatoma infestans* (principal vetor na região), embora essa certificação seja controversa (STANAWAY; ROTH, 2015). Além disso, essas iniciativas promovidas pela OPAS, Organização Mundial da Saúde (OMS) e instituições nacionais, ao melhorar as condições habitacionais, promover a desinsetização, educar as populações e melhorar a triagem das doações de sangue, conseguiram diminuir significativamente, entre 1990 e 2006, o número de mortes anuais atribuídas à doença de Chagas (45.000 a 12.500), o

número de novos casos anuais (700.000 a 41.200) e da população em risco (100 milhões para 28 milhões) (revisado por STANAWAY; ROTH, 2015) (Figura 1.1-2).



**Figura 1.1-2 Distribuição mundial dos casos de doença de Chagas**

Fonte: adaptado de WHO, 2015.

Nota: estimativa dos casos de infecção por *T. cruzi* ao redor do mundo, cuja maior incidência ocorre em países da América Latina seguida de países da Europa e Oceania.

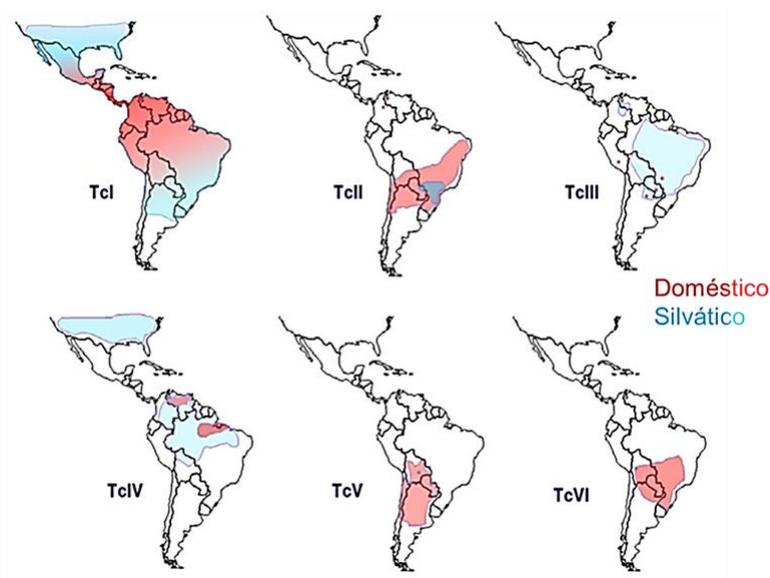
Devido ao controle sanitário do vetor em áreas intra e peridomiciliares, atualmente o modo de transmissão mais importante no Brasil é por via oral, como ocorrido nos surtos de 2000 a 2010 na região amazônica. Neste período, mais de mil casos foram reportados em 138 surtos, sendo que 71% dos casos foram atribuídos à ingestão de bebidas (como suco de cana de açúcar e água) e comidas (como as frutas açaí e bacaba) contaminadas com o vetor ou suas fezes (SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012).

A doença de Chagas é difícil de ser diagnosticada clinicamente em sua fase inicial, já que menos de 1% das pessoas contaminadas apresentam a forma aguda severa (caracterizada por miocardite aguda, efusão pericárdica e/ou meningoencefalite) (NUNES et al., 2013). Infelizmente, é na fase aguda que os únicos medicamentos para tratamento da doença de Chagas, Benzonidazol e Nifurtimox, são mais eficazes (BERMUDEZ et al., 2016). A maioria dos pacientes evolui para a fase indeterminada da doença (sorologia positiva, porém assintomáticos), onde podem permanecer por décadas sem manifestação clínica, seguida da fase crônica que também pode ser assintomática. Cerca de um terço dos pacientes evoluem

para a fase crônica sintomática apresentando a forma cardíaca (cardiomiopatia chagásica), digestiva (megaesôfago e/ou megacólon) ou cardio-digestiva (NUNES et al., 2013).

Apesar da descoberta da doença ter se dado em 1909, estudos de paleoparasitologia mostraram a presença de DNA do parasito e sinais clínicos da doença em múmias de nove mil anos encontradas na América Latina (revisado por ARAÚJO et al., 2009). Estes dados revelam que a interação parasito-hospedeiro humano ocorreu muito antes do que se pensava (a partir da domesticação de animais e plantas e abandono do nomadismo há 6.000-8.000 anos pela população andina). As análises moleculares da contaminação por *T. cruzi* realizada em múmias também têm ajudado a entender a evolução dos diferentes subgrupos de *T. cruzi* que são associadas atualmente a diferentes ciclos de transmissão (silvático versus doméstico), dispersão geográfica e patogênese (ARAÚJO et al., 2009; ZINGALES et al., 2012).

A variabilidade genética de *T. cruzi*, que leva a sua subdivisão em seis DTUs (*Discrete Typing Units*, TcI-TcVI), tem repercussões importantes tanto no estudo da doença de Chagas (por exemplo, a contaminação por TcIII é rara em humanos e a contaminação por TcI é associada exclusivamente à cardiomiopatia) (ZINGALES et al., 2012) quanto no estudo do próprio parasito, já que as diferentes linhagens apresentam variações genéticas consideráveis e possuem nichos diferentes correspondendo aos ciclos silvático ou doméstico (Figura 1.1-3).



**Figura 1.1-3 Distribuição geográfica das seis DTUs de *T. cruzi* com relação aos ciclos silvático e doméstico**

Fonte: adaptado de ZINGALES et al., 2012.

Nota: áreas onde há predominância do ciclo doméstico estão representadas em vermelho; em azul, áreas onde há predominância do ciclo silvático. As seis DTUs descritas para *T. cruzi* são representadas.

## 1.2 Classificação e filogenia de *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* pertence à classe Kinetoplastea, a qual é composta por um grupo de protozoários caracterizados, dentre outras peculiaridades, pela presença de um DNA mitocondrial chamado cinetoplasto, exclusivo desta classe (SIMPSON; STEVENS; LUKES, 2006). A classe Kinetoplastea é dividida em cinco ordens: Eubodonida, Parabodonida, Neobodonida, Prokinetoplastida e Trypanosomatida. Todos os membros conhecidos de Trypanosomatida e Prokinetoplastida são parasitas; as demais ordens compreendem protozoários de vida livre com poucos membros parasitários (YAZAKI et al., 2017).

A família Trypanosomatidae, a qual o *T. cruzi* pertence, é a única família da ordem Trypanosomatida (caracterizada por parasitas com um único flagelo). Essa família é composta por catorze gêneros monoxênicos (*Angomonas*, *Blastocrithidia*, *Bleptomonas*, *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Kentomonas*, *Leptomonas*, *Lotmaria*, *Novymonas*, *Paratrypanosoma*, *Sergeia*, *Strigomonas*, *Wallaceina* e *Zelonina*) e cinco gêneros heteroxênicos (*Endotrypanum*, *Leishmania*, *Phytomonas*, *Porcisia* e *Trypanosoma*) (KAUFER et al., 2017).

Relações filogenéticas entre grupos de organismos não são fáceis de serem estabelecidas. Estudos acerca da evolução dos tripanossomatídeos, usando um número restrito de marcadores, embora amplamente utilizados como o DNA ribossomal 18S ou o gene codificador da proteína gGAPDH (gliceraldeído fosfato-desidrogenase glicossomal), levam à conclusões divergentes acerca da monofilia dos tripanossomatídeos (HAMILTON; STEVENS, em TELLERIA; TIBAYRENC, 2010). Um grupo monofilético é uma coleção de organismos que formam um único clado composto pelo ancestral e todos os seus descendentes. A monofilia de tripanossomatídeos indicaria que todos os *taxa* descritos tem uma origem comum e não originam nenhum outro grupo de organismos (HAMILTON; STEVENS, em TELLERIA; TIBAYRENC, 2010).

Análises filogenéticas podem ajudar a determinar a origem dos tripanossomatídeos como, por exemplo, se evoluíram a partir de um parasita monoxênico que a princípio infectava invertebrados (teoria *invertebrate-first*) ou vertebrados (*vertebrate-first*), já que os parasitas atuais apresentam ciclos monoxênicos e heteroxênicos (STEVENS et al., 2001). Além disso, dentro do gênero *Trypanosoma*, estudos iniciais consideravam *T. brucei* e *T. cruzi* como grupos parafiléticos, apontando para uma evolução ao parasitismo independente nos dois grupos (STEVENS et al., 2001). Dados mais recentes apontam para a monofilia do grupo, embora ainda suportem a ideia de que o parasitismo e o ciclo heteroxênico evoluíram independentemente em diversas linhagens de tripanossomatídeos (STEVENS et al., 2001). De

fato, filogenias mais recentes apontam para uma evolução independente para o ciclo heteroxênico pelo menos em três gêneros de tripanossomatídeos: *Trypanosoma*, *Leishmania* e *Phytomonas* (LUKES et al. 2014). Variações intraespecíficas, como ocorre nas distinções entre DTUs de *T. cruzi*, também são importantes para avaliar a evolução da espécie e suas adaptações a ambientes específicos (ZINGALES et al., 2012). Atualmente, após o sequenciamento do genoma do cinetoplastídeo de vida livre *Bodo saltans*, o aspecto mais intrigante que os evolucionistas têm se dedicado a entender são as origens do parasitismo nesta classe, já que análises de genômica comparativa, ao avaliar a perda/ganho de genes, podem dar indícios dos aspectos moleculares básicos para o desenvolvimento do parasitismo (JACKSON et al., 2016; YAZAKI et al., 2017).

### 1.3 Características moleculares de tripanossomatídeos

A partir da publicação simultânea dos genomas dos principais gêneros de tripanossomatídeos causadores de doenças humanas, *T. brucei* (linhagem 927), *L. major* (linhagem Friedlin) e *T. cruzi* (linhagem CL Brener), em 2005, importantes avanços foram feitos com relação à biologia destes parasitos, permitindo a comparação entre seus conteúdos gênicos e arquitetura de seus genomas e um melhor entendimento da evolução desta família (EL-SAYED et al., 2005a, 2005b; BERRIMAN et al., 2005; IVENS et al., 2005). Os genomas dessas três espécies tem alto nível de conservação de sintenia e compartilham mais de seis mil genes, possíveis alvos para o entendimento do parasitismo. Além das características em comum, essas espécies apresentam especializações como em suas proteínas de superfície: em *T. brucei* as VSGs (*variant surface glycoproteins*), transialidades e mucinas e proteínas associadas em *T. cruzi* e lipofosfoglicanos e gp63 em *Leishmania* (CHOI; EL-SAYED, 2012).

O genoma de tripanossomatídeos é organizado em grandes grupos de genes policistrônicos (PCGs, *polycistronic gene clusters*), ou seja, dezenas à centenas de genes codificadores de proteínas dispostos sequencialmente na mesma fita de DNA (MARTÍNEZ-CALVILLO et al., 2010). Essas PCGs normalmente codificam genes sem funções relacionadas, ao contrário do que ocorre em bactérias cuja transcrição policistrônica de genes correlatos é regulada por meio de operons. Em tripanossomatídeos, as PCGs não dispõem de promotores, apesar de serem transcritas por RNA polimerase II (RNA pol II). Desta forma, não há regulação da expressão gênica a nível transcricional, de forma que longos policistrons de mRNA são transcritos constitutivamente. Na ausência de promotores, a transcrição inicia-

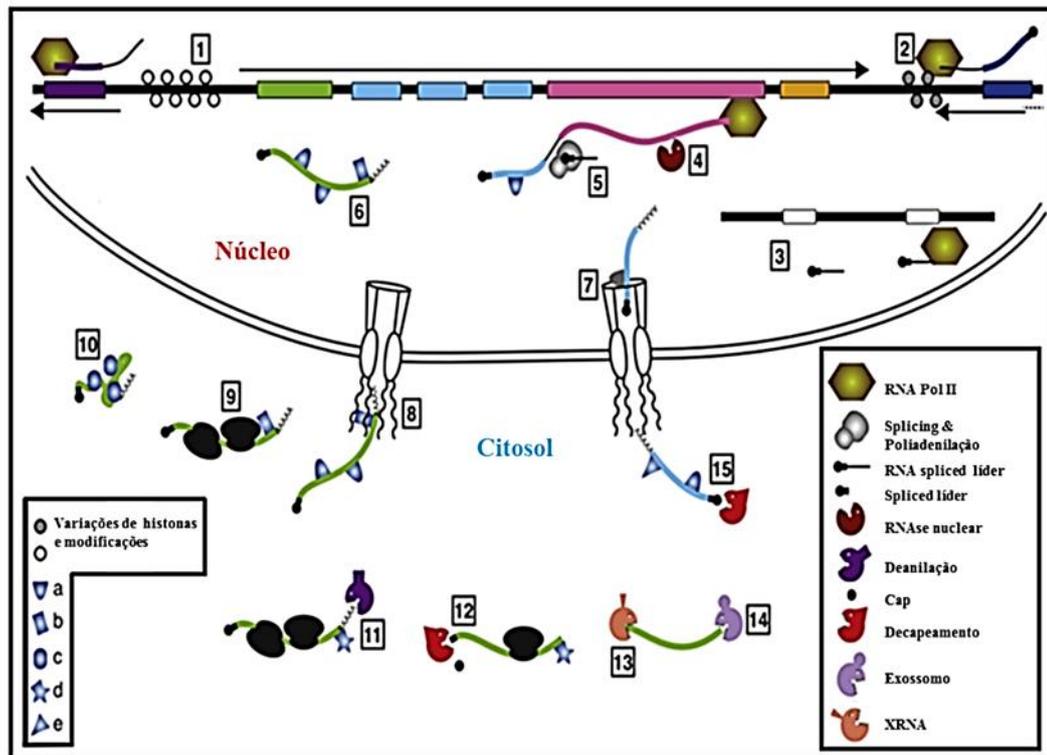
se em regiões de troca de fita entre PCGs e em regiões onde há certas modificações de histonas (CLAYTON, 2016).

O longo policístron de RNA precisa ser processado, então, em mRNAs individuais, por meio de *trans-splicing* na extremidade 5' e poliadenilação da extremidade 3'. Dessa forma, a regulação da expressão gênica nesses protozoários é quase exclusivamente pós-transcricional (CLAYTON; SHAPIRA, 2007). Durante o *trans-splicing*, um RNA de 39 nucleotídeos (nt), chamado mini-éxon ou SL-RNA (*spliced-leader* RNA) contendo um *cap* trimetil é adicionado à extremidade 5' do mRNA-alvo. O sítio acceptor de *splicing* é um dinucleotídeo AG, imediatamente após uma sequência de polipirimidinas. Os sítios de poliadenilação estão localizados de 100 a 300 nt antes do sinal de *trans-splicing*, sendo que a poliadenilação é dependente do *splicing* na região posterior, ou seja no mRNA do gene posterior (CLAYTON; SHAPIRA, 2007). Os mRNAs maduros podem associar-se com proteínas ligadoras de RNA (RBPs; *RNA binding proteins*) formando uma ribonucleoproteína mensageira (mRNP) antes de ser exportada para o citosol pelos poros nucleares (CLAYTON, 2016). O controle da expressão gênica em cinetoplastídeos está representado na figura 1.3-1.

No núcleo, alguns eventos podem controlar a expressão gênica através do número de cópias gênicas, controle global do início da transcrição ao desacelerar o crescimento celular, comprimento da unidade de transcrição, comprimento do mRNA, taxa de alongamento da transcrição, transcrição pela RNA polimerase I, controle global do *splicing*, variações no processamento de genes específicos, degradação do precursor, exportação do mRNA e o feedback para o núcleo. No citosol, o mRNA associa-se com fatores de início da tradução que recrutam os ribossomos. A tradução remove as RBPs associadas ao mRNA, embora algumas, especialmente na região 3'-UTR (*untranslated region*), possam permanecer associadas ou ser substituídas por proteínas competidoras. A degradação do mRNA começa pela sua deadenilação seguida de decapeamento e digestão (Figura 1.3-1 eventos 11-14). Alguns cinetoplastídeos, como *Trypanosoma brucei* e *T. congolense*, possuem a maquinaria de RNA de interferência (RNAi), mas em *T. cruzi*, tentativas de silenciamento de genes como amastina,  $\beta$ -tubulina e GP72 por RNAi não tiveram sucesso (DAROCHA et al., 2004).

As sequências 3'-UTR (e mais raramente as 5'-UTR) afetam o decaimento de mRNA e/ou a tradução, havendo o envolvimento de RBPs neste processo. Para a regulação normal, centenas de nucleotídeos são necessários na região 3'-UTR, sendo que diferentes RBPs, variando em especificidade e modos de ação, podem competir ou cooperar pela ligação ao mRNA, aumentando ou diminuindo a expressão do gene ao promover ou inibir a tradução do

mRNA. Os mecanismos citosólicos para regulação da expressão gênica são o controle universal ou de sequências específicas para o início da tradução, ligação ao cap pela eIF4E, taxa de alongamento da tradução, formação de grânulos, deadenilação, envolvimento de exossomos, decapeamento e degradação pela XRNA, além de complexas interações entre diferentes etapas do controle da expressão gênica (CLAYTON, 2016).



**Figura 1.3-1 Componentes moleculares envolvidos no controle da expressão gênica em cinetoplastídeos**

Fonte: adaptado de CLAYTON, 2016.

Nota. 1) Início da transcrição pela RNA pol II em regiões de histonas variantes ou modificadas. 2) Terminação da transcrição por sinais epigenéticos e presença de genes transcritos por outras polimerases. 3) RNA pol II também inicia e termina nas centenas de genes idênticos dos SL-RNA de cerca de 140 nt, requerendo fatores de transcrição específicos. 4) mRNA precursor pode ser degradado por RNases nucleares. 5) *Trans-splicing* e poliadenilação dos mRNAs ocorrem simultaneamente. 6) mRNAs maduros associam-se à RBPs formando uma ribonucleoproteína mensageira (mRNP). 7) Exportação da mRNP para o citosol através do poro nuclear. 8) mRNPs emergem no citosol. 9) mRNPs associam-se a fatores do início da transcrição e recrutam ribossomos. 10) Os mRNAs podem ser armazenados formando agregados ou grânulos com uma variedade de proteínas associadas. 11) A degradação do RNA começa com a degradação da cauda poliA. 12) Após a deadenilação, o mRNA é decapeado e 13) Digerido pela XRNA no sentido 5'-3' e 14) Pelo complexo exossomal a partir da extremidade 3'. 15) Uma parte dos mRNAs é degradada logo após a sua síntese, sem a deadenilação inicial, sendo decapeadas e digeridas a partir da extremidade 5', impedindo desta forma que o mRNA seja traduzido.

#### 1.4 Morfologia geral de *T. cruzi*

As formas epimastigotas de *T. cruzi* apresentam características morfológicas únicas, que estão representadas na Figura 1.4-1 bem como outras organelas comuns em eucariotos. Dentre as peculiaridades da classe Kinetoplastea, está o DNA mitocondrial que se encontra próximo à base do flagelo e possui forma de bastão nas formas epimastigota e amastigota, e arredondada nas formas tripomastigotas, sendo denominado cinetoplasto e composto por uma grande rede de DNAs circulares catenados chamados kDNA (LUKES et al., 2002).

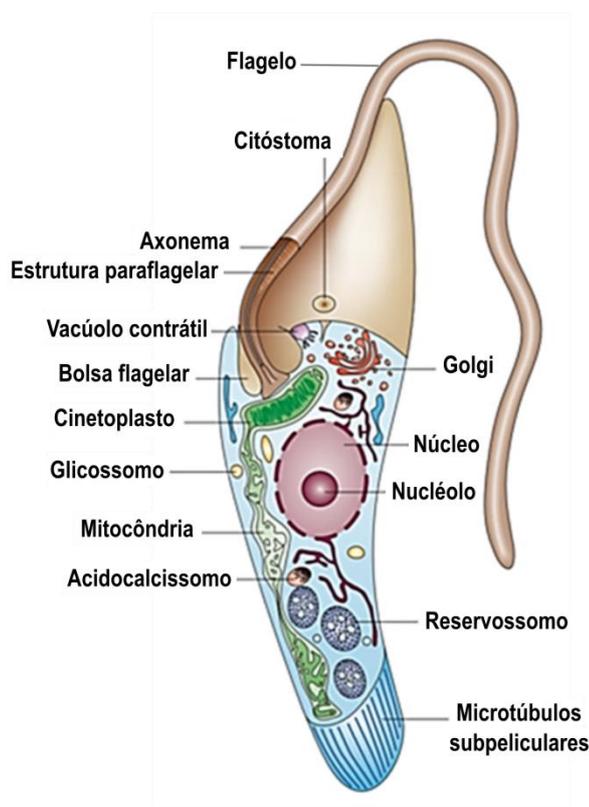
As moléculas de kDNA são de dois tipos: maxicírculos e minicírculos. Os maxicírculos têm de 20-40 kb, pois variam conforme a espécie, e estão presentes em algumas dezenas de cópias idênticas. Codificam genes mitocondriais como rRNAs e subunidades de complexos da cadeia respiratória; contudo, alguns genes codificadores de proteínas são encriptados, sendo que para gerar mRNAs funcionais, o transcrito do maxicírculo deve passar por uma modificação pós-transcricional realizada por RNAs-guia (gRNAs) que são em sua maioria codificados pelo DNA dos minicírculos. Os minicírculos estão presentes em milhares de cópias, são praticamente idênticos no tamanho (entre 0,5 a 10 kb dependendo da espécie) mas são heterogêneos em sua sequência (revisado por LUKES et al., 2002).

A mitocôndria é única e estende-se por toda célula abaixo dos microtúbulos subpeliculares e membrana plasmática. Assim como em outros eucariotos, a mitocôndria de tripanossomatídeos é bastante dinâmica, variando sua forma e função em resposta à estímulos ambientais e alterações no metabolismo energético (MENNA-BARRETO; DE CASTRO, 2014).

O núcleo de *T. cruzi* organiza-se de forma similar a outras células eucarióticas. Possui cerca de 2,5  $\mu\text{m}$ , sendo que em tripomastigotas apresenta-se alongado e na porção central da célula, sendo arredondado nas formas amastigotas e epimastigotas. A membrana nuclear possui poros, havendo continuidade entre a membrana externa e o retículo endoplasmático. Um nucléolo típico é observado apenas na forma epimastigota (DE SOUZA, 2008). Os cromossomos são difíceis de distinguir, já que não condensam em nenhuma fase do ciclo de vida do parasito. Cepas híbridas como é o caso de CL Brener, apresentam uma dificuldade ainda maior na montagem do genoma, para o qual foi predito 41 pares de cromossomos, sendo o menor com 78 kb e o maior com 2,3 mb, codificando mais de 21 mil genes (WEATHERLY; BOEHLKE; TARLETON, 2009).

Os glicosomos são organelas exclusivas de Kinetoplastea, embora compartilhem características similares aos peroxissomos e apresentem uma relação evolutiva próxima

(PARSONS, 2004). Assim como os peroxissomos, são revestidos por uma membrana única e possuem uma matriz densa em proteínas, com algumas espécies, como *Crithidia*, apresentando proteínas como a catalase, característica de peroxissomos (PARSONS, 2004). Contudo, os glicossomos possuem enzimas da via glicolítica e, portanto, promovem a degradação da glicose, em contraste com os demais eucariotos onde essas enzimas encontram-se no citosol (DE SOUZA, 2008). Além disso, é nos glicossomos que muitas vias metabólicas acontecem, como síntese *de novo* de pirimidinas, salvamento de purinas, metabolismo de peróxido, etc. (PARSONS, 2004). O número de glicossomos e a área que ocupam no citoplasma variam de espécie para espécie e também em diferentes formas do ciclo de vida do protozoário (DE SOUZA, 2002).



**Figura 1.4-1 Componentes celulares da forma epimastigota de *T. cruzi***

Fonte: adaptado de DOCAMPO et al., 2005.

Nota: componentes celulares do parasito *T. cruzi*, como microtúbulos (microtúbulos subpeliculares do corpo celular e do axonema do flagelo), tamanho e localização de organelas como núcleo, reservossomos, acidocalcissomos, glicossomos, entre outros.

Acidocalcissomos são organelas arredondadas que acumulam cálcio em seu interior. São caracterizados por sua natureza acídica e acúmulo de material elétron-denso, com grande quantidade de polifosfatos (polyP), cálcio, magnésio, entre outros elementos. Sua membrana possui bombas e permutadores que contribuem para a sua função como sítio de

armazenamento de polyP,  $\text{Ca}^{2+}$  e outros cátions, manutenção do pH, sinalização celular pela captura/liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  e osmorregulação em associação com o vacúolo contrátil (DOCAMPO; MORENO, 2001; DE SOUZA, 2008).

O complexo do vacúolo contrátil está localizado ao lado da bolsa flagelar e possui um vacúolo central de onde parte uma rede interligada de túbulos e vesículas chamada espongioma. Assim como nos acidocalcissomos, a membrana do vacúolo contrátil possui bombas de próton como V-H<sup>+</sup>-ATPase e V-H<sup>+</sup>-PPase, bem como uma aquaporina, existente em ambas as organelas (DOCAMPO et al., 2013). O vacúolo contrátil de *T. cruzi* acumula o excesso de água do interior da célula por meio da aquaporina (TcAQP1) e está envolvido no controle do estresse hipo e hiperosmótico, além do controle do volume celular. Ainda, o vacúolo contrátil de *T. cruzi* está envolvido no tráfego de proteínas, já que o transportador de poliamina presente no vacúolo (TcPOT1) é transferido para a membrana plasmática quando o meio é deficiente em poliaminas. A presença de Rab11, proteína marcadora de endossomos de reciclagem, no vacúolo contrátil de *T. cruzi* reforça a ideia de que esta organela pode atuar como uma central de tráfego ao enviar proteínas para a membrana plasmática (DOCAMPO et al., 2013).

O retículo endoplasmático de tripanossomatídeos está disperso por todo o corpo do parasito, sendo que por vezes atinge a periferia celular comunicando-se com a membrana plasmática e os microtúbulos subpeliculares (DE SOUZA, 2002). Já as cisternas do complexo de Golgi estão sempre localizadas na região anterior do parasito, próximas ao cinetoplasto e à bolsa flagelar. Na maioria dos casos, as cisternas estão orientadas perpendicularmente em relação ao cinetoplasto e paralelamente à bolsa flagelar. Vesículas brotam da face *trans* do complexo de Golgi próximas à bolsa flagelar (SOUZA, 2002). O retículo endoplasmático, o complexo de Golgi e compartimentos endossomais como os reservossomos formam o sistema endossomal de *T. cruzi* e estão envolvidos no tráfego intracelular, juntamente com a exocitose/endocitose polarizada na bolsa flagelar e citóstoma do parasito. O transporte intracelular é abordado na seção 1.5.

Os tripanossomatídeos possuem um único flagelo que emerge do corpo basal. O corpo basal é formado a partir do centríolo e atua como uma base para a construção do axonema flagelar. Durante a mitose, a duplicação do corpo basal é uma etapa fundamental e crítica na divisão destes parasitos (FIELD; CARRINGTON, 2009). O flagelo é composto por nove pares de microtúbulos disposto ao redor de um par central de microtúbulos. Possui uma área de adesão ao corpo celular, chamada zona de adesão flagelar (FAZ; *flagelar attachment zone*)

a qual liga também o axonema à estrutura paraflagelar, presente apenas em tripanossomatídeos. A estrutura paraflagelar estende-se por todo o comprimento do flagelo, acompanhando o axonema, sendo crucial na motilidade dos parasitos. No gênero *Trypanosoma*, uma estrutura única chamada conector flagelar conecta a ponta do novo flagelo em desenvolvimento com o antigo durante a divisão celular. A dinâmica do flagelo envolve a movimentação de proteínas por toda a sua extensão em ambos os sentidos, processo chamado transporte intraflagelar e o seu estudo tem demonstrado o envolvimento de proteínas motoras, como as miosinas, em *Leishmania* (KATTA et al., 2010).

O flagelo é um componente importante na estrutura da bolsa flagelar, vital nestes parasitos. É o flagelo e sua interação com o colar da bolsa flagelar que definem a estrutura e orientação da bolsa flagelar. À exceção dos epimastigotas do subgênero *Schizotrypanum* (como *T. cruzi*), a endocitose ocorre apenas na bolsa flagelar, de forma que pelo menos um flagelo reduzido é necessário para manter sua estrutura, como ocorre nas formas amastigotas. Além de contribuir para a formação da bolsa flagelar, o flagelo de tripanossomatídeos ainda está associado à adesão à superfície (fundamental na metaciclo gênese de *T. cruzi*, por exemplo), motilidade, e controle da morfogênese (WHEELER; GLUENZ; GULL, 2013).

#### **1.4.1 Reservossomos**

Os reservossomos são organelas exclusivas do subgênero *Schizotrypanum*, como o *T. cruzi*, embora sejam encontrados apenas nas formas epimastigota e amastigota desse parasito (BATISTA et al., 2015; DE SOUZA et al., 2000). São estruturas arredondadas medindo de 0,4 a 0,6  $\mu\text{m}$  de diâmetro, revestidas por uma membrana única, localizadas na região posterior do parasito (SOARES; SOUTO-PADRÓN; DE SOUZA, 1992). Possuem um pH ácido, 6,0, mantido por bombas de prótons codificadas pelos genes TcHA1 e TcHA2 (VIEIRA et al., 2005). Sua matriz é composta por proteínas e lipídeos, onde as macromoléculas endocitadas pelos epimastigotas são armazenadas. Caracterizam-se como um compartimento pré-lisossomal, onde se acumula a principal cisteína-protease de *T. cruzi*, a cruzipaina (SANT'ANNA; SOUZA; CUNHA-E-SILVA, 2004).

Os reservossomos formam-se na parte anterior da forma epimastigota, juntando-se às vias secretória e endocítica e migrando para parte posterior do parasito onde se concentram (SANT'ANNA; SOUZA; CUNHA-E-SILVA, 2004). A ausência de típicos marcadores lisossomais, como LAMP1, previne a sua caracterização como lisossomos sendo, portanto,

caracterizados como uma organela *lysosome-like* (VIEIRA et al., 2005). Além disso, a presença de diferentes Rabs - GTPases reguladoras do tráfego de vesículas entre as vias secretória e endocítica (SANT'ANNA et al., 2009) - no proteoma de reservossomos isolados, torna a sua caracterização ainda mais difícil. Em 2006, Cunha-e-Silva e colaboradores, propuseram os reservossomos como sendo organelas multifuncionais, servindo para o armazenamento, reciclagem ou degradação de moléculas endocitadas de acordo com o seu nível de maturação e posicionamento no citoplasma do parasito (CUNHA-E-SILVA et al., 2006).

Durante a diferenciação da forma epimastigota para tripomastigota metacíclica, os reservossomos desaparecem completamente, sugerindo que o material armazenado sirva como fonte de energia durante o processo de diferenciação (SANT'ANNA; SOUZA; CUNHA-E-SILVA, 2004). Contudo, um trabalho recente mostrou que a Tf-Au (transferrina conjugada à ouro usada em ensaios de endocitose) é endocitada por epimastigotas e detectável em estruturas circulares no interior do parasito após a metaciclogênese (VIDAL et al., 2017). Os autores propõem, então, que as LROs (*lysosome-related organelles*) das formas metacíclicas sejam originadas a partir dos reservossomos de epimastigotas, questionando se os reservossomos realmente desaparecem durante a metaciclogênese, como se acreditava até então, ou se são remodelados em tamanho, forma e distribuição, perdendo a sua capacidade de armazenar material endocitado, originando as LROs das formas metacíclicas (VIDAL et al., 2017).

Os reservossomos parecem estar envolvidos na metaciclogênese, já que acumulam a cruzipaina responsável pela intensa proteólise que ocorre durante a diferenciação. A utilização de inibidores dessa protease levou à diminuição da taxa de diferenciação, enquanto que a sua super-expressão levou ao aumento da metaciclogênese (FRANKE DE CAZZULO et al., 1994; TOMAS; MILES; KELLY, 1997). Além disso, os reservossomos estão envolvidos em processos autofágicos que levam ao remodelamento celular durante a metaciclogênese (ALVAREZ et al., 2008).

### 1.4.2 Superfície celular: membrana plasmática e suas especializações

A superfície celular, recoberta pela membrana plasmática, pode ser dividida em três macrodomínios: as membranas do corpo celular, do flagelo e da bolsa flagelar. São distinguidos pela presença de microtúbulos subpeliculares na membrana do corpo celular ou pela presença de microtúbulos do axonema na membrana flagelar. Na membrana da bolsa flagelar os microtúbulos subpeliculares estão ausentes e ocorre intensa atividade endocítica e exocítica (DE SOUZA, 2007). Os macrodomínios podem conter especializações, chamadas microdomínios.

Os microdomínios são regiões denominadas *raft-like*, ricas em esteróis, esfingolípídeos e proteínas ancoradas por GPI (glicosil-fosfatidil-inositol) (DE SOUZA, 2007). Alguns microdomínios foram descritos em tripanossomatídeos, o primeiro, chamado colar flagelar, encontra-se na base do flagelo. Até agora, apenas a proteína BILBO1 foi descrita no colar flagelar de *T. brucei* e sua ausência impediu a formação da bolsa flagelar e resultou no acúmulo de vesículas neste parasito (BONHIVERS et al., 2008). O segundo microdomínio encontra-se na região de adesão do flagelo ao corpo celular e apresenta-se de três formas estruturalmente distintas. Evidências indiretas indicam a presença de glicoproteínas nesse microdomínio, como é o caso da proteína Gp72, ancorada por GPI, cujo nocaute em *T. cruzi* leva ao descolamento do flagelo do corpo celular e à ausência da estrutura de adesão (DE SOUZA, 2007).

Um importante microdomínio chamado citóstoma, está presente apenas nas formas epimastigotas e amastigotas de espécies do gênero *Trypanosoma*, sub-gênero *Schizotrypanum*, como *T. cruzi*, *T. dionisii* e *T. vespertilionis* (DE SOUZA, 2007). Trata-se de uma abertura na superfície celular de cerca de 0,3 µm próxima ao flagelo, cuja invaginação da membrana plasmática em direção ao núcleo celular leva à formação de uma estrutura em forma de funil chamada citofaringe. Microtúbulos subpeliculares acompanham a membrana plasmática da citofaringe (DE SOUZA, 2002). Já a membrana que recobre o citóstoma é mais espessa, rica em glicoconjugados, sugerindo a existência de um domínio de membrana especializado (DE SOUZA; SANT'ANNA; CUNHA-E-SILVA, 2009). O complexo citóstoma-citofaringe é responsável por cerca de 85% da atividade endocítica do parasito, sendo que os 15% restantes ocorrem na bolsa flagelar, em marcante contraste com as demais espécies, como *T. brucei*, onde toda a atividade endocítica ocorre na bolsa flagelar (DE SOUZA, 2007).

### 1.4.3 Citoesqueleto

#### 1.4.3.1 Microtúbulos

Os microtúbulos subpeliculares (SPMT, *subpellicular microtubules*) são o principal componente do citoesqueleto de tripanossomatídeos, constituídos pelos heterodímeros  $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina, e estão fortemente associados à membrana plasmática (VIDAL; DE SOUZA, 2017). Na maioria das células eucarióticas, os microtúbulos aparecem como estruturas individuais, embora possam formar complexos ao associar-se entre si ou entre outras estruturas celulares. Contudo, os microtúbulos subpeliculares são encontrados apenas em Apicomplexa e Kinetoplastea (DE SOUZA; ATTIAS, 2010).

Microtúbulos subpeliculares de tripanossomatídeos são formados por 13 repetições sequenciais de pares de  $\alpha/\beta$ -tubulina, chamados protofilamentos (DE SOUZA; ATTIAS, 2010). Embora existam vários genes codificadores de tubulina (tanto  $\alpha$  quanto  $\beta$ -tubulina) no genoma de tripanossomatídeos, apenas o mRNA (RNA mensageiro) de um gene de  $\alpha$ -tubulina e de um gene de  $\beta$ -tubulina puderam ser detectados. Além disso, modificações pós-traducionais, como acetilação e tirosinação, parecem ocorrer nos SPMT de *T. brucei* (DE SOUZA; ATTIAS, 2010).

As principais funções dos microtúbulos subpeliculares em tripanossomatídeos são a manutenção do formato celular (ao dispor-se como uma gaiola abaixo da membrana plasmática; embora permita a variação do formato celular ao longo do ciclo de vida), a manutenção da rigidez celular (impedindo o brotamento de vesículas na superfície celular e polarizando a endocitose/exocitose na bolsa flagelar de espécies como *T. brucei* e *Leishmania*, que não possuem o complexo citóstoma-citofaringe como *T. cruzi*) e, associação com organelas, como o retículo endoplasmático, permitindo a manutenção do formato da organela e fornecendo o substrato para sua locomoção no interior celular (SOUZA; ATTIAS, 2010).

Conforme descrito nos macrodomínios da membrana plasmática, a região da bolsa flagelar não apresenta microtúbulos subpeliculares. Sua composição e função são distintas das membranas do corpo celular e do flagelo, embora seja contígua a eles. A ausência de SPMT permite o brotamento de vesículas endo e exocíticas, sendo essencial também na defesa contra as respostas imunes inata e adquirida do hospedeiro. A bolsa flagelar também está envolvida na polaridade e divisão celular. Um quarteto de microtúbulos (MtQ, *microtubule quartet*) circunda a bolsa flagelar, sendo sua natureza distinta dos SPMT. No colar flagelar, os MtQ

encontram os SPMT e associam-se à zona de adesão do flagelo (FAZ), sendo que os MtQ definem os eixos do flagelo e da bolsa flagelar (VIDAL; DE SOUZA, 2017).

Na forma epimastigota de *T. cruzi*, microtúbulos estão presentes no complexo citóstoma-citofaringe, que é suportado por sete microtúbulos: um trio localizado abaixo da membrana do citóstoma e o quarteto MtQ; juntos, esse conjunto de microtúbulos ajuda a citofaringe a formar um funil, deixando um lado livre de microtúbulos por onde vesículas podem brotar ou fundir. Nas formas tripomastigotas e durante a divisão celular dos epimastigotas, o complexo-citofaringe desaparece, permanecendo apenas os microtúbulos (ALCANTARA et al., 2017; VIDAL; DE SOUZA, 2017).

#### 1.4.3.2 Microfilamentos de actina

A actina é uma proteína globular, capaz de polimerizar e formar filamentos por meio da hidrólise de ATP. A actina globular (actina-G) possui um lado chamado *barbed-end* e outro chamado *pointed-end*: actinas-G são mais rapidamente adicionadas em suas extremidades *barbed-end*, desta forma, a polimerização do filamento de actina (actina-F) cresce preferencialmente neste sentido (positivo). Para que haja a formação de actina-F, é necessário que ocorra a nucleação de actinas-G: quando três actinas-G ligadas à ATP associam-se de forma espontânea. A partir da nucleação, actinas-G são adicionadas rapidamente à extremidade *barbed-end*; o ATP é então hidrolisado e as actinas-G ligadas à ADP dissociam-se da extremidade *pointed-end* do filamento. Cátions divalentes,  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$ , ligam-se aos fosfatos do ATP e estabilizam a interação entre o ATP e a actina-G (POLLARD, 2016). Embora os monômeros de actina possam espontaneamente formar filamentos, existem várias proteínas ligadoras de actina que controlam a formação de filamentos nas células, além de outras que modificam a sua polimerização, estabilidade e arquitetura. Por exemplo, o complexo Arp2/3 é capaz de ramificar o filamento de actina, fenômeno comum na membrana plasmática; forminas facilitam a nucleação de filamentos lineares. Cofilina e gelsolina são capazes de quebrar filamentos, favorecendo a despolimerização; proteínas *crosslinker*, como  $\alpha$ -actinina, formam arranjos de filamentos e proteínas capeadoras diminuem a velocidade de polimerização ao bloquear a extremidade positiva (*barbed-end*) do filamento de actina (KOSTER; MAYOR, 2016).

Com o aumento do número de genomas de tripanossomatídeos sequenciados, a presença de actina e proteínas associadas têm sido descrita para muitas espécies, embora pouco se saiba

a respeito de sua função e localização, não sendo observada a formação de microfilamentos de actina compondo o citoesqueleto de tripanossomatídeos (VIDAL; DE SOUZA, 2017).

Em 2004, importantes trabalhos de caracterização da actina em *T. brucei* e *Leishmania donovani* apresentaram avanços acerca da localização e expressão dessa proteína em tripanossomatídeos. Na forma tripomastigota sanguínea de *T. brucei*, a actina colocaliza com a via endocítica, enquanto nas formas procíclicas distribui-se por todo corpo celular. A depleção de actina na forma tripomastigota sanguínea de *T. brucei* levou à parada da divisão celular, ausência de tráfego vesicular na membrana da bolsa flagelar, perda da atividade endocítica e, eventualmente, morte celular. Já na forma procíclica, essas drásticas alterações não foram observadas, sugerindo que a actina possui funções diferentes em determinadas formas do ciclo de vida deste parasito (GARCÍA-SALCEDO et al., 2004). Já nas formas promastigotas de *L. donovani*, uma actina não convencional, que não forma filamentos, foi encontrada no flagelo, bolsa flagelar e núcleo e, ainda, associando-se à rede de kDNA e à microtúbulos subpelículas (SAHASRABUDDHE; BAJPAI; GUPTA, 2004).

Em *T. cruzi*, estudos iniciais na década de 80 visaram localizar a actina usando anticorpos heterólogos: anti-actina de *Entamoeba histolytica* apresentou localização no flagelo de *T. cruzi* (DE SOUZA et al., 1983) enquanto anti-actina de coelho foi capaz de detectar uma proteína de 43kDa em *T. cruzi*, *Herpetomonas samuelpessoai* e *L. mexicana* (MORTARA, 1989). Também, a localização cromossômica de diversos genes codificantes de actina, bem como a estabilidade/processamento de seus transcritos e expressão em diferentes fases do ciclo de vida foram extensamente analisadas (CEVALLOS et al., 2003, 2011).

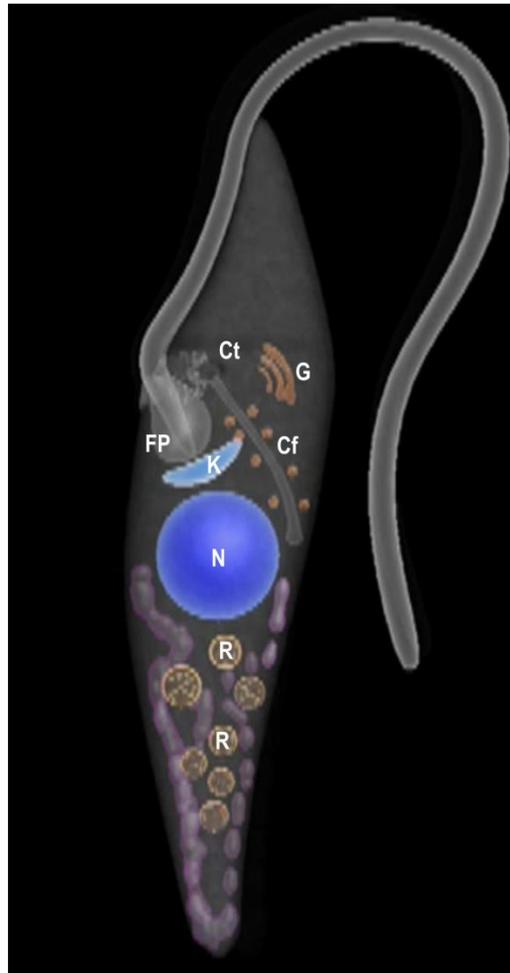
Estudos mais recentes visando identificar a localização subcelular da actina nas formas epimastigota, amastigota e tripomastigotas metacíclica e sanguínea de *T. cruzi*, usando anticorpos contra toda a proteína ou a região N-terminal de TcActina, revelaram que todas as formas do *T. cruzi* expressam a actina de forma dispersa pelo citoplasma, sem associação com SPMT ou kDNA como observado em *L. donovani* (DE MELO et al., 2008; KALB SOUZA et al., 2013). Análise *in silico* mostrou que além de quatro tipos de actina (1 à 4) (CEVALLOS et al., 2011), o *T. cruzi* apresenta várias proteínas ligadoras de actina-G e também actina-F, revelando a existência de uma maquinaria responsável pelo controle do citoesqueleto de actina neste protozoário. Contudo, *T. cruzi* apresenta algumas especializações em domínios e motivos cuja função permanece desconhecida (DE MELO et al., 2008).

## 1.5 Transporte intracelular

O sistema endossomal de tripanossomatídeos é altamente polarizado, já que os compartimentos endossomais, exceto o retículo endoplasmático, estão localizados próximo ao núcleo e ao cinetoplasto, uma vez que toda a atividade de endocitose e exocitose acontece na bolsa flagelar. A exceção é *T. cruzi*, onde 85% da atividade endocítica ocorre no citóstoma e cujo armazenamento de macromoléculas se dá nos reservossomos localizados na região posterior da célula, polo oposto à localização do cinetoplasto e bolsa flagelar (DE SOUZA, 2007; SANT'ANNA; SOUZA; CUNHA-E-SILVA, 2004).

A endocitose ocorre apenas nas formas epimastigotas e, em menor grau, amastigotas de *T. cruzi* (BATISTA et al., 2015), estando ausente nas formas tripomastigotas. Durante a endocitose, vesículas brotam da citofaringe ou da bolsa flagelar e fundem-se à endossomos iniciais localizados na região perinuclear. Seguem, então, por uma rede tubular que se estende pela região posterior do parasito até encontrarem os reservossomos, onde as macromoléculas endocitadas são armazenadas (PORTO-CARREIRO et al., 2000) (Figura 1.5-1). Além de sua importância na ingestão de nutrientes, a endocitose em parasitos está associada à manutenção da interação parasito-hospedeiro, evasão do sistema imune, patogênese e progressão no ciclo de vida (MANNA; KELLY; FIELD, 2013).

O transporte intracelular, além da endocitose, está envolvido na via biossintética onde os produtos sintetizados e modificados no complexo retículo endoplasmático-Golgi são empacotados em vesículas e endereçados para as organelas de destino ou para secreção. Isso requer um refinado sistema coordenado espacial e temporalmente para garantir o correto endereçamento das vesículas provenientes da endocitose e da via biossintética. O transporte mediado por vesícula requer o brotamento da membrana da organela doadora (ponto de origem) e o fusionamento da vesícula com a membrana da organela aceptora (ponto de destino). Durante o brotamento da vesícula, a carga é aprisionada em seu interior, mas, para que haja seletividade, a distinção entre a carga e as moléculas residentes na organela doadora deve acontecer de forma precisa. Além disso, a vesícula deve carregar sinais que garantam sua chegada no destino correto (BONIFACINO; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, 2003).



**Figura 1.5-1 Representação da via endocítica em epimastigotas de *T. cruzi***

Fonte: adaptado de DE SOUZA; SANT'ANNA; CUNHA-E-SILVA, 2009.

Nota: os compartimentos endocíticos são altamente polarizados, a bolsa flagelar (FP) e o citóstoma (Ct) são invaginações da porção anterior da membrana plasmática (cinza), próximos ao complexo de Golgi (G) e ao cinetoplasto (K). A citofaringe (Cf) estende-se da abertura do citóstoma até próximo ao núcleo (N). Endossomos iniciais correspondem a uma rede de túbulos e vesículas (roxo). Reservossomos (R) são organelas arredondadas com inclusões.

As vesículas podem ser revestidas por clatrina ou proteínas COP-I e COP-II, estas últimas envolvidas na via biossintética de transporte entre retículo endoplasmático e complexo de Golgi (SZUL; SZTUL, 2011). A clatrina, por sua vez, está envolvida nos processos mediados por receptores como a endocitose da membrana plasmática e transporte de macromoléculas entre a rede trans-Golgi e compartimentos endossomais. Contudo, a clatrina não se associa diretamente aos receptores ou às membranas, necessitando de proteínas adaptoras (PARK; GUO, 2014).

Proteínas adaptadoras desempenham um papel crítico no endereçamento de moléculas ao se ligarem aos sinais de distribuição presentes na cauda citoplasmática da proteína receptora e no recrutamento da clatrina e outras proteínas acessórias, concentrando a carga dentro das vesículas. Existem cinco complexos adaptadores denominados AP-1 à AP-5, todos

compostos por duas grandes subunidades ( $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  ou  $\zeta$  e  $\beta_{1,2,3,4}$  ou 5), uma subunidade média ( $\mu_{1-5}$ ) e outra pequena ( $\sigma_{1-5}$ ). Cada subunidade pode ter várias isoformas, permitindo uma variedade de combinações de heterotetrâmeros de AP que conferem uma diversidade de especializações de função e localização (PARK; GUO, 2014).

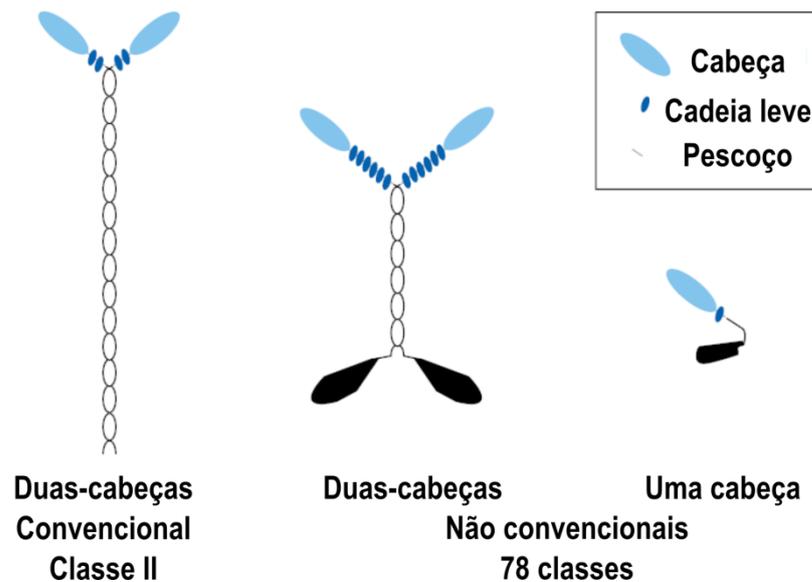
## 1.6 Miosinas

Miosinas são motores moleculares dependentes de actina. Sua ligação à filamentos de actina (actina-F) depende da hidrólise de ATP, que ocorre em sua porção N-terminal na região denominada domínio motor ou cabeça (KRENDEL; MOOSEKER, 2005). Além da cabeça, as miosinas possuem uma região intermediária, denominada pescoço, que pode conter um ou mais motivos IQ de ligação à calmodulina ou outros membros da família EF-hand, e uma cauda na porção C-terminal responsável pela ligação à carga ou pela dimerização da miosina (KRENDEL; MOOSEKER, 2005) (Figura 1.6-1).

As três regiões da miosina, cabeça, pescoço e cauda, são alvos para regulação: o domínio motor (cabeça) pode ser regulado por meio de fosforilação; o pescoço é regulado através de seus sítios de ligação à calmodulina ou outros sensores de cálcio e a cauda pode ser fosforilada ou mudar seu estado de oligomerização (BATTERS et al., 2014; BATTERS; VEIGEL, 2016; HEISLER; SELLERS, 2016).

As primeiras miosinas identificadas foram denominadas convencionais, pertencentes à Classe II, enquanto todas as demais são denominadas não-convencionais. As miosinas convencionais formam filamentos bipolares através da homo-oligomerização de suas caudas e são encontradas, por exemplo, nos diferentes tipos de músculos. Já as miosinas não-convencionais não formam filamentos, embora algumas delas formem dímeros. Normalmente suas caudas ligam-se à membranas ou a outras proteínas (WOOLNER; BEMENT, 2009). (Figura 1.6-1).

As miosinas não-convencionais têm sido associadas a uma variedade de funções: servindo como amarras para organelas e proteínas, como a miosina-5b que garante a correta localização de endossomos (PROVANCE et al., 2008); organização e dinâmica da actina-F por miosinas de Classe I favorecendo, por exemplo, a endocitose em *Saccharomyces cerevisiae* (KAKSONEN; TORET; DRUBIN, 2006), até a existência de miosinas no núcleo celular onde está envolvida na eficiência de transcrição da RNA pol I, entre outras funções (WOOLNER; BEMENT, 2009).



**Figura 1.6-1 Representação da estrutura de miosinas convencionais e não-convencionais**

Fonte: adaptado de KALHAMMER; BÄHLER, 2000.

Nota: as miosinas são compostas por uma ou duas cabeças, pescoço de tamanho variável com uma variedade de cadeias-leve associadas, e uma cauda. As caudas das miosinas convencionais (Classe II) e de algumas miosinas não-convencionais (78 classes, de acordo com Kollmar e Mühlhausen, 2017) podem dimerizar e formam uma estrutura *coiled-coil*  $\alpha$ -hélice, levando à formação de moléculas com duas cabeças. Contudo, a cauda de muitas miosinas não-convencionais não dimeriza e, portanto, possuem uma única cabeça.

### 1.6.1 Função das miosinas em protozoários

A função das miosinas em protozoários ainda é pouco conhecida, sendo que os estudos nessa área concentram-se nos parasitos alveolados do filo Apicomplexa, como *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium falciparum*. Esses parasitos são desprovidos de cílios e flagelos e utilizam a locomoção por deslizamento (*gliding motility*), que também atua como um mecanismo de invasão de células hospedeiras (MEISSNER; FERGUSON; FRISCHKNECHT, 2013).

*T. gondii*, agente causador da toxoplasmose, possui onze genes codificantes de miosinas, um deles, produz as miosinas B e C por *splicing* alternativo. A miosina A (TgMyoA), pertence à classe XIV de miosinas exclusivas de Apicomplexa, e é um dos componentes do gliodeossomo, complexo protéico necessário para a locomoção por deslizamento (MUELLER; GRAINDORGE; SOLDATI-FAVRE, 2017). Além da miosina A, a classe XIV compreende as miosinas B/C, D, E e H. As miosinas B/C estão envolvidas na divisão celular por endodiogenia; MyoD, por sua vez, localiza-se na membrana plasmática, enquanto que MyoE e MyoH localizam-se na conóide (uma estrutura cônica apical

característica de alguns membros do filo Apicomplexa, envolvida no processo de invasão de células hospedeiras) (MORRISSETTE; SIBLEY, 2002; MUELLER; GRAINDORGE; SOLDATI-FAVRE, 2017). TgMyoF é membro da classe XXII, e é essencial para a sobrevivência do parasito, participando em processos como o posicionamento do centrosomo e herança do apicoplasto (outra organela característica de Apicomplexa, semelhante ao cloroplasto). Pertencentes a outras classes, TgMyoJ está envolvida na constrição do pólo basal durante a formação das células-filha e TgMyoI promove a comunicação célula-célula entre parasitos intravacuolares. Já a função de TgMyoD, TgMyoG e TgMyoK permanece desconhecida (MUELLER; GRAINDORGE; SOLDATI-FAVRE, 2017).

Em *P. falciparum*, agente causador da malária, seis miosinas foram preditas e nomeadas PfMyoA à PfMyoF. PfMyoA, órtologa de TgMyoA, também está envolvida na locomoção por deslizamento e, portanto, na invasão de células hospedeiras. PfMyoB, apresenta 35% de identidade e 70% de similaridade com a sequência de PfMyoA, contudo, PfMyoB não colocaliza com outros componentes do gliodeossomo-MyoA, embora também pareça estar envolvida na invasão celular por mecanismos ainda desconhecidos (HERNÁNDEZ et al., 2017).

Outras espécies de Apicomplexa, *Neospora caninum*, *Eimeria tenella*, *Sarcocystis muris*, *Babesia bovis* e *Cryptosporidium parvum* também apresentam miosinas em seus genomas, embora pouco se saiba a respeito da função desses genes (HEINTZELMAN et al., 2001).

Já *Tetrahymena thermophyla*, um alveolado ciliado, possui treze genes codificantes de miosinas, embora apenas a sua Myo1 tenha sido analisada funcionalmente. O nocaute dessa miosina não foi capaz de formar e transportar fagossomos, de alongar o macronúcleo e segregar o DNA durante a divisão celular, além de não promover a condensação da cromatina e acidificação do macronúcleo durante o acasalamento (CERVANTES et al., 2013; SUGITA et al., 2011).

*Entamoeba histolytica*, uma ameba patógena humana, possui apenas duas miosinas, uma miosina II e uma miosina não convencional Ib, cuja super-expressão leva à redução da fagocitose devido ao aumento da viscosidade citoplasmática, já que essa miosina é capaz de controlar a rede de actina ao estabelecer ligações cruzadas entre os filamentos (MARION et al., 2004).

Em parasitos do filo Euglenozoa, particularmente os tripanossomatídeos da classe Kinetoplastea, a caracterização funcional de genes da família das miosinas foi feita apenas para as espécies *T. brucei* e *Leishmania* spp. Ambas as espécies possuem dois genes codificantes de miosinas, Myo1, pertencente à classe I, e Myo13 (previamente denominada Myo21), pertencente à classe XIII (ou XXI, presente apenas em cinetoplastídeos e *Naegleria gruberi*, outro Excavata). Em *T. brucei*, a caracterização funcional da Myo1 revelou seu envolvimento na via endocítica das formas sanguíneas, embora nenhum efeito tenha sido observado nas formas procíclicas após o *knockdown* deste gene. Já o *knockdown* da Myo13 não apresentou nenhuma alteração quanto à via endocítica ou crescimento das formas sanguíneas (SPITZNAGEL et al., 2010).

Em *Leishmania* spp. a Myo13 parece estar envolvida no tráfego intraflagelar das formas promastigotas, já que a deleção de um dos alelos leva à redução do comprimento do flagelo e da estrutura paraflagelar. Além disso, este gene mostrou-se essencial para a sobrevivência do parasito (KATTA et al., 2010). Com relação à Myo1 de *Leishmania* spp. sua expressão proteica não pôde ser detectada usando anticorpos específicos para a região da cauda desta miosina (KATTA; SAHASRABUDDHE; GUPTA, 2009).

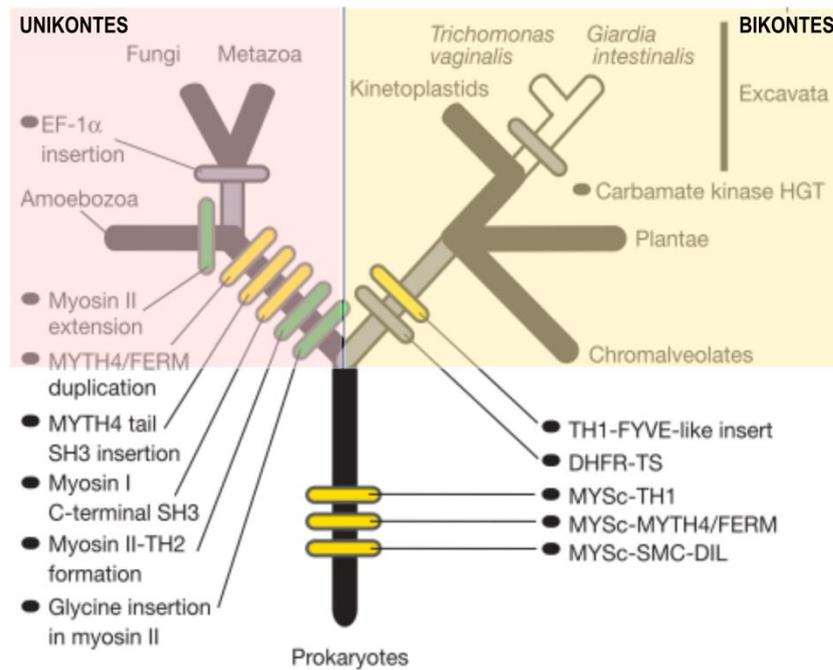
Em *T. cruzi*, apesar da família gênica de miosinas ser maior do que nos tripanossomatídeos descritos acima, nenhum trabalho de caracterização funcional foi publicado até o momento. Nosso grupo tem se dedicado a estudar a função das miosinas neste parasito e o presente trabalho traz as principais descobertas realizadas até o momento, descritas nos Capítulos 1 e 2 e Anexos.

## 1.6.2 Classificação das miosinas e a evolução da vida eucariótica

As miosinas surgiram no início da vida eucariótica e tiveram uma ampla diversificação e distribuição entre os taxa. Existem diversos trabalhos sobre a classificação e a evolução das miosinas entre os eucariotos (CHENEY; RILEY; MOOSEKER, 1993; THOMPSON; LANGFORD, 2002; FOTH; GOEDECKE; SOLDATI, 2006; KOLLMAR; MÜHLHAUSEN, 2017; ODRONITZ; KOLLMAR, 2007; RICHARDS; CAVALIER-SMITH, 2005; SEBÉ-PEDRÓS et al., 2014). Dentre esses, o mais recente classifica as miosinas em 79 classes distintas e foi baseado em 7.852 sequências de 929 organismos (KOLLMAR; MÜHLHAUSEN, 2017), mais que o dobro das classes previstas 10 anos antes pelo mesmo autor (35 classes, 2.269 sequências, 328 organismos) (ODRONITZ; KOLLMAR, 2007), embora mudanças na metodologia utilizada possam interferir no número de classes propostas.

O desenvolvimento do complexo actina-miosina foi proposto como uma inovação molecular chave criada logo no início da vida eucariótica, que permitiu a evolução da fagotrofia e, por conseguinte, levou à evolução das mitocôndrias e cloroplastos, bem como a formação do sistema endomembranas e exocitose (CAVALIER-SMITH, 2002). Dada a sua importância ao estilo de vida eucariótico, a dispersão das miosinas na grande maioria dos *taxa* sequenciados e analisados até o momento é bastante justificável - as exceções são os parasitos protozoários *Giardia lamblia* e *Trichomonas vaginalis*, (KOLLMAR; MÜHLHAUSEN, 2017). Após o surgimento das primeiras moléculas motoras, a sua diversificação por duplicação gênica, verificável pela grande quantidade de genes parálogos, é vista desde as filogenias mais antigas até as mais recentes (KOLLMAR; MÜHLHAUSEN, 2017; RICHARDS; CAVALIER-SMITH, 2005).

Com o aumento do número de genomas sequenciados, a diversidade da família das miosinas mostra-se cada vez maior, como evidenciado por trabalhos que incluem espécies-chave de diversos *taxa* a fim de estabelecer as relações filogenéticas entre as diversas classes (KOLLMAR; MÜHLHAUSEN, 2017; ODRONITZ; KOLLMAR, 2007; SEBÉ-PEDRÓS et al., 2014). Para entender a evolução da família das miosinas é importante incluir na reconstrução filogenética não apenas membros de diferentes grupos dentre os unikontes (organismos ancestralmente uniciliares) e bikontes (biciliares), mas também membros de classes eucarióticas de ramificação precoce, como os cinetoplastídeos (Figura 1.6.2-1).



**Figura 1.6.2-1 História evolutiva das principais inovações em genes de miosinas de unikontes e bikontes**

Fonte: adaptado de RICHARDS; CAVALIER-SMITH, 2005.

Nota: árvore esquemática apresentando as sinapomorfias (caracteres derivados, inovações, compartilhados por homologia) em miosinas (barras verdes) em unikontes (quadro rosa), outras apomorfias (caracteres derivados) importantes (barras cinzas) na divisão dos eucariotos em unikontes e bikontes (quadro amarelo) e sinapomorfias com perdas secundárias (barras amarelas). Ramo em branco mostra a ausência de miosinas. MYSc, domínio motor da miosina.

Os primeiros trabalhos que incluíram cinetoplastídeos na filogenia das miosinas contemplaram apenas os tripanossomatídeos *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major*, por serem os primeiros desse grupo a terem o genoma sequenciado (EL-SAYED et al., 2005b, BERRIMAN et al., 2005; IVENS et al., 2005). Odronitz e Kollmar (2007) foram os primeiros a incluir um número maior de tripanossomatídeos em sua filogenia: *T. cruzi*, *T. brucei*, *T. vivax*, *T. congolense*, *L. major*, *L. infantum* e *L. braziliensis*. Todas essas espécies apresentam uma Myo1, miosina de Classe I encontrada em quase todos os organismos, e uma Myo13, pertencente à nova Classe XIII (anteriormente denominada Classe XXI) de miosinas exclusivas de cinetoplastídeos. Notadamente, *T. cruzi* foi a única dessas espécies a apresentar sete miosinas adicionais, as quais os autores nomearam MyoA à MyoG e, por não possuírem ortólogos em outros organismos, foram consideradas miosinas “órfãs” (ODRONITZ; KOLLMAR, 2007). Um trabalho posterior, utilizou apenas as sequências de *L. major*, e a classificação de miosinas em tripanossomatídeos permaneceu a mesma (SEBÉ-PEDRÓS et al., 2014).

Vários trabalhos interessantes surgiram após o sequenciamento do genoma de *B. saltans* visando entender as origens do parasitismo ao comparar seu genoma com o de seus parentes parasitários (JACKSON et al., 2016; JANOUSKOVEC; KEELING, 2016; OPPERDOES et al., 2016). Também foi possível analisar o repertório de miosinas que este protozoário exibe e acrescentá-lo na filogenia de Kollmar e Mühlhausen (2017).

Tendo em vista a importância funcional das miosinas em eucariotos e, particularmente em protozoários, e tendo disponível o genoma de *B. saltans* e de vários tripanossomatídeos para busca de ortólogos dos genes de miosinas de *T. cruzi*, esse trabalho buscou reconstruir a história evolutiva da família das miosinas em tripanossomatídeos, mostrando eventos de retenção, perda e neofuncionalização desses genes em Kinetoplastea (Capítulo 1). Além disso, a caracterização funcional de algumas miosinas de *T. cruzi* mostrou seu envolvimento em importantes processos da biologia do parasito como transporte intracelular e diferenciação, bem como na morfologia e posicionamento de organelas como os reservossomos (Capítulo 2 e Anexos).

## 1.7 Métodos de filogenética

A Filogenética é o estudo das relações evolutivas entre entidades biológicas como espécies e genes e seus principais objetivos são classificar os organismos vivos, estabelecer propriedades compartilhadas entre grupos de organismos (clados) e inferir propriedades ancestrais a partir das características observadas nos organismos atuais (SLEATOR, 2011). A filogenética molecular examina como sequências biológicas como DNA, RNA e proteínas evoluem. Além de permitir estabelecer a história evolutiva de um determinado grupo de organismos/genes, a filogenética tem sido usada em diversas áreas das Ciências Biológicas e Médicas, como biologia da conservação, epidemiologia, medicina forense, desenvolvimento de medicamentos e predição da função de genes/proteínas (STAMATAKIS, 2005).

A análise filogenética é representada por árvores filogenéticas que apresentam as relações entre as espécies, genes ou proteínas. Uma árvore filogenética possui ramos terminais que representam as espécies/moléculas atuais estudadas (conjunto de dados), nós internos representando eventos de especiação (no caso de uma árvore de espécies) ou de duplicação (no caso de árvores de genes) e um nó basal, na raiz da árvore, que representa o último ancestral em comum entre as espécies/moléculas analisadas (YANG; RANNALA, 2012). No caso de filogenias moleculares, o tamanho dos ramos representa o grau de

divergência entre as sequências, com longos ramos indicando uma divergência maior (em número de substituições por sítio) quando comparada com as demais sequências dessa árvore.

A busca por sequências homólogas (origem evolutiva comum: descendentes de um mesmo ancestral) é o passo inicial para reconstrução da história evolutiva de genes/proteínas e é feita com base em uma sequência conhecida. Existem diversas ferramentas *online* para busca de genes homólogos, uma das mais utilizadas chamada Blast (Basic Local Alingment Sequence Tool). Como seu próprio nome diz, baseia-se, assim como todas as ferramentas de busca de sequências homólogas, no alinhamento da sequência-alvo (*query*) contra a base de dados local, onde uma grande quantidade de genomas está disponível. Diferentes ferramentas possuem algoritmos para alinhamento específicos e podem, portanto, apresentar diferentes resultados.

A partir da obtenção das sequências homólogas, o alinhamento dessas sequências deve ser feito para construção da árvore filogenética. Esta etapa é fundamental para a reconstrução filogenética, já que ela parte do princípio de que cada posição do alinhamento (cada nucleotídeo ou aminoácido alinhado) é homólogo entre todas as sequências do grupo de dados e, portanto, cada variação no nucleotídeo corresponde à mutação ocorrida ao longo do tempo entre essas sequências. Portanto, o correto alinhamento entre as sequências de genes/proteínas homólogas é fundamental para inferência filogenética. Existem inúmeras ferramentas disponíveis *online* para o alinhamento progressivo de sequências homólogas como o ClustalW, Muscle e T-Coffee. Duas excelentes revisões podem ser encontradas em Baldauf (2003) e Yang e Rannala (2012) que descrevem os passos da reconstrução filogenética.

Existem diferentes métodos para reconstrução filogenética que podem ser divididos em duas categorias: a) métodos baseados em uma matriz de distância (também chamados de métodos de agrupamento ou algoritmo) onde são feitas comparações entre sequências pareadas a partir das sequências inteiras. Entre eles estão os métodos UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) e Neighbor-Joining (NJ) e; b) métodos baseados em caracteres discretos (também chamados de busca por árvores) onde cada caracter (como nucleotídeos) das sequências alinhadas é analisado. Constituem os métodos de Máxima Parcimônia (MP), Máxima Verossimilhança (Maximum Likelihood, ML) e métodos Bayesianos (BALDAUF, 2003).

Os métodos de reconstrução filogenética dependem de um modelo evolutivo, que deve estar de acordo com o conjunto de dados analisados. Um modelo evolutivo é uma análise probabilística do processo de mudança ao longo do tempo das sequências moleculares

(THORNE, 2000). Para isso, os modelos estabelecem algumas suposições como, por exemplo, o modelo JC69 supõe uma taxa igual de substituição entre dois nucleotídeos, enquanto que o modelo K80 supõe diferentes taxas entre transições (bases purinas por purinas:  $A \leftrightarrow G$  ou; bases pirimidinas por pirimidinas:  $T \leftrightarrow C$ ) e transversões (purinas por pirimidinas e vice-versa:  $A/G \leftrightarrow T/C$ ), embora ambos os modelos suponham frequências iguais dos quatro nucleotídeos (YANG; RANNALA, 2012). Há modelos que consideram a frequência dos nucleotídeos com base nas sequências e há ainda funções que podem ser adicionadas aos modelos, como a distribuição gamma que supõe diferentes taxas de substituição ao longo das sequências.

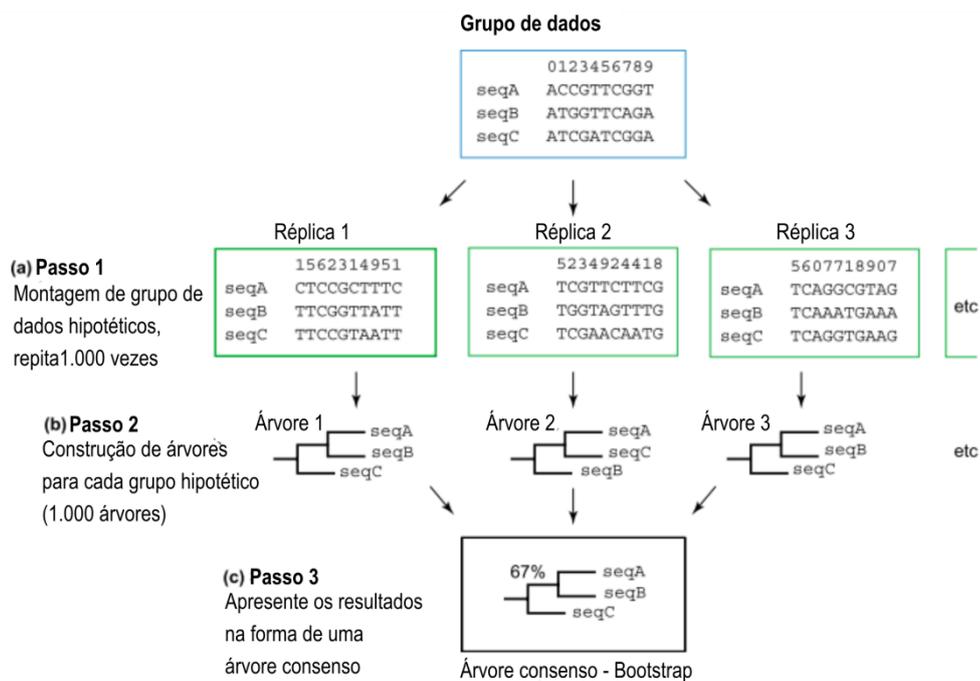
Dentro os métodos de distância o mais utilizado é o Neighbor-Joining (YANG; RANNALA, 2012). Consiste em um algoritmo de agrupamento, iniciando com uma árvore em estrela (não-enraizada) a partir do agrupamento entre dois *taxa* mais próximos (a partir dos cálculos baseados na matriz de distância), recalculando as distâncias com base em cada novo agrupamento até que toda a árvore esteja resolvida (YANG; RANNALA, 2012). A vantagem deste método é a sua rapidez, já que não precisa calcular a melhor árvore dentre várias possibilidades de acordo com um critério previamente estabelecido como nos métodos baseados em caracter (como a verossimilhança em ML). Aliás, os métodos baseados em distância constroem uma única árvore e, dependendo da divergência entre sequências e do modelo evolutivo utilizado, podem ter um baixo desempenho na construção de árvores a partir de sequências muito divergentes.

Em contrapartida, ML é um método baseado em caracter que utiliza o modelo probabilístico da máxima verossimilhança, ou seja, considera a probabilidade dos dados a partir de determinados parâmetros. Assim, a árvore filogenética resultante da análise por ML refere-se à árvore (distribuição dos *taxa*: dados) mais verossímil de acordo com os parâmetros de topologia da árvore, comprimento dos ramos e modelo evolutivo (YANG; RANNALA, 2012). Esse método, portanto, apresenta uma grande vantagem, pois utiliza métodos probabilísticos e parâmetros bem definidos que podem ser otimizados na busca das melhores árvores. Porém, o cálculo da verossimilhança bem como a busca no espaço da árvore para as diversas árvores que são geradas demandam bastante tempo e capacidade computacional, aumentando exponencialmente à medida que novos *taxa* são adicionados.

Finalmente, a árvore gerada por quaisquer um dos métodos citados pode ser avaliada em termos de confiabilidade por meio de um teste estatístico denominado *bootstrapping*, que testa se todo o conjunto de dados dá suporte à árvore ou se ela é apenas o produto aleatório de

árvores muito parecidas (BALDAUF, 2003). Para isso, posições aleatórias do alinhamento são geradas formando um novo conjunto de dados de igual tamanho, a partir do qual uma nova árvore é construída. Normalmente, esse processo é feito mil vezes (1.000 réplicas) e a quantidade de vezes em que o mesmo padrão de ramificação é encontrado nessas diferentes réplicas é expresso em porcentagem, como exemplificado na Figura 1.7-1 (abaixo).

A análise filogenética constitui uma importante ferramenta para o entendimento não só da evolução das espécies como também da diversificação biológica, até mesmo a nível molecular. Suas aplicações têm sido feitas em ramos tão diversos quanto na evolução das diferentes línguas (GROLLEMUND et al., 2015) e têm contribuído para o desenvolvimento de estratégias de combate à patógenos de evolução rápida como os vírus (BILLINGS et al., 2017). Dessa forma, a leitura e compreensão das árvores filogenéticas têm se tornado fundamental no campo das Ciências e, neste trabalho, a Filogenética foi empregada para a reconstrução da história evolutiva dos genes da família das miosinas em tripanossomatídeos.



**Figura 1.7-1 Três passos da análise de bootstrapping**

Fonte: adaptado de BALDAUF, 2003.

Nota: o grupo de dados é aleatoriamente amostrado com reposição para criar múltiplos grupos de dados hipotéticos do mesmo tamanho que o grupo original, (a) como mostrado réplicas 1 à 3. (b) Árvores individuais são construídas a partir de cada réplica (grupo hipotético). (c) Cada uma dessas árvores recebe um *score* para cada nó (agrupamento) em termos de quais grupos forma e com que frequência. No exemplo, o nó unindo a seqA e a seqB aparece em duas das três réplicas representadas, gerando um suporte *bootstrap* para esse grupo de 2/3 que corresponde à 67%.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Reconstruir a filogenia e realizar a caracterização funcional dos genes da família das miosinas de *Trypanosoma cruzi*.

### **2.2 Específicos**

- A. Avaliar a evolução dos genes da família das miosinas em *Trypanosoma cruzi* e reconstruir sua filogenia;
- B. Realizar o nocaute gênico dos genes da família das miosinas de *T. cruzi* para realização de ensaios funcionais comparativos com o parasito selvagem:
  - i. Análise da curva de crescimento;
  - ii. Análise da metaciclogênese;
  - iii. Análise da capacidade de infecção em células Vero;
  - iv. Análise da atividade endocítica por meio de ensaio de endocitose;
  - v. Análise ultraestrutural do parasito por meio de microscopia eletrônica de transmissão e varredura;
  - vi. Análise da atividade exocítica a partir do isolamento e quantificação de vesículas extracelulares.
- C. Verificar se o fenótipo da linhagem nocaute é revertido pela expressão ectópica do gene-alvo.

### 3 CAPÍTULO 1 – EVOLUÇÃO DA FAMÍLIA DAS MIOSINAS EM *T. cruzi*

Os dados referentes a este capítulo foram publicados no periódico Scientific Reports (Fator de Impacto 4.2; Qualis A1 na área CB-I) em 22 de janeiro de 2018. As tabelas e discussão suplementares estão disponíveis em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-017-18865-y>>

**Título:** Evolutionary analyses of myosin genes in trypanosomatids show a history of expansion, secondary losses and neofunctionalization.

**Autores:** Denise Andréa Silva de Souza, Daniela Parada Pavoni, Marco Aurélio Krieger, Adriana Ludwig.

**Resumo:** as miosinas são proteínas motoras que compõem uma família grande e diversificada com uma ampla gama de funções. Duas classes de miosina, I e XIII, foram previamente encontradas em tripanossomatídeos, com base principalmente nos estudos de *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei* e *Leishmania major*. Além destas miosinas, outras sete foram preditas no genoma de *T. cruzi*, mas foram consideradas “órfãs” por não possuírem ortólogos em nenhum outro eucarioto. Nossos resultados mostram que a grande variedade de miosinas de *T. cruzi* também está presente em algumas espécies mais próximas e também em *Bodo saltans*, um protozoário de vida livre que divergiu cedo na filogenia de Kinetoplastea. Sendo assim, as miosinas encontradas nesse grupo de organismos não devem ser consideradas órfãs. Propomos a classificação de um grupo de miosinas específico de cinetoplastídeos em uma nova classe, XXXVI. Além disso, nossa análise filogenética sugere que um maior repertório de genes de miosinas estava presente no último antepassado comum entre tripanossomatídeos e *B. saltans*, provavelmente resultante de eventos de duplicação. Esses genes têm sido predominantemente mantidos em sintenia em algumas espécies e as perdas secundárias explicam a distribuição atual. Também encontramos dois genes que foram claramente derivados de genes de miosinas, demonstrando que possíveis genes redundantes ou inúteis, em vez de simplesmente serem perdidos, podem servir como matéria-prima para a evolução de novos genes e funções.

# SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

## Evolutionary analyses of myosin genes in trypanosomatids show a history of expansion, secondary losses and neofunctionalization

Denise Andréa Silva de Souza<sup>1,2</sup>, Daniela Parada Pavoni<sup>1,2</sup>, Marco Aurélio Krieger<sup>1,2,3</sup> & Adriana Ludwig<sup>1,3</sup>

Myosins are motor proteins that comprise a large and diversified family important for a broad range of functions. Two myosin classes, I and XIII, were previously assigned in Trypanosomatids, based mainly on the studies of *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei* and *Leishmania major*, and important human pathogenic species; seven orphan myosins were identified in *T. cruzi*. Our results show that the great variety of *T. cruzi* myosins is also present in some closely related species and in *Bodo saltans*, a member of an early divergent branch of Kinetoplastida. Therefore, these myosins should no longer be considered “orphans”. We proposed the classification of a kinetoplastid-specific myosin group into a new class, XXXVI. Moreover, our phylogenetic data suggest that a great repertoire of myosin genes was present in the last common ancestor of trypanosomatids and *B. saltans*, mainly resulting from several gene duplications. These genes have since been predominantly maintained in synteny in some species, and secondary losses explain the current distribution. We also found two interesting genes that were clearly derived from myosin genes, demonstrating that possible redundant or useless genes, instead of simply being lost, can serve as raw material for the evolution of new genes and functions.

Myosins are important eukaryotic molecular motor proteins that bind actin filaments and are dependent of ATP hydrolysis<sup>1</sup>. They are related to several molecular processes, such as muscle contraction in metazoans, cytokinesis, cell migration, intracellular transport of molecular cargoes and organelles, and host cell invasion of apicomplexan parasites<sup>2,3</sup>.

Most myosin proteins consist of an N-terminal motor domain (myosin head domain - PF00063) responsible for actin binding and ATP hydrolysis, a neck region containing one or more IQ motifs that bind calmodulin or other members of the EF-hand family of proteins, and a C-terminal tail responsible for cargo binding and/or dimerization that may contain distinct domains<sup>4,5</sup>.

In the last 20 years, a number of works have addressed the diversity, classification and evolution of myosin genes using different approaches and datasets, revealing that myosins are a large and diversified gene family<sup>3,5-10</sup>. Due to this diversity, their classification is not trivial work and there is still not a consensus from the last works. Two most recent myosin superfamily works, Odronitz and Kollmar<sup>5</sup> and Sebé-Pedrós *et al.*<sup>9</sup>, used the phylogenetic relationship of myosin motor domains for classification. However, mainly due to taxon sampling differences, the authors defined a distinct number of classes (35<sup>5</sup> or 31 classes<sup>9</sup>, respectively). Most studies included several taxa, such as early branching eukaryotes of Kinetoplastida class from Excavata.

Kinetoplastids are a widespread and diverse group of flagellated protozoans that are free-living or parasites and comprise five orders: Trypanosomatida, Eubodonida, Parabodonida, Neobodonida and Prokinetoplastida<sup>11</sup>. They contain a characteristic structure called kinetoplast, which is a complex mitochondrial DNA inside of a single mitochondrion<sup>12</sup>. Within kinetoplastids, the most studied family is the Trypanosomatidae, which is composed mainly of monoxenous parasite species that infect invertebrates and of dixenous species that can be pathogenic to plants, animals and/or humans<sup>13</sup>. Among these, *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei* and *Leishmania spp.* are the

<sup>1</sup>Laboratório de Genômica Funcional, Instituto Carlos Chagas- ICC/Fiocruz-, PR, Curitiba, 81350-010, Brazil.

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia - ICC/Fiocruz-, PR, Curitiba, 81350-010, Brazil.

<sup>3</sup>Instituto de Biologia Molecular do Paraná, Curitiba, 81350-010, Brazil. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.A.K. (email: [mkrieger@fiocruz.br](mailto:mkrieger@fiocruz.br)) or A.L. (email: [adriludwig@gmail.com](mailto:adriludwig@gmail.com))

Gene	Gene ID	Gene size (bp)	Protein size (aa)	Domains
Myo1	TCDM_07314	3,498	1,165	Myosin motor domain (cd01378/PF00063); IQ motif; Unconventional myosin tail domain (Myosin TH1 superfamily domain - cl26987); WW domain (cd00201); FYVE_like_SF (cd00065); coiled-coil region
Myo13	TCDM_05821	3,177	1,058	Myosin motor domain (MYSc_Myo13, cd14875); coiled-coil region; two tandem UBA superfamily domains (cl21463)
MyoA	TCDM_09957	3,012	1,003	Myosin motor domain (cd00124); IQ motif; two coiled-coil regions
MyoB	TCDM_07433	3,357	1,118	Myosin motor domain (cd00124); coiled-coil regions; IQ motif
MyoC	TCDM_02877	3,304	1,167	Myosin motor domain (cd00124); coiled-coil region
MyoD	TCDM_07686	3,678	1,225	Myosin motor domain (cd00124); IQ motif
MyoE	TCDM_07686	3,288	1,095	Myosin motor domain (cd00124); two IQ motifs
MyoF	TCDM_08875	4,446	1,481	Myosin motor domain (cd00124); IQ motif; two coiled-coil regions
MyoG	TCDM_02016	3,669	1,222	Myosin motor domain (cd00124); TPH (pfam13868)
MyoH-derived	TCDM_02145	3,594	1,197	Short region of class XIII myosin motor domain (cd14875); TPH (ERM superfamily - cl25742); Neuromodulin_N superfamily (cl26511); SMC_N superfamily (cl25732); two coiled-coil regions

**Table 1.** Information of *T. cruzi* Dm28c myosin genes used as query in the BlastP searches.

causative agents of important neglected illnesses: Chagas disease, African sleeping sickness and leishmaniasis, respectively<sup>14</sup>.

Odrionitz and Kollmar<sup>5</sup> used several trypanosomatid genomes (*T. cruzi*, *T. brucei*, *T. vivax*, *T. congolense*, *L. major*, *L. infantum* and *L. braziliensis*) in their myosin phylogenetic tree. All of these species presented a Myo1 gene, representative of class I that is found in almost all organisms, and a Myo13 gene, classified as class XIII, a Kinetoplastida-specific class. Notably, *T. cruzi* has seven additional myosin genes (named MyoA, MyoB, MyoC, MyoD, MyoE, MyoF and MyoG) that were not classified, being considered “orphan” myosins since no orthologues were found in other species<sup>5</sup>. In Seb e-Pedr os *et al.*<sup>9</sup>, authors only included *L. major* sequences, and the trypanosomatid myosin classification remained the same.

With the sequencing of some *T. cruzi*-related species, we observed that *T. cruzi* “orphan” myosins are more widely distributed than previously thought, leading to questions about the evolution and function of these genes. Here, we present a deep evolutionary analysis of the myosin gene family from Trypanosomatidae, with exciting new data about expansion, diversification, loss and neofunctionalization of these genes in Kinetoplastida. Although the role of these genes remains to be addressed, this work is a starting point for functional studies.

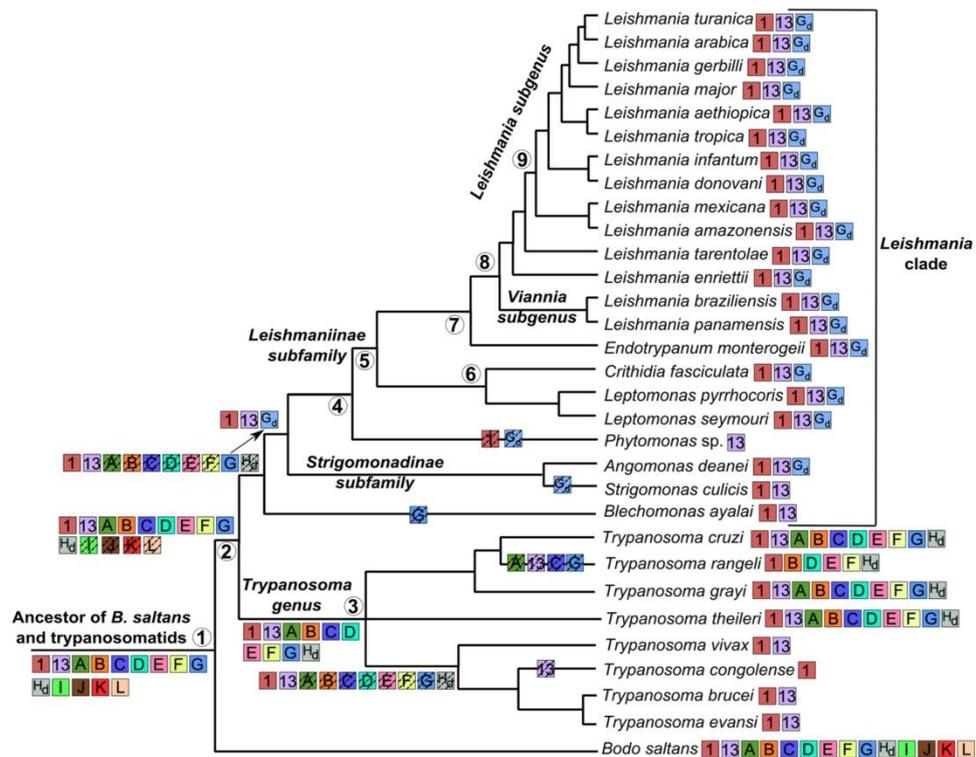
## Results and Discussion

**Evolutionary analyses of myosin genes.** For all myosins, we used the *T. cruzi* Dm28c amino acid sequences as query on BlastP searches and the main features of these genes are available in Table 1. We focus our main text on the evolutionary aspects, while a detailed result of protein domain searches of all sequences found in this work can be seen in Supplementary Table S1 together with a Supplementary Discussion. Supplementary Table S2 contains the information about the genome assemblies used in work and we provided all BlastP and synteny analysis results in the Supplementary Tables S3 to S22.

To understand the evolution of myosin genes, we compared their phylogenies to the known trypanosomatid phylogenetic relationships (Fig. 1). Trypanosomatid phylogeny can be separated into two major clades, one comprising the *Trypanosoma* genus, and the other, which we named the *Leishmania* clade, that encompasses *Blechnomonas ayalai*, *Phytomonas* sp. and the subfamilies Strigomonadinae and Leishmaniinae. The separation of these two groups is estimated at 231–283 million years ago (mya)<sup>15</sup>. *Bodo saltans*, a non-trypanosomatid free-living kinetoplastid also studied here, is clearly an early branch. All evolutionary scenarios presented here were hypothesized according to the available data and based on the most parsimonious picture. However, alternative explanations cannot be discarded, and the addition of new kinetoplastid species into the phylogeny could give a better view of the evolution of the myosin family.

**Myo1 protein is widely found in trypanosomatids.** Using TritypDB BlastP searches, we were able to find Myo1 orthologous genes in all analysed species. In addition, NCBI BlastP was performed to search for trypanosomatid sequences that are not available at TritypDB, and we found Myo1 sequences in *T. theileri*, *Angomonas deanei*, *Strigomonas culicis* and in *B. saltans*. Some species (*T. grayi*, *T. rangeli*, *T. theileri* and *B. saltans*) presented several significant hits, indicating that these species have a wide repertoire of myosin genes, similar to *T. cruzi*. The wide distribution of Myo1 in Kinetoplastida is expected since this class has the widest taxonomic distribution (being absent only in Viridiplantae and Alveolata), probably by being the first myosin to have evolved<sup>5</sup>. Additionally, Myo1 genes were found in previous works that sampled trypanosomatid species<sup>3,5,8,9</sup>. We found a conserved synteny (the same gene order in a chromosomal segment between species) for Myo1 genes in almost all species.

In general, Myo1 sequences presented conserved structure and motifs/domains composition, having a myosin motor domain in the N-terminal region, an IQ motif and an unconventional myosin tail domain (Myosin TH1 superfamily domain) with a WW and a FYVE\_like\_SF domain. This protein also contains a putative C-terminal coiled-coil forming region. *T. rangeli* presents a truncated protein; however, we cannot discard that it is an artefact of genome sequencing/assembly.

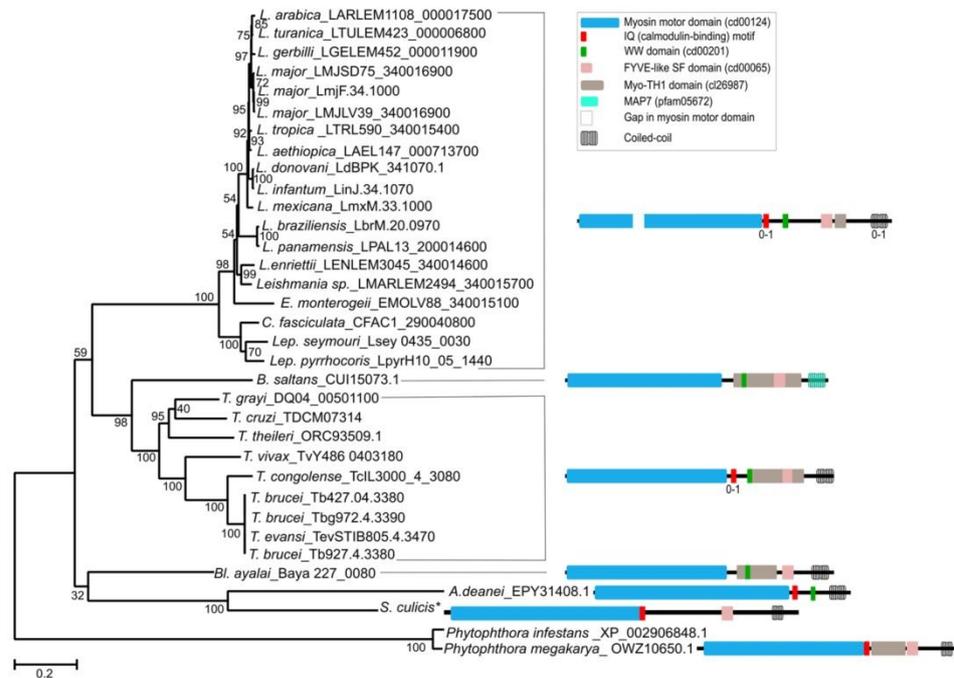


**Figure 1.** Schematic of phylogenetic relationships among different trypanosomatids employed in this study based on several works<sup>15,42–48</sup>. *Bodo saltans* was represented as outgroup. Coloured boxes represent the presence of different myosin genes. Hashed boxes represent possible gene loss events. Gd – MyoG-derived gene. Hd – MyoH-derived gene. Numbers in circles near some nodes are references to the divergence time estimates in mya (millions years ago), as inferred by Lukes *et al.*<sup>15</sup>: 1 – 463–695 mya; 2 – 231–283 mya; 3 – 96–105 mya; 4 – 118–170 mya; 5 – 52–96 mya; 6 – 30–63 mya; 7 – 31–65 mya; 8 – 25–54 mya; 9 – 9–23 mya. The branching is not drawn to scale.

Interestingly, *Phytomonas sp.* (isolates Hart1 and EM1) did not present any hit that corresponded to a Myo1 orthologue. It is not clear if this absence is due to genome assembly issues. Nonetheless, the absence in two independent genome assemblies supports the idea of gene loss. This last hypothesis is corroborated by the whole-genome analysis that indicates a minimized gene repertoire in *Phytomonas* EM1 and HART1 genomes<sup>16</sup>.

Excluding the kinetoplastids from NCBI BlastP, the best hits corresponded to sequences from the *Phytophthora* genus (~87% extension, 41% identity). In the Odronitz and Kollmar (2007) myosin phylogeny, trypanosomatid Myo1 sequences also grouped, with high support, with myosin from *Phytophthora* spp.<sup>5</sup>. Considering this close relation, we used two *Phytophthora* sequences to root the Kinetoplastida Myo1 tree (Fig. 2). Myo1 phylogeny presents low support for the basal nodes and some incongruities in relation to the species phylogeny. *B. saltans* is positioned closer to the *Trypanosoma* genus instead of being a basal branch. One hypothesis for this incongruity could be ancestral polymorphism followed by independent lineage sorting. However, the conserved synteny suggests the same copy gene was maintained from the ancestor. The clade containing *Bl. ayalai*, *S. culicis* and *A. deanei* is misplaced, but the bootstrap value is very low. The wrong positioning could be explained by long branch attraction, since the long branches of outgroups can frequently “attract” long branches of species to the base of the tree<sup>17</sup>. We can observe by the short branches among species that Myo1 genes from Leishmaniinae subfamily members are highly conserved; nevertheless, there was likely an accelerated evolutionary rate in the ancestor species that is represented by the long branch connecting this group.

In general, we can postulate that the Myo1 gene was present in the ancestor of kinetoplastids as a single copy gene and was conserved in almost all species, possibly due to an essential function, although little is known about the role of this gene in these organisms. In *T. brucei* bloodstream forms, Myo1 protein partially colocalizes with elements of the endocytic pathway and compartments containing internalized cargo, indicating its involvement in this pathway, being lethal in knockdown cells. However, in procyclic forms, the knockdown has no obvious effect on growth and morphology<sup>18</sup>. In contrast, in *L. donovani*, the protein Myo1 was not found by antibody recognition in either procyclic or amastigote forms, indicating that this gene is not expressed in this parasite<sup>19</sup>. Despite this finding, it is not reasonable, based on our phylogenetic analysis, that this myosin has remained conserved along the evolution without functional activity. It is possible that this gene is expressed in intermediate forms of the parasite’s cycle or expressed in such low amounts that it was not detected by the authors. In addition, we cannot presume that the function of Myo1 genes is the same in all trypanosomatids, mainly because some species demonstrate high divergence in the protein sequence, such as *A. deanei* and *S. culicis*. Moreover, the function of



**Figure 2.** Phylogenetic tree of kinetoplastid Class I myosin proteins. The evolutionary history was inferred by using the maximum likelihood method based on the JTT + G (4 categories) model. Bootstrap values from 1,000 replicates are shown next to the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The analysis involved 34 amino acid sequences. There were 1,185 positions in the final dataset. *Phytophthora* genus related myosins were used to root the tree. Sequences are identified by the name of species and the GenBank or TritypDB accession number. Asterisk represents the *S. culicis* Myo1 sequence obtained from the *S. culicis* TCC012E genome, contig coordinates AUXH01000328.1:350-4390. *T. rangeli* sequence (TRSC58\_03135) was not included in the phylogeny because it is very short. Protein domain architectures of main sequences are shown.

myosin genes is expected to differ among species with reduced or expanded repertoires of myosin genes. A deeper discussion concerning Myo1 domains can be found in the Supplementary Discussion.

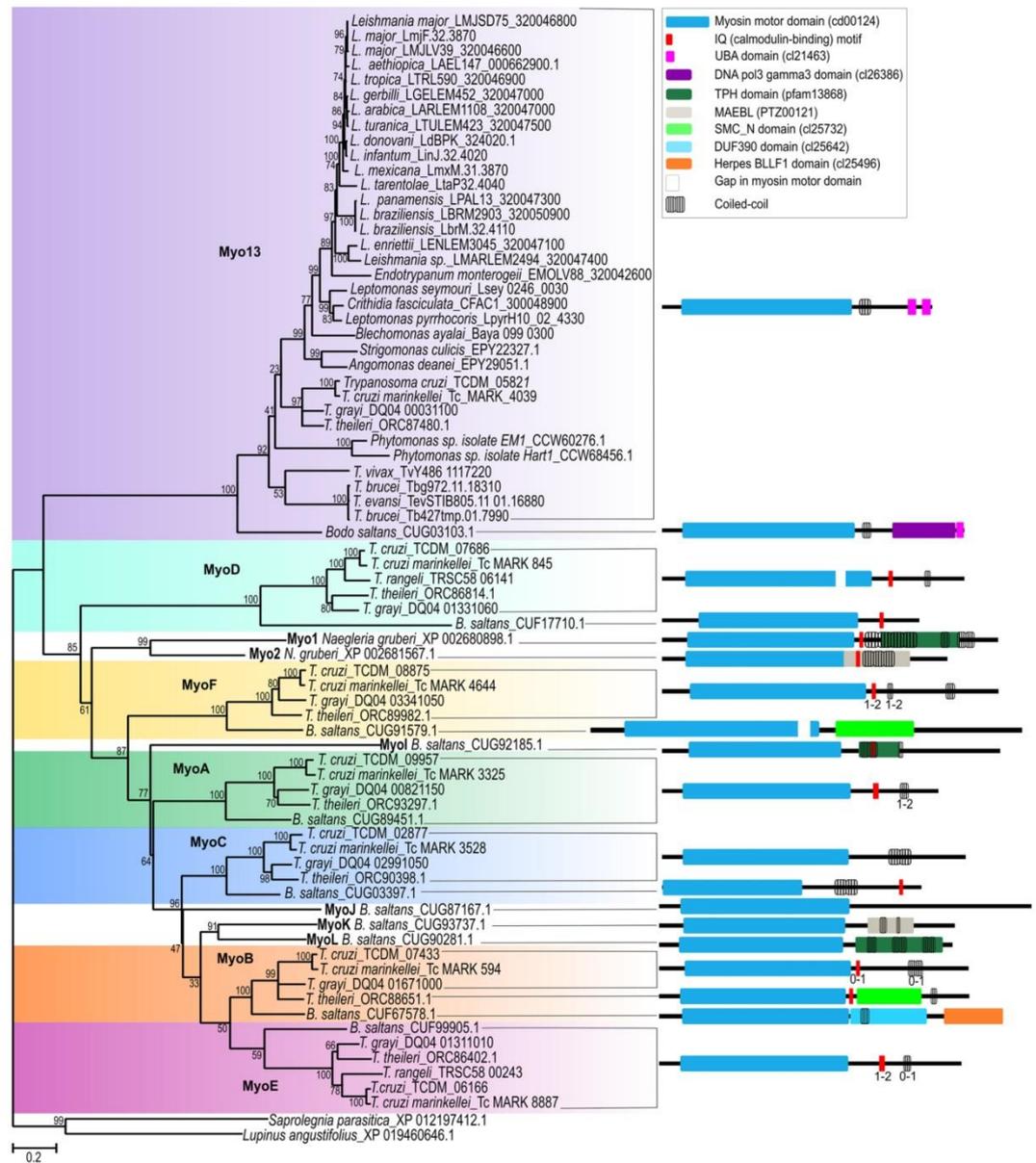
**Myo13 is a widely distributed myosin in kinetoplastids, and *T. cruzi* myosins MyoA, MyoB, MyoC, MyoD, MyoE and MyoF can no longer be considered “orphans”.** In the myosin global phylogeny presented by Odronitz and Kollmar (2007), it is clear that the *T. cruzi* orphan myosins MyoA, MyoB, MyoC, MyoD, MyoE and MyoF are related to Myo13 since they grouped together with high support<sup>5</sup>. We found orthologous sequences to these genes in some other species (Fig. 3).

The Myo13 gene has orthologues in almost all kinetoplastid species that were analysed and in conserved synteny. Sequences from most species are of similar size and domains composition, containing the myosin motor domain, followed by a coiled-coil region and two tandem UBA superfamily domains. For some species, additional less-significant domains were found. The Myo13 gene is absent in *T. congolense*, and no remnants of this gene were found in the syntenic region. It also appears absent in *T. rangeli* and the evaluation of the syntenic region for this species was not possible for Myo13 and all other genes, as the genome contains very small contigs.

MyoA gene was found in syntenic conserved regions relative to *T. cruzi* only in *T. grayi* and *T. theileri*. Unexpectedly, MyoA is also present in the distantly related species *B. saltans*, also in synteny. Most predicted proteins have a myosin motor domain, an IQ motif and two coiled-coil regions. No signal or remnants of the MyoA gene were found in the syntenic region from the other species analysed.

MyoB was also found in conserved synteny with the *T. cruzi* gene in *T. grayi*, *T. theileri* and *B. saltans*. The MyoB proteins contain the myosin head domain and can have a coiled-coil region and an IQ motif; other additional domains were also predicted for some species. *T. rangeli* has a truncated MyoB gene that could be due to poor genome assembly.

Interestingly, *B. saltans* presented four additional hits (CUG92185.1, CUG87167.1, CUG93737.1, CUG90281.1) in which reciprocal BlastP against *T. cruzi* showed MyoB as the best hit. Since these proteins do not cluster with other myosin clades in the phylogeny, they can be considered new myosin genes. The adopted nomenclature for these genes followed the nomenclature of kinetoplastid myosin genes (MyoI, CUG92185.1; MyoJ, CUG87167.1; MyoK, CUG93737.1 and MyoL, CUG90281.1; since MyoH was reserved for another gene that is discussed in a next section). These *B. saltans* proteins present the myosin head domain and two or three coiled-coil regions, and the MyoI protein has a predicted IQ motif. Overlapping the coiled-coil regions, some distinct and non-related domains were predicted with less significance.



**Figure 3.** Phylogenetic tree of class XIII myosin proteins. The evolutionary history was inferred using the maximum likelihood method based on the LG + G (4 categories) + I model. Bootstrap values from 1,000 replicates are shown next to the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The analysis involved 78 amino acid sequences. There were 621 positions of head domain in the final dataset. *Saprolegnia parasitica* (XP 012197412.1) and *Lupinus angustifolius* (XP 019460646.1) myosins were used to root the tree. Sequences are identified by the name of species and the GenBank or TritypDB accession number. Protein domain architectures of main sequences are shown.

The MyoC gene also has orthologues only in *T. grayi*, *T. theileri* and *B. saltans* in syntenic conserved regions compared to the *T. cruzi* gene. The predicted proteins have similar structures, containing a myosin motor domain and a coiled-coil region. The IQ motif was only predicted in *B. saltans* MyoC. No remnants of MyoC gene were found in the other species.

The MyoD gene was also found in *T. rangeli*, *T. grayi*, *T. theileri* and *B. saltans*. *T. grayi* and *T. theileri* MyoD genes are in syntenic conserved locations in relation to the *T. cruzi* gene, while the *B. saltans* gene location is not conserved. No remnants of MyoD were found in the syntenic regions from other species. *B. saltans* MyoD protein is shorter than the sequences from the other species, with a gap in the myosin head domain. IQ motifs and coiled-coil regions are predicted for some sequences.

*T. cruzi* MyoE orthologous genes were found in *T. rangeli*, *T. grayi*, *T. theileri* and *B. saltans*. Except for *T. rangeli*, the gene is in conserved synteny in all species. The predicted proteins have similar structure, containing a myosin motor domain and two IQ motifs. Additional coiled-coil regions are predicted in *T. rangeli* and *T. theileri*.

The MyoF gene also has orthologues in *T. grayi*, *T. theileri* and *B. saltans* in syntenic conserved regions compared to the *T. cruzi* gene. The proteins contain a myosin motor domain, one or two IQ motifs and two or three coiled-coil domains. A C-terminal truncated version of MyoF gene is also found in *T. rangeli*, encoding only part of the myosin head domain.

Excluding the kinetoplastids from NCBI BlastP searches and using all the queries (Myo13 and MyoA to MyoF), the two best hits correspond to sequences from the amoeba *Naegleria gruberi* (*Excavata*, *Heterolobosea* class) (named by us Myo1: XP\_002680898.1 and Myo2: XP\_002681567.1). In the myosin phylogeny presented by Odronitz and Kollmar<sup>5</sup>, these two *N. gruberi* genes were grouped inside of this kinetoplastid myosin clade. The following hits corresponded to myosin genes from different organisms, with alignments ranging from 40–70% of extension with approximately 35% identity. Due to the conservation of the myosin head domain and the huge number of myosin genes available at NCBI, numerous hits can be found with similar e-values. Some examples of hits in non-kinetoplastid species were cited in the Supplementary BlastP tables. However, except for the two *N. gruberi* myosins, the other sequences can be considered outgroup sequences since they do not locate inside the kinetoplastid myosin clade (Supplementary Figure S1).

To have a better view of evolution and relationship among all these genes, we inferred a phylogenetic tree based on the most conserved regions of the myosin head domain (621 positions), which is shown in Fig. 3. Two non-kinetoplastid sequences retrieved from BLAST in the other species were used as outgroup. The phylogeny shows significant support for most of the important clades, and the relationships among myosin groups are congruent to those presented by Odronitz and Kollmar<sup>5</sup>. Myo13 was the first clade to branch, followed by the MyoD clade, *Naegleria* myosins, MyoF clade, *B. saltans* MyoI, MyoA clade, MyoC clade, *B. saltans* MyoJ, MyoK and MyoL, and finally the MyoB and MyoE clades. This topology reflects the pattern of gene duplication that will be discussed later.

Analysing the relationships inside Myo groups, we observed some incongruities in the Myo13 clade in relation to the species tree (Fig. 1), such as wrong positioning of some *Leishmania* species and *Bl. ayalai*, the clustering of *Lep. pyrrocoris* with *C. fasciculata*, and in the base of the tree, *Trypanosoma* species were separated into two clades interspersed by *Phytomonas* sp. sequences. Different rates of evolution among sequences or long-branch attraction could explain these incongruities. The relationships found among sequences from MyoA to MyoF clades are in congruence with the species tree (except for the absence of sequences in some species), with *B. saltans* sequences at the base of clades, but the positioning of *T. theileri* changes in some groups. The positioning of this species in the *Trypanosoma* genus is not clear<sup>20–22</sup>.

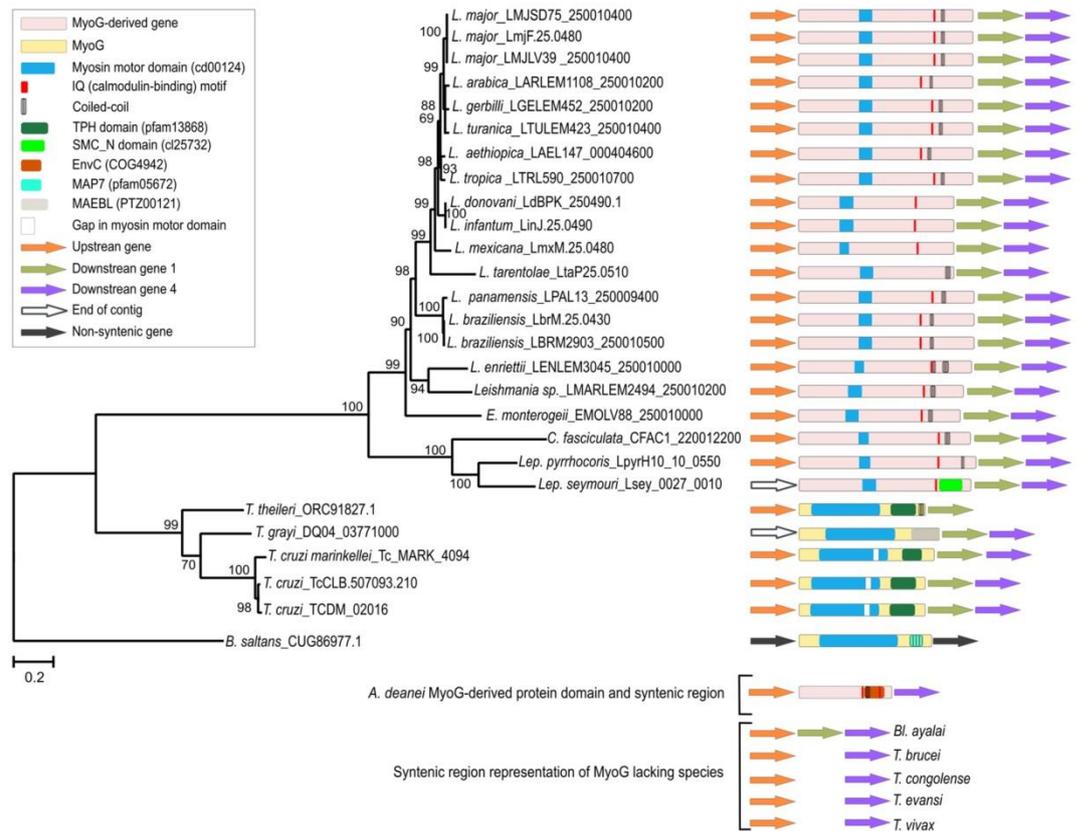
Class XIII myosins were described earlier as an exclusive kinetoplastid class comprising only Myo13, being the myosins MyoA to MyoF from *T. cruzi* considered “orphans”<sup>5</sup>. We found that MyoA, MyoB, MyoC, MyoD, MyoE and MyoF have orthologous genes in other kinetoplastid species that were not previously analysed, grouping together with Myo13 and, therefore, they were considered as Class XIII myosins (Fig. 3). In addition, we found that *B. saltans* has an even greater and unique repertoire of class XIII myosin genes, since the four extra genes (MyoI to MyoL) do not cluster with the other myosin clades and were positioned inside the phylogeny, before the last branching, suggesting that these sequences were also present in the ancestor species. Despite the clear relationship between MyoK and MyoL, their divergence suggests ancient duplication.

The positioning of *B. saltans* Myo13, MyoD, MyoF, MyoA, MyoC, Myo B and MyoE in the base of clades grouping with high support indicates that all these genes were present in the common ancestor of trypanosomatids and *B. saltans*, being transmitted vertically. Horizontal transfer among species could be discarded due to the synteny conservation. *Naegleria* myosin sequences do not group with any kinetoplastid myosin group, but they are clearly related, branching after MyoD separation. Independent secondary loss events should be postulated to explain the pattern of gene absence. Myo13 was lost in *T. congolense* and *T. rangeli*; the other class XIII myosin genes present very similar patterns of loss in the ancestor of the *T. vivax/T. congolense/T. brucei/T. evansi* lineage and in the ancestor of the *Leishmania* clade. The absence of any remnants of these genes in the syntenic regions supports the idea of long-term loss events. If we consider that the *T. rangeli* genome is complete, the MyoA and MyoC genes were also lost in this species.

The primary origin of Class XIII myosin is not clear since it lacks a significant phylogenetic relationship to other myosin genes. It could be a result of a very ancient horizontal transfer event from an unidentified source to an ancient ancestor species. Alternatively, the ancestor Class XIII myosin may have originated by mutations of a redundant duplicated myosin gene. The addition of myosin sequences from new species that sample both Kinetoplastida and Heterolobosea will certainly help to clarify this point.

Clues of class XIII myosin functions come mainly from *L. major* Myo13 studies, where it seems to be related to the assembly of flagellum<sup>19,23</sup>. Myo13 protein is expressed both in promastigote and amastigote parasite forms, besides its increased expression in promastigotes, where it localizes preferentially at the proximal region of the flagellum and colocalizes with paraflagellar rod (PFR) proteins<sup>23</sup>. In a later work, Katta *et al.*<sup>19</sup> showed that *L. major* Myo13 associates with actin and is involved in intraflagellar transport (IFT), since knockout cells presented reduced flagellar length and absence of PFR. LmMyo13 gene appears to be essential for parasite survival whereas the double mutant generated Myo13 ploidy<sup>19</sup>. Additionally, the IQ motif predicted in Myo13 genes was analysed in *Leishmania* and proven to be functional, with the binding of calmodulin regulating dimerization, motility and lipid binding of this molecular motor<sup>24,25</sup>. However, in *T. brucei* there is no indication of Myo13 function, since its knockdown in bloodstream forms had no effect on vesicle traffic or growth<sup>18</sup>.

**MyoG protein has evolved to a new protein in Leishmaniinae subfamily.** MyoG was considered an “orphan” myosin since it was previously found only in *T. cruzi*<sup>5</sup>. Using TritypDB and NCBI BlastP searches, we found orthologues in the closely related species *T. grayi* and *T. theileri* and in *B. saltans*. Analysis of *T. grayi* and *T.*



**Figure 4.** Phylogenetic tree of kinetoplastid MyoG and MyoG-derived proteins. The evolutionary history was inferred by using the maximum likelihood method based on the JTT + G (4 categories) + I model. Bootstrap values from 1,000 replicates are shown next to the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The analysis involved 28 amino acid sequences. There were 568 positions in the final dataset. *B. saltans* MyoG was used to root the tree. Sequences are identified by the name of species and the GenBank or TritypDB accession number. Protein domain architectures of sequences are shown together with a representation of their genomic context. Due to the high divergence, the *A. deanei* MyoG-derived protein was not included in the phylogeny.

*theileri* genomes indicated that the gene is in a syntenic conserved location in relation to the *T. cruzi* MyoG. The products of these genes present similar patterns of domains as *T. cruzi* MyoG.

For *Leishmania* and *Leptomonas* species, *C. fasciculata*, *E. monterogei* and *A. deanei*, the two best BlastP hits represent Myo13 and Myo1 genes. Interestingly, a third hit with a higher e-value was also found in these species. These hits correspond to genes annotated as “conserved hypothetical protein”. We then identify that these genes are in syntenic locations in relation to *T. cruzi* MyoG in all these species (Fig. 4). Their protein products have similarity to MyoG at the C-terminal region (last 400 aa) and in a short region (only 130 aa) of the motor domain. For the *A. deanei* sequence, however, the similarity is limited to a very short region at the C-terminal portion (approximately 240 aa) and there is no remnants of the myosin motor domain. Clearly, these sequences represent a MyoG-derived gene that had accumulated numerous mutations, almost losing the motor domain. The low conservation of the myosin head domain in MyoG-derived proteins likely prevented the authors from finding it in *L. major* in the previous works<sup>3,5,8,9</sup>. Additionally, the MyoG-derived proteins have a predicted coiled-coil region and an IQ motif.

*Bl. ayalai*, *T. brucei*, *T. evansi*, *T. vivax*, *S. culicis* and *Phytomonas sp.* only presented BlastP hits corresponding to Myo13 and Myo1, and *T. congolense* only to Myo1. To evaluate the possible loss event of MyoG in these species, we analysed the syntenic regions where the gene should be located and we found no remnants of MyoG in these species. Moreover, *T. brucei*, *T. evansi* and *T. congolense* also lost the downstream gene. *T. vivax* has a large region of missing data in this location; nonetheless, it is plausible that the loss of the genes occurred in the ancestor of these species. *T. rangeli* apparently lost the MyoG gene.

To better understand the evolution of MyoG and MyoG-derived genes, their conserved amino acid regions (568 positions) were used to infer a phylogeny (Fig. 4). The *A. deanei* MyoG-derived protein was not included due the high divergence that made the alignment non-confident. The MyoG tree shows high supported nodes, and its topology largely reflects the relationships of species (Fig. 1). *B. saltans* was the first species to branch, followed by the split of the *Trypanosoma* genus and *Leishmania* clade.

Excluding the kinetoplastids in the NCBI BlastP searches, the best hits were from several distinct organisms, including fungi, insects, fishes and others, presenting e-values around  $1E-60$  (approximately 30% identity covering 50–70% of query). Reciprocal BlastP showed that other myosins are more similar to these sequences than MyoG. This finding is in accordance with the data of Odronitz and Kollmar<sup>5</sup> since in the myosin phylogeny presented by these authors the *T. cruzi* MyoG does not group with good support to any other myosin. Thus, the kinetoplastid MyoG genes comprise a new class that we named Class XXXVI, a class that was not used in the recent works of myosin classification<sup>5,9</sup>.

The origin of MyoG in Kinetoplastida is unknown and could be a result of a very ancient horizontal transfer event or originated by mutations of a redundant duplicated myosin gene. In this case, we need to suppose that the gene underwent extremely high rates of mutations that make it impossible to track the relationship with its precursor. After the primary origin, it is presumed that the MyoG gene was vertically transmitted throughout trypanosomatids evolution. Although there is a discontinuity in the gene presence among species and absence of a conserved synteny region in *B. saltans*, the divergence among sequences does not support a horizontal transfer hypothesis. Nevertheless, considering the picture that we have now, we need to suggest several events of MyoG loss during species evolution: in the ancestor of *T. brucei*, *T. evansi* and *T. congolense*, in *T. rangeli*, in *Bl. ayalai*, in *Phytomonas sp.* and in *S. culicis*. The function of MyoG and MyoG-derived genes remains to be studied.

**MyoH-derived: a possible myosin-derived gene.** In Myo13 BlastP searches, we also found a less significant hit (e-value >  $E-10$ ) that caught our attention in *T. cruzi*, *T. rangeli* and *T. grayi*. In *T. cruzi*, this hit corresponded to the gene TCDM\_02145, annotated as “hypothetical protein”. It has a very short conserved region (only 144 aa) of the myosin domain (MYSc\_Myo13, cd14875). In the C-terminal portion of the protein, it contains a predicted TPH domain (pfam13868). As for MyoG, overlapping this domain there is a Neuromodulin\_N superfamily (cl26511), a SMC\_N superfamily (cl25732) and an ERM superfamily (cl25742) domains. Despite the similarity of domain composition between MyoG and this protein, their alignment on BlastP-2-sequences was not significant (e-value 0.087), suggesting they are not clearly related. However, the similarity between *T. cruzi* TCDM\_02145 and Myo13 proteins was significant (e-value  $3E-10$  on BlastP-2-sequences), but restricted to the short region of myosin head domain (25% identity and 46% similarity over 145 aa). The similarity was more evident when we compared the *T. rangeli* protein (TRSC58\_00453) with the Myo13 protein from *L. panamensis* (LPAL13\_3200047300), since we observed a good alignment in the first 430 aa (24% identity, 39% similarity, e-value  $3E-10$  on BlastP-2-sequences).

Due to the presence of a remnant of myosin head domain and the similarity with Myo13, we conclude that this gene had derived from an ancient class XIII myosin gene. However, unlike what occurred to MyoG-derived genes, we could not find any copy with an intact myosin head domain. Following the nomenclature of *T. cruzi* myosin genes, we assumed that the mother gene was an ancestral MyoH gene; thus, we called it MyoH-derived gene. We then conducted BlastP searches using the *T. cruzi* MyoH-derived protein as the query, and the gene was also found in *T. theileri* and *B. saltans* and synteny conservation was found for all MyoH-derived carrier species. When we excluded the kinetoplastids from NCBI BlastP searches, only one hit was found with low significance matching a non-myosin protein from *Branchiostoma belcher* (E = 0.89; XP\_019640798.1). Since MyoH-derived proteins accumulated higher divergence in relation to Myo13 and the other myosins (that could be considered outgroups), the alignment of sequences were very poor with low confidence; thus, we did not construct a MyoH-derived phylogenetic tree. The conversion of MyoH gene to MyoH-derived gene must have occurred in the ancestor of *B. saltans* and trypanosomatids. Interestingly, the MyoH-derived gene has the same pattern of loss as other class XIII myosins.

**Kinetoplastid myosins expansion, neofunctionalization and secondary losses.** Several molecular mechanisms are known to be involved in the creation of new gene structures, such as exon shuffling, gene duplication, retroposition, horizontal transfer, domestication of mobile elements, gene fusion/fission and *de novo* origination<sup>26</sup>. The class XIII myosins are clear results of gene duplications and at least 13 very ancient events need to be postulated to explain their diversification, showing that the expansion of this class had an impact on kinetoplastid evolution.

A possible scenario of gene duplications is postulated in Fig. 5A. The first duplication events (1 and 2) probably led to the MyoH and Myo13 genes, since they are related and Myo13 is the first clade to branch in the phylogeny. Those are followed by the duplications that generated the genes MyoD (3), the *Naegleria* myosin ancestor gene (4), MyoF (5), MyoI (6), MyoA (7), MyoC (8), MyoJ (9) and finally the duplication generating the ancestor of MyoK and MyoL and the ancestor of MyoE and MyoB (10). The order of duplications 11, 12 and 13 are hard to determine.

The positioning of *Naegleria* sequences in the phylogeny indicates that duplication events until this point must have occurred in the ancestor of Kinetoplastida and *Naegleria* species, as shown in Fig. 5B. In this scenario, Heterolobosea species have lost previously duplicated genes. Alternatively, to explain the phylogeny, all duplication events could have occurred in the ancestor of Kinetoplastida, but after its separation from the ancestor of Heterolobosea (Fig. 5C). Then, an ancient horizontal transfer event of a Class XIII myosin from a kinetoplastid to a *Naegleria* ancestor could explain this relationship.

Duplicated genes could have different fates, such as pseudogenization, conservation of function, subfunctionalization or neofunctionalization<sup>27,28</sup>. As the gene duplication generates functional redundancy, one of the copies is free to change, and the accumulation of mutations may transform the gene in a pseudogene that can be deleted after a long time<sup>28</sup>. We were not able to find any clear case of myosin pseudogene, corroborating the idea that the identified myosin gene deletions occurred long ago. Duplicated genes can otherwise be conserved with the same function, maintained by concert evolution or purifying selection, if there is an advantage in producing extra amounts of proteins or RNA products<sup>27,28</sup>. This seems not be the case for kinetoplastid myosins, since they

## Methods

Myosin amino acid sequences from the *T. cruzi* Dm28c strain were used as query on BlastP searches<sup>32</sup> against genomes available at TritypDB<sup>33</sup> up to July 2017. Information about genomes is available in Supplementary Table S2. BlastP searches against non-redundant protein sequences (nr) from GenBank<sup>32,34</sup> were also conducted to determine group sequences and some kinetoplastid sequences that are not available at TritypDB. Since the motor domain is a well-conserved domain of a diversified protein family, BlastP searches provide several significant hits (e-value cutoff of E-10). Thus, sequences were considered orthologues when genes were in the same genomic context (conserved syntenic location) and/or if the query sequences appeared as the first hit on a reciprocal BlastP.

Syntenic conservation was evaluated using the Genome Browser tool for species available at TritypDB. For those available at NCBI (Supplementary Table S2), genome sequences were downloaded and submitted to local TBlastN<sup>32</sup> using as query the myosin amino acid sequences or the amino acid sequences of upstream and downstream genes. The TcruziDm28cPB1 genome assembly (GCA\_002219105.1) was also used for some specific gene searches. A Perl programming code was used to retrieve desired sequences. If the myosin genes were not present/annotated, the syntenic regions where the genes were supposed to be present were analysed by BlastX against the annotated proteins (e-value cutoff E-5) searching for non-annotated ORFs or remnants of the genes.

CD-search on NCBI Conserved Domain Database (CDD)<sup>35</sup>, SMART (Single Modular Architecture Research Tool)<sup>36</sup> and ELM (The Eukaryotic Linear Motif resource)<sup>37</sup> were used to find protein domains and motifs using default parameters.

Amino acid alignments were obtained by PSI-Coffee<sup>38</sup>. Alignments were visualized and edited using the Genedoc 2.7 package<sup>39</sup>. To avoid loss of phylogenetic signal, phylogenies from the three groups were constructed separately. For Myo1 and MyoG, well-aligned regions from entire proteins were selected based on PSI-Coffee alignment scores. For class XIII myosins, well-aligned regions were also selected but restricted to the myosin head domain. Phylogenies for each protein group were constructed by maximum likelihood (ML) method, using the amino acid substitution model indicated by the Model Selection. Reliability of branches was accessed by bootstrap test with 1,000 replicates. Phylogenetic analyses were implemented in MEGA 7.0 software<sup>40</sup>.

To understand the evolution of myosin genes, we compared their phylogenies to the known trypanosomatid phylogenetic relationships. Thus, Fig. 1 represents a consensus phylogenetic tree of trypanosomatids modified from Ludwig and Krieger<sup>41</sup> to encompass the species used in this work and is based on well-supported trees from several studies. Positioning of *T. theileri* is inconclusive from works available up to now<sup>20–22</sup> and is represented as a polytomy. For evolutionary inferences, we adopted the most parsimonious assumptions; however, we did not discard alternative hypotheses and/or further updates with studies on additional species.

## References

- Vale, R. D. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* **112**, 467–480 (2003).
- Woolner, S. & Bement, W. M. Unconventional myosins acting unconventionally. *Trends Cell Biol.* **19**, 245–252 (2009).
- Foth, B. J., Goedecke, M. C. & Soldati, D. New insights into myosin evolution and classification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 3681–3686 (2006).
- Krendel, M. & Mooseker, M. S. Myosins: tails (and heads) of functional diversity. *Physiology (Bethesda)* **20**, 239–251 (2005).
- Odronitz, F. & Kollmar, M. Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species. *Genome Biol.* **8**, R196 (2007).
- Sellers, J. R., Goodson, H. V. & Wang, F. A myosin family reunion. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **17**, 7–22 (1996).
- Hodge, T. & Cope, M. J. A myosin family tree. *J. Cell Sci.* **113**, 3353–3354 (2000).
- Richards, T. A. & Cavalier-Smith, T. Myosin domain evolution and the primary divergence of eukaryotes. *Nature* **436**, 1113–1118 (2005).
- Sebé-Pedrés, A., Grau-Bové, X., Richards, T. A. & Ruiz-Trillo, I. Evolution and classification of myosins, a paneukaryotic whole-genome approach. *Genome Biol. Evol.* **6**, 290–305 (2014).
- Thompson, R. F. & Langford, G. M. Myosin superfamily evolutionary history. *Anat. Rec.* **268**, 276–289 (2002).
- Moreira, D., López-García, P. & Vickerman, K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 1861–1875 (2004).
- Vickerman, K. In *Biology of the Kinetoplastida* (eds. Lumsden, W. H. R. & Evans, D. A.) 1–34 (Academic Press, 1976).
- Kaufner, A., Ellis, J., Stark, D. & Barratt, J. The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasit. Vectors* **10**, 287 (2017).
- Nussbaum, K., Honek, J., Cadmus, C. M. Cv. C. & Efferth, T. Trypanosomatid parasites causing neglected diseases. *Curr. Med. Chem.* **17**, 1594–1617 (2010).
- Lukes, J., Skalický, T., Týč, J., Votýpka, J. & Yurchenko, V. Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. *Mol. Biochem. Parasitol.* **195**, 115–122 (2014).
- Porcel, B. M. *et al.* The streamlined genome of *Phytomonas* spp. relative to human pathogenic kinetoplastids reveals a parasite tailored for plants. *PLoS Genet.* **10**, e1004007 (2014).
- Telford, M. J. & Copley, R. R. Animal Phylogeny: Fatal Attraction. *Curr. Biol.* **15**, R296–R299 (2005).
- Spitznagel, D., O' Rourke, J. F., Leddy, N., Hanrahan, O. & Nolan, D. P. Identification and characterization of an unusual class I myosin involved in vesicle traffic in *Trypanosoma brucei*. *PLoS One* **5**, e12282 (2010).
- Katta, S. S., Tammana, T. V. S., Sahasrabudde, A. A., Bajpai, V. K. & Gupta, C. M. Trafficking activity of myosin XXI is required in assembly of *Leishmania flagellum*. *J. Cell Sci.* **123**, 2035–2044 (2010).
- Lima, L. *et al.* *Trypanosoma livingstonei*: a new species from African bats supports the bat seeding hypothesis for the *Trypanosoma cruzi* clade. *Parasit. Vectors* **6**, 221 (2013).
- Fraga, J. *et al.* Phylogenetic analysis of the *Trypanosoma* genus based on the heat-shock protein 70 gene. *Infect. Genet. Evol.* **43**, 165–172 (2016).
- Hamilton, P. B., Gibson, W. C. & Stevens, J. R. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. *Mol. Phylogenet. Evol.* **44**, 15–25 (2007).
- Katta, S. S., Sahasrabudde, A. A. & Gupta, C. M. Flagellar localization of a novel isoform of myosin, myosin XXI, in *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **164**, 105–110 (2009).
- Batters, C., Woodall, K. A., Toseland, C. P., Hundscheil, C. & Veigel, C. Cloning, expression, and characterization of a novel molecular motor, *Leishmania* myosin-XXI. *J. Biol. Chem.* **287**, 27556–27566 (2012).

#### 4 CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA MIOSINA TcMyoD EM *T. cruzi*

Manuscrito em preparação para ser submetido ao periódico BMC Microbiology (Fator de Impacto: 2.6; Qualis B1 na área CB-I) ou BMC Cell Biology (Fator de Impacto: 2.4; Qualis B1 na área CB-I) após finalização dos experimentos (RT-qPCR, ensaios com o parasito complementado, citometria de fluxo do ensaio de endocitose).

**Título:** Role of an unconventional myosin in organelle positioning in *Trypanosoma cruzi*.

**Autores:** Denise Andréa Silva de Souza, Ligia Cristina Kalb, Rafael Benedetti, Yasmin Ribeiro, Marco Aurelio Krieger, Christian Macagnan Probst, Stenio Perdigão Fragoso, Daniela Parada Pavoni.

**Resumo:** miosinas são proteínas motoras dependentes de actina e compõem uma grande e diversificada família, apresentando uma gama de funções em diversos eucariotos. O *Trypanosoma cruzi*, protozoário causador da doença de Chagas, apresenta nove miosinas em seu genoma, enquanto outros tripanossomatídeos, como *T. brucei* e *Leishmania major*, possuem apenas duas. Embora as miosinas presentes nessas duas espécies já tenham sido estudadas, em *T. cruzi* ainda não há informação funcional acerca das nove miosinas presentes nesse parasito. Nosso objetivo foi avaliar a função da miosina TcMyoD em formas epimastigotas de *T. cruzi* a partir de nocaute gênico, sendo que os resultados mostram o envolvimento desta miosina na via endocítica com o posicionamento perinuclear dos reservossomos. Além disso, a deleção de apenas um alelo diminuiu drasticamente a metaciclologênese neste parasito, embora o crescimento celular não tenha sido prejudicado. Ainda, a produção exacerbada de vesículas extracelulares pelos parasitos-nocaute pode estar envolvida no mecanismo de reparo da membrana plasmática que parece comprometida com a formação de embolhamento (*blebbing*) de membrana. Esta é a primeira evidência do envolvimento de uma miosina no posicionamento de organelas em tripanossomatídeos e aponta para interessantes e importantes funções das miosinas em *T. cruzi*.

**Role of an unconventional myosin in organelle positioning in *Trypanosoma cruzi***

Denise Andréa Silva de Souza, Ligia Cristina Kalb, Rafael Kessler, Rafael Benedetti, Yasmin Ribeiro, Marco Aurélio Krieger, Christian Macagnan Probst, Stênio Perdigão Fragoso, Daniela Parada Pavoni

Instituto Carlos Chagas/Fiocruz, Instituto Carlos Chagas/Fiocruz-PR, Rua Prof. Algacyr Munhoz Mader 3775, Cidade Industrial, 81350-010 Curitiba, PR Brazil

**Corresponding author:** dppavoni@fiocruz.br; d.andreass@gmail.com

**Running title:** Role of *T. cruzi* myosin

**Key Words:** *Trypanosoma cruzi*, myosin, single allele knockout, organelle movement

## ABSTRACT

Myosins are actin-dependent motor proteins forming a large and diverse family with a wide range of functions in almost all eukaryotes. *Trypanosoma cruzi*, a protozoan parasite that causes Chagas' disease, has nine myosins in its genome, while other trypanosomatids, such as *T. brucei* and *Leishmania major*, have only two. Although the myosins present in these two species have already been studied, in *T. cruzi* there is still no functional information about any of the nine myosins present in this parasite. We aimed to evaluate the function of TcMyoD myosin in epimastigote forms of *T. cruzi* by gene knockout. The results show the involvement of this myosin in the endocytic pathway with the perinuclear positioning of the reservosomes. In addition, the deletion of only one allele drastically impaired metacyclogenesis in this parasite, although cell growth was normal. Furthermore, the exacerbated production of extracellular vesicles by knockout parasites may be involved in the mechanism of plasma membrane repair that seems compromised with the formation of membrane blebblings. This is the first evidence of the involvement of a myosin in organelle positioning in trypanosomatids and points out to interesting and important functions of myosins in *T. cruzi*.

## INTRODUCTION

Myosins are actin-dependent motor proteins responsible for many functions in the cell, since cell migration and adhesion until signal transduction and transport of a variety of cargoes (KRENDEL; MOOSEKER, 2005; WOOLNER; BEMENT, 2009). There are 79 myosin classes according to the most comprehensive study using 7,852 myosin sequences from 929 species (KOLLMAR; MÜHLHAUSEN, 2017b). Despite this variety, they all share a common motor domain at N-terminal portion of the protein (ODRONITZ; KOLLMAR, 2007). This motor domain has an ATPase activity, necessary for the movement of the myosin along actin filaments whereas the C-terminal portion presents a great variation responsible for the different cargoes that each myosin transport (KRENDEL; MOOSEKER, 2005).

The conventional myosins (class II) are well studied and characterized. They form large bipolar filaments by their tail homo-oligomerization and are processive generating a power stroke known to produce movement in muscles (WOOLNER; BEMENT, 2009). However, the unconventional myosins, that do not form filaments (although can dimerize) and comprise all the other classes of myosins, have some members being described as binding to membranes or proteins, but their vast majority remains uncharacterized (WOOLNER;

BEMENT, 2009). Unconventional myosins have been related to intracellular trafficking like vesicle transport in endocytosis (TITUS, 2000) and secretory pathways (BOND et al., 2011) and organelle motility (SEABRA; COUDRIER, 2004), being found in almost all eukaryotic cells, including protozoan parasites. Recently, the work from De Souza et al. (2018) had analyzed the evolution of myosin family from kinetoplastids, an early divergent group of eukaryotes, based in the myosins found in *Trypanosoma cruzi* (DE SOUZA et al., 2018).

*T. cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) is a protozoan parasite that causes Chagas disease, also known as American trypanosomiasis, infecting 7 million to 8 million people worldwide (WHO, 2013). The disease was discovered in 1909 by Carlos Chagas that described the clinical aspects as well identified the protozoan and its vector – Triatominae insects (CHAGAS, 1909). *T. cruzi* has a complex life cycle involving two distinct hosts (insect and mammalian) and passing through four stages of complete morphological and physiological changes. It requires major changes in gene expression besides it is almost exclusively post-transcriptional (CLAYTON, 2002). Since the sequencing of the TriTryp genomes (*T. cruzi*, *T. brucei* and *Leishmania major*) in 2005, it was possible to find that *T. cruzi* has nine myosins whereas *T. brucei* and *L. major* have only two. Now, after the genome sequencing of the free-living protozoan *Bodo saltans*, an early-divergent branch of the Kinetoplastida Class, analysis regarding the evolution of parasitism (JACKSON et al., 2016) as well as the analysis of the losses, gains, and neofunctionalization within the myosin gene family in this group became possible, and the results bring an exciting view of its importance for kinetoplastids (DE SOUZA et al., 2018).

Here we investigated the function of an unconventional myosin from *T. cruzi*, named TcMyoD, in epimastigote parasites by gene knockout. We found that the knockout of one allele of TcMyoD is sufficient to impair metacyclogenesis. Interestingly, the parasites also show exacerbated exocytosis and unusual positioning of the reservosomes.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Domain and motif predictions**

Based on the protein sequence extracted from TritypDB (ASLETT et al., 2009), identification number TCDM\_07686, we performed a CD-search on NCBI Conserved Domain Database (CDD) (MARCHLER-BAUER et al., 2017), SMART (Single Modular Architecture Research Tool) (LETUNIC; DOERKS; BORK, 2012) and ELM (The Eukaryotic Linear Motif resource) (DINKEL et al., 2016) to find protein domains and motifs using default parameters.

### **Epimastigote culture**

Dm28c clone from *Trypanosoma cruzi* was used for all experiments (CONTRERAS et al., 1988). Epimastigotes were cultured at 28°C in liver infusion tryptose (LIT) medium supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum (FBS), subcultured in every 3-4 days to  $1 \times 10^6$  epimastigotes  $\text{mL}^{-1}$  to maintain the culture at exponential phase.

### **Construction of gene knockout cassette by fusion PCR**

The 5'- and 3'- intergenic regions (IR) of TcMyoD gene from Dm28c clone (TCDM\_07686) were amplified to construct the knockout cassette for the deletion of the gene by homologous recombination. The primers used were listed in Table 1 (for IR\_5' F1 and R1, 586 bp; for IR\_3' F3 and R3, 608 bp; Figure 1-A).

The resistance gene (neomycin phosphotransferase) was amplified from the vector pTc2KO-neo (Supplementary Figure 1) (PAVANI et al., 2016) with about 20 extra nucleotides complementary at the 5' end overlapping the 5' - and 3' - sequences of the intergenic regions.

The three amplicons were purified by magnetic beads (AMPure XP, Agencourt) and linked by fusion PCR, without the addition of primers, in the proportion 1 resistance gene : 5 each IR (or 1:10) generating a knockout cassette with 2.9 kb size. To obtain ~10  $\mu\text{g}$  of the knockout cassette for transfection, several PCRs were performed with the addition of the primers F1 and R3 to the fusion PCR reaction, diluted 1:50 or 1:100 in the final volume reaction. Purification of the final reaction was performed prior the transfection procedure.

Primers	Sequences (5'-3')
F1	GGGGGGGGCCATTCTTCCATTTCTCATTCC
R1	AGTGCGGAAAGAGAAATGGACGGTATTGACGAGTCCTCAGGGTC
F3	ACATTGAACAGAAATTTAACATGCCCATCAGGGGGTGTAACTTCCTTTCC
R3	GGGGGGGGGTGCATGCATTTACAATCCG
F2	GTCGACCGTCCATTTCTCTTTCC
R2	CCTCTGATGGGCATGTAAATTCTGT
TcMyoD_F-attB1	<b>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGAAGTGGGCAGTAGCGA</b>
TcMyoD_R-attB2	<b>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCACAAGTCGCTGACCTTCC</b>
F4	CAAATGAGCACCAGATGAAAAAAC
R4	GAACCTGCGTGCAATCCATC
TcL9-F	CCTTCACTGCCGTTTCGTTGGTTTG
TcL9-R	ATGCGAGAGTGCCGTGTTGATGGT
TcMyoD-3001-F	CAGGCCGTGGCTGCGGAAGA
TcMyoD-3164-R	CCACCACGGCAAGACGTCGCA

**Table 1. Oligonucleotides used in PCR.** List of primers for constructing knockout cassette and confirmation of knockout by conventional PCR and RT-PCR and primers for gene cloning by Gateway system with FLAG tag. Underlined sequences are complementary to the selection marker amplified from pTc2KO-neo plasmid used in fusion PCR. Bold sequences are the attB sites for Gateway cloning to construct the pTcGW-MyoD-hyg-flag plasmid used to restore TcMyoD gene in single-knockout parasites.

## Transfection

The transfection of wild-type parasites was performed by electroporation of  $1 \times 10^7$  early-log epimastigotes with 10  $\mu\text{L}$  of the purified neomycin knockout cassette (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) in 100  $\mu\text{L}$  of Human T Cell Nucleofector™ Solution (Amaxa AG, Cologne, Germany). This material was loaded in a Nucleofector™ cuvette, placed at the Nucleofector™ 2b Device (Amaxa) and submitted to an electric pulse with the program U-33. The mock control was prepared as above but without the addition of genetic material. After electroporation, the parasites were placed in LIT medium containing 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  penicillin and streptomycin and incubated at 28°C. After 24 hours, was added 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of G418 drug. After 4 or 5 weekly passages in selection medium, G418-resistant parasites were selected, whereas no growth was

observed in mock control. The G418-resistant population was then transfected as mentioned above with a hygromycin knockout cassette, but we were not able to select double mutant parasites. The G418-resistant parasites were defined as single-knockout, sKO, after the confirmation of the single gene deletion.

### **Complementation of sKO parasites generating sKO-pTcMyoD parasites**

For complementation of the sKO parasites, the TcMyoD gene was amplified by PCR using primers TcMyoD\_F-attB1 and TcMyoD\_R-attB2 (Table 1) that contain *attB1* and *attB2* sites for recombination and cloning into pDONR 221 vector from the Gateway cloning system, generating an entry clone following the manufacturer's instructions (Thermo Scientific, MA, USA). The entry clone was then transferred to pTcGW-hyg-flag, generating a pTcGW-MyoD-hyg-flag expression vector. The expression vector pTcGW-hyg-flag is a modified version of the pTcGW 1.1 series of Gateway expression vectors for constitutive expression and selection in *T. cruzi* (BATISTA et al., 2010; KUGERATSKI et al., 2015).

sKO parasites were transfected as described before with 8 µg of pTcGW-MyoD-hyg-flag and selected with 500 µg mL<sup>-1</sup> hygromycin B. The expression and localization of TcMyoD in the complemented (add-back) cells were analyzed by Western blot and immunofluorescence microscopy by anti-FLAG recognition. The TcMyoD complemented parasites (sKO-pTcMyoD) were tested for cell proliferation, differentiation and endocytosis assays.

### **Growth curve**

For assessment of growth, epimastigotes were cultured at 1 ×10<sup>6</sup> parasites mL<sup>-1</sup> as described above. The sKO parasites were cultured in LIT medium supplemented with 500 µg mL<sup>-1</sup> of G418 drug, and sKO-pTcMyoD parasites were culture with 500 µg mL<sup>-1</sup> of G418 plus 500 µg mL<sup>-1</sup> of hygromycin. Wild-type parasites (WT) were cultured without the addition of drugs. Cultures were counted in a Z Coulter Counter (Beckmann Coulter, CA, USA) every 24 hours for 9 days. The growth curve was performed in three independent experiments (in triplicate).

### **Cell differentiation**

*T. cruzi* metacyclic tripomastigotes were obtained from epimastigotes under *in vitro* metacyclogenesis as previously described (BONALDO et al., 1988; CONTRERAS et al., 1985). Briefly, 1×10<sup>6</sup> epimastigotes mL<sup>-1</sup> were cultured for 5 days as described above.

Parasites were centrifuged and resuspended in triatomine artificial urine medium (TAU; 190 mM NaCl, 17 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 8 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0) and washed twice in TAU medium. Parasites were then resuspended in 1 mL TAU medium at  $5 \times 10^8$  epimastigotes mL<sup>-1</sup> and incubated at 28°C for two hours. Then, the cell suspension was inoculated (at  $5 \times 10^6$  parasites mL<sup>-1</sup>) in culture flasks containing TAU3AAG medium (TAU medium supplemented with 10 mM L-proline, 50 mM sodium glutamate, 2 mM sodium aspartate and 10 mM glucose) pre-warmed at 28°C and incubated for 72 hours, when metacyclic trypomastigotes were counted using a Neubauer chamber. The differentiation experiments were performed in two independent experiments (with three technical replicates/experiment).

### **DNA extraction**

Total DNA was purified from at least  $1 \times 10^8$  mutant and wild-type epimastigotes at exponential phase, using TELT buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 62.5 mM EDTA, pH 9.0, 2.5 M LiCl and 4% Triton X-100) as described elsewhere (BATISTA et al., 2010). The quality and quantity of the purified DNA was analyzed in NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) spectrophotometer.

### **RNA extraction and reverse transcription**

Total RNA from  $1 \times 10^8$  epimastigotes was extracted with RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions, with an additional on-column DNase digestion step. One microgram of RNA was used for reverse transcription as previously described (BATISTA et al., 2010). Briefly, first-strand cDNA was obtained by mixing 1 µg of total RNA and 1 µM oligo dT and incubated for 10 min at 70°C. Then, to this reaction was added 4 µl of Improm-II buffer (Promega, Madison, USA), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM of each dNTP, 40 U RNaseOUT (Invitrogen) and 2 µl of Improm-II reverse transcriptase (Promega) in a final volume of 20 µl and incubated for 2 h at 42°C.

### **Mutant parasites confirmation by PCR and RT-qPCR**

Single-allele knockout parasites, sKO, were confirmed by conventional PCR using primers F4 (anneals upstream to the region where knockout cassette was placed) and R4 (anneals to the neomycin resistance gene) (Table 1, Figure 1-A) to confirm the correct place of insertion, and primers F2 and R2 to amplify the knockout cassette with the neomycin resistance gene. DNA from wild-type parasites was used as a negative control. PCR reactions were performed with 200 µM of each dNTPs (Invitrogen), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 1x

Taq polymerase buffer (Invitrogen) and 0.05U/ $\mu$ L Taq polymerase (Invitrogen), 0.2  $\mu$ M of each primer and 4 ng/ $\mu$ L of DNA. The reaction was performed under the following conditions: 94°C for 5 min and 35 cycles of 94°C for 30 s, 55°C for 30 s and 72°C for 1.5 min, with a final extension at 72°C for 5 min. The amplicons were analyzed in 1% agarose gels stained with ethidium bromide.

For RT-qPCR, cDNA from sKO, sKO-pTcMyoD and wild-type epimastigotes were used. Real-time PCR assays were performed in LightCycler<sup>®</sup> 96 real-time PCR system (Roche). For a 20 $\mu$ l reaction mixture, we added 10ng of cDNA and the recommended concentration of SYBR green master mix (Applied Biosystems). The specific primers were added at concentrations of 300 nM each (TcMyoD-3001-F and TcMyoD-3164-R were used to amplify the myosin D tail, and primers TcL9-F and TcL9-R were used to amplify the ribosomal L9 protein for normalization, Table 1). PCR conditions were as follows: 10 min at 95°C, followed by 45 cycles of 95°C for 10 s, 58°C for 20 s and 72°C for 30 s. Thermal dissociation confirmed that the reaction generated a single amplicon. The results were analyzed by  $\Delta\Delta$ Ct method and samples were normalized to TcL9 gene and compared against wild-type epimastigotes data.

### **Transmission Electron Microscopy**

Epimastigotes in exponential growth phase ( $2-3 \times 10^7$  cells mL<sup>-1</sup>) were harvested by centrifugation and washed two times with 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) and fixed for at least 2 hours with 2.5% glutaraldehyde in the same buffer. The samples were then washed in the same buffer and post-fixed for 1 hour with 1% osmium tetroxide diluted in 0.1 M cacodylate buffer. Samples were dehydrated in graded acetone and embedded in EMbed 812 resin (EMS, Hatfield, PA, USA). Ultra-thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate before examination in JEOL JEM-1400 Plus transmission electron microscope at 80kV.

For the morphology and size of extracellular vesicles released by wild-type and mutant epimastigotes, the purified vesicles were placed in formvar grids and negatively stained with 2% uranyl acetate and examined in examination in JEOL JEM-1400 Plus transmission electron microscope at 80kV.

### **Scanning Electron Microscopy**

Epimastigotes in exponential growth phase ( $2-3 \times 10^7$  cells mL<sup>-1</sup>) were harvested by centrifugation and washed three times with 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2). The parasites

were adhered to 0.1% poly-L-lysine-coated coverslips for 20 minutes, washed once with the same buffer and fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer at room temperature for 1 hour. Then, parasites were washed three times in the same buffer and post-fixed for 1 hour with 1% OsO<sub>4</sub> diluted in the 0.1 M cacodylate buffer. The cells were washed again for three times in the same buffer and dehydrated in an ascending ethanol series for 10 minutes each, dried by the critical point method and mounted on SEM tubes, coated with a 20 nm-thick gold layer, and examined using a Jeol JSM 6010 Plus-LA scanning electron microscope at 20kV.

### **Endocytosis assay**

The endocytosis assay was performed as described earlier (BATISTA et al., 2015). Briefly, mutants (sKO, sKO-pTcMyoD) and wild-type epimastigotes were subjected to a nutritional stress in PBS for 15 min at 28°C or 4°C (negative controls). The parasites were incubated for 30 min at 28°C or 4°C with Alexa Fluor 633-conjugated to transferrin or Alexa Fluor 488-conjugated to albumin (50µg/mL for both) to allow uptake of the labelled proteins. Then the cells were prepared for immunofluorescence microscopy and flow cytometry.

To assess the colocalization of transferrin and albumin with cruzipain the parasites were fixed for 30 min with 4% paraformaldehyde, permeabilized for 5 min with 0.5% Triton in PBS and incubated with the specified antibodies in immunofluorescence microscopy section.

### **Immunofluorescence microscopy**

A total of  $5 \times 10^6$  cells were washed twice in PBS, fixed for 30 minutes at room temperature with 4% paraformaldehyde, washed twice and adhered to 0.1% poly-L-lysine-coated coverslips for 20 minutes at room temperature. Then, cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 5 min, washed with PBS and blocked for 1 hour with 1.5% bovine serum albumin in PBS. Cells were incubated for 1 hour with anti-cruzipain monoclonal antibody (1:100 dilution) (BATISTA et al., 2014). After washing, samples were incubated with Alexa Fluor 488 or 594-conjugated rabbit antimouse IgG at a 1:600 dilution. Nuclear and kinetoplast DNA were stained with DAPI. After extensive washes, the coverslips were mounted onto glass microscope slides with mounting medium containing Prolong<sup>TM</sup> Gold Antifade Mountant (Invitrogen). The samples were examined using a Leica inverted microscope DMI6000B with deconvolution software AF6000 (Leica Microsystems, Mannheim, Germany) at the Microscopy Facility of the Institute Carlos Chagas, Fiocruz-PR.

Acquired images were processed to improve contrast using Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems Incorporated, USA).

### **Extracellular vesicles (EVs) analysis**

Epimastigotes in exponential growth phase (total of  $1 \times 10^9$  cells) were cultured in LIT medium, harvested by centrifugation and washed three times with DPBS. Then, parasites were cultured in RPMI medium free from FBS during 2 hours at 28°C under 5% CO<sub>2</sub>. Conditioned medium containing fresh secreted EVs was centrifuged to remove parasites and filtered through a 0.45 µm membrane to avoid parasite and cellular debris contamination. EV isolation was performed by two ultracentrifugation steps of 100,000 xg at 4°C for 2 hours each centrifugation. EV sample preparations were resuspended in DPBS. Dimensional characterization was performed by nanoparticle tracking analysis (NTA) using NanoSight LM10 (Malvern). The detection and tracking analysis was made by NTA Software version 3.1. The evaluation was performed on 5 technical replicates.

### **Statistics**

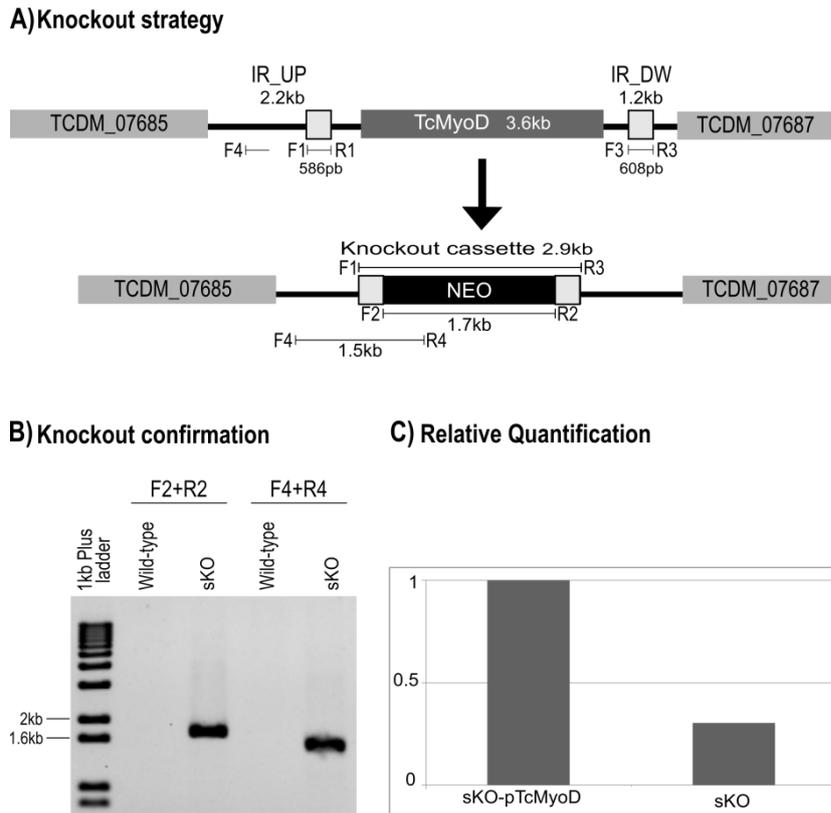
Data was analyzed using Graph Pad Prism version 6. Unpaired Student's t-test was used for comparison between wild-type and mutant parasites. The  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## **RESULTS**

### **Generation of TcMyoD knockout parasites**

In this work, we successfully knocked out one allele of TcMyoD gene, as shown in Figure 1-B, where the knockout cassette is correctly placed at TcMyoD locus, generating a 1.5 kb amplicon (primers F4 and R4). Also, the resistance of the parasites to the G418 drug is validated by the amplification of the neomycin resistance gene by the primers F2 and R2 (1.7 kb). Several attempts of knocking out the second allele were not successful.

We also confirmed the deletion and restoring of the TcMyoD gene by RT-qPCR, as shown in Figure 1-C. sKO-MyoD, single-knockout parasites, showed reduced amount of TcMyoD mRNA when compared to the complemented parasites sKO-pTcMyoD (add-back).

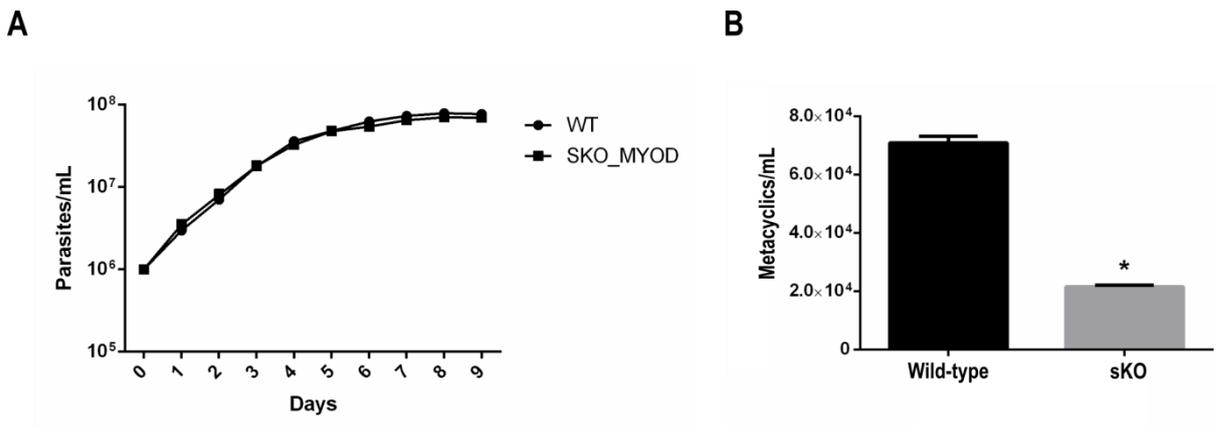


**Figure 1 - Validation of KO cassette insertion and RT-qPCR of TcMyoD in sKO and sKO-pTcMyoD parasites.**

(A) Schematic representation for the construction of the TcMyoD knockout cassette and the expected genomic loci of sKO parasites. IR\_UP (Intergenic Region Upstream) and IR\_DW (Intergenic Region Downstream) to the TcMyoD locus. Identification number from the Tritryp database for genes up and downstream to the TcMyoD gene are given inside the light gray boxes. Primers F (Forward) and R (Reverse) are also shown in their annealing regions. (B) 1% agarose gel electrophoresis of wild-type and sKO parasites. F2+R2 amplicon from the neomycin resistance gene (1.7kb) and F4+R4 amplicon related to the correct insertion of the knockout cassette in the TcMyoD locus (1.5kb). (C) Analysis of the TcMyoD gene expression relative to the complemented-knockout sKO-pTcMyoD and single-knockout sKO parasites using SybrGreen<sup>®</sup>. The results were analyzed with the  $\Delta\Delta C_t$  method, normalized to TcL9 gene and compared against sKO-pTcMyoD considered as 1.

## TcMyoD knockout hinders metacyclogenesis

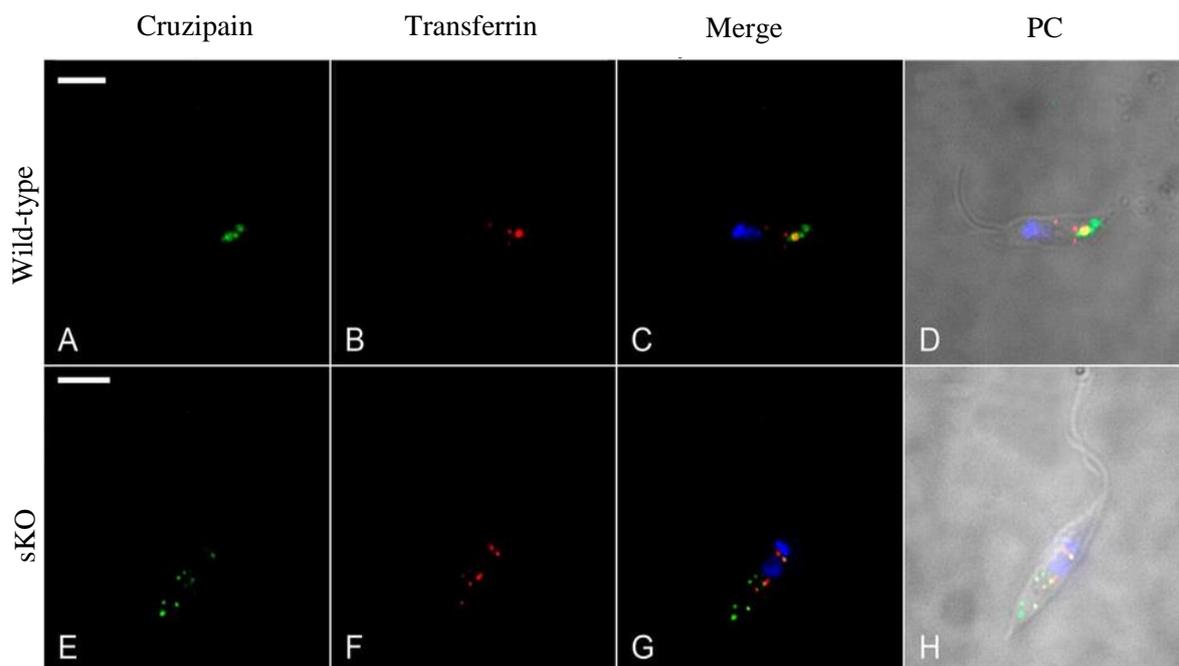
To evaluate the basic processes in the life cycle of the parasites, we performed a growth curve and metacyclogenesis for wild-type and sKO parasites. Despite the normal proliferation of sKO parasites (Figure 2-A), their differentiation from epimastigotes to metacyclic trypomastigotes was severely compromised (4-fold decrease, Figure 2-B).



**Figure 2. Epimastigotes proliferation and differentiation into metacyclic trypomastigotes after 72 hours of metacyclogenesis.** (A) Growth curve of epimastigotes (mean  $\pm$  standard deviation of three independent experiments with three replicates each) and (B) *In vitro* metacyclogenesis (mean  $\pm$  standard deviation of two independent experiments with three replicates each). \* $p < 0.05$ .

### TcMyoD knockout parasites show alterations on endocytic pathway

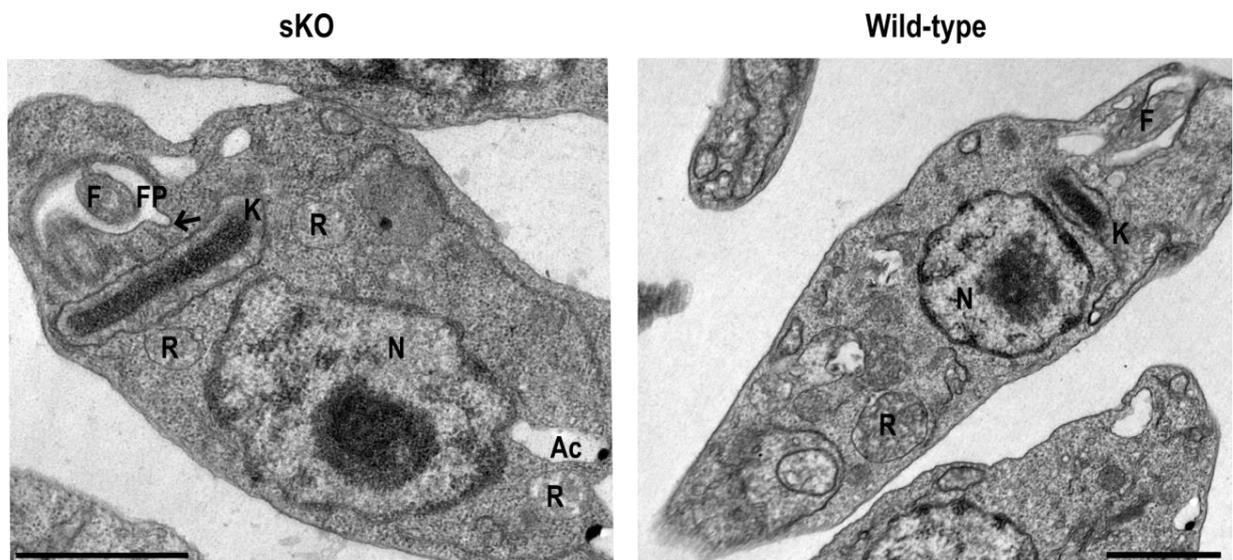
Transferrin and albumin uptake was used as tracers of the endocytic pathway of the parasite. Transferrin and albumin are predominantly ingested via the cytostome/cytopharynx complex and at less extent at the flagellar pocket (PORTO-CARREIRO et al., 2000). In a natural situation, both proteins end up at the reservosomes in the posterior region of the cell, what could be observed in wild-type parasites. In sKO epimastigotes, transferrin accumulates at reservosomes in the perinuclear region (Figure 3 and Supplementary figure 2).



**Figure 3. The effect of TcMyoD single allele knockout in transferrin endocytosis in *T. cruzi* epimastigotes.** (A-D) Wild-type epimastigotes. (E-H): sKO epimastigotes. In green: antibody against cruzipain (a reservosome marker) and detected with anti-mouse IgG conjugated with Alexa Fluor-488. In red: transferrin conjugated to Alexa Fluor-633. In blue: DAPI staining of nucleus and kinetoplast. PC: phase contrast. Note colocalization at the cell posterior and perinuclear, indicating that transferrin localizes to the reservosomes. Scale bars = 5  $\mu$ m.

## Reservosome positioning is altered in TcMyoD knockout parasites

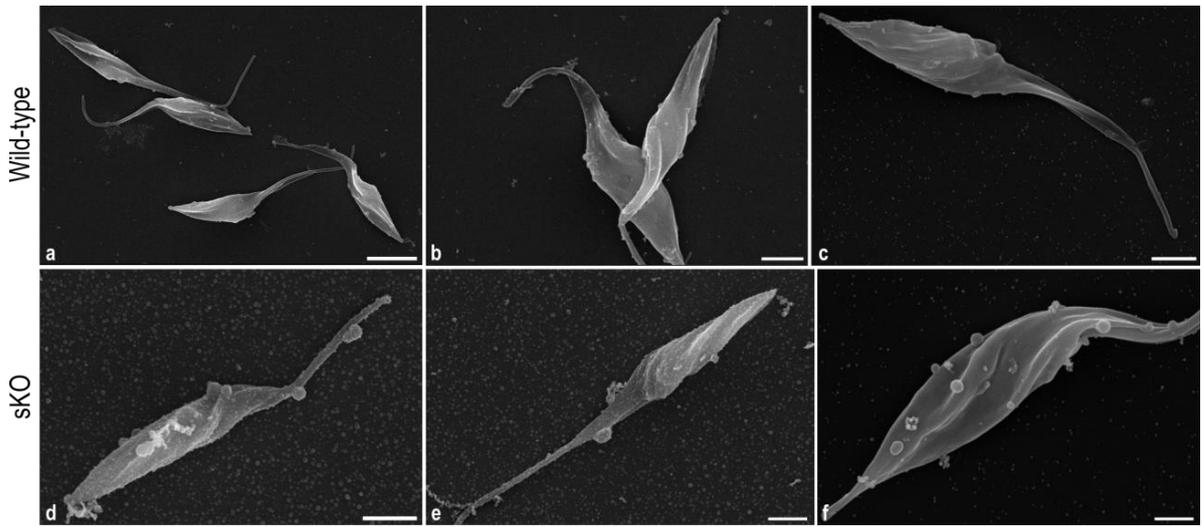
As could be seen in immunofluorescence images from endocytosis assays, the reservosomes in sKO parasites are located in a perinuclear region, instead of being located at the posterior region of the parasite's body (Figures 3 and Supplementary Figure 2). The transmission electron microscopy image also shows this altered pattern of reservosome positioning (Figure 4).



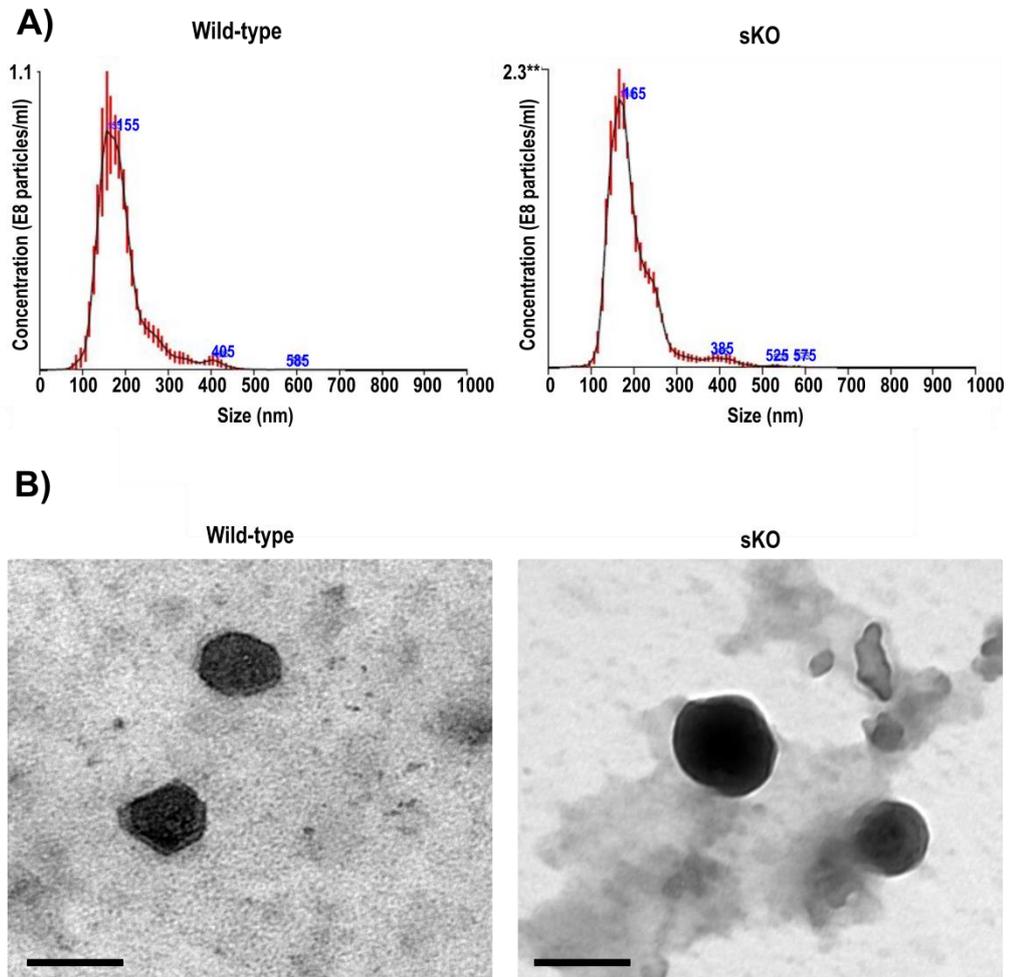
**Figure 4. Reservosomes positioning in sKO and wild-type epimastigotes.** Transmission electron microscopy showing reservosomes (R) at a perinuclear region, between kinetoplast (K) and nucleus (N) in sKO parasites. Acidocalcisomes (Ac) and flagellum (F) are shown. Invagination of the membrane of flagellar pocket (FP) showed to be a common phenotype in these mutant parasites (arrow) when compared to wild-type cells. Bar: 1  $\mu$ m.

## TcMyoD knockout parasites have an exacerbated exocytosis

Given the results indicating the TcMyoD involvement in the endocytic pathway we looked after if this myosin could be also have a role in exocytosis, a process associated with the flagellar pocket. Mutant parasites showed an exacerbated production of vesicles (Figure 5), shedding twice the amount of vesicles secreted by wild-type epimastigotes, although their size and morphology are similar (Figure 6).



**Figure 5. Vesicles covering the *T. cruzi* epimastigotes' surface.** Scanning electron microscopy showing vesicles shed by wild-type (a-c) and sKO (d-f) epimastigotes. Bars: (a) 5  $\mu\text{m}$  and (f) 1  $\mu\text{m}$ ; others, 2  $\mu\text{m}$ .



**Figure 6. Average size and concentration and morphology of vesicles shed by wild-type and sKO epimastigotes.** (A) The vesicles were analyzed by Nanoparticle Tracking Analysis. Average size (nm) and concentration ( $10^8$  particles/mL). Red error bars indicate  $\pm 1$  standard error of the mean. (B) Transmission electron microscopy showing the size and morphology of vesicles released by wild-type and sKO parasites. Bars: 200 nm. \*\* $p < 0.001$ .

## DISCUSSION

This work represents the first attempt to analyze the myosin function in the American trypanosome *T. cruzi*. After the sequencing of *T. cruzi* genome, nine genes coding for myosins were identified. Surprisingly, the same genes are also present in *Bodo saltans*, an early-branching kinetoplastid, but the majority was lost in a great number of Trypanosomatidae family members, like *T. brucei* and *L. major* (DE SOUZA et al., 2018).

Considering the evolution of this gene family in Kinetoplastida, is instigating the preservation of a greater repertoire of myosins in *T. cruzi* when compared to other trypanosomatids. This raises some questions as if all these genes are transcribed and translated, if all the protein products are functional and present different functions, if they transport different cargoes or if has some redundancy in function.

Published works along the years concerning the actin-myosin system in trypanosomatids suggests an importance of this transport system in these organisms, even with the actin fibers never being visible at microscopy suggesting they are very transient or scarce (CEVALLOS et al., 2011; DE MELO et al., 2008; KALB SOUZA et al., 2013; SAHASRABUDDHE; BAJPAI; GUPTA, 2004).

The gene of the unconventional myosin D from *T. cruzi*, member of myosins' class XIII, has 3,678 bp encoding a 1,225-aa protein. Only the myosin motor domain (cd00124) in the N-terminal region and an IQ motif could be predicted to this protein. *T. rangeli*, *T. grayi*, *T. theileri* and *B. saltans* also have a MyoD gene (DE SOUZA et al., 2018).

The knockout of one allele of TcMyoD provided some insights regarding the function of this gene in *T. cruzi*, since its indicative phenotype linked this myosin to the endocytic pathway. The role of TcMyoD in endocytosis was investigated directly by a microscopic analysis of the uptake of transferrin conjugated with Alexa-633 (Figure 3). Transferrin was internalized by the cells and reach, at least, the bottom of the cytopharynx, since its location near to the nucleus is consistent with the cytopharynx location. Surprisingly, the transferrin co-localizes with cruzipain at a perinuclear region instead of being present at the reservosomes normally localized at the posterior region of the epimastigotes' body. This suggests that TcMyoD actually affects the proper localization of the reservosomes.

In an *in vitro* assay, during the reversal of metacyclogenesis, when metacyclic trypomastigotes differentiate to epimastigotes, reservosomes forms at a perinuclear region and then migrates towards the posterior region of the cell (SANT'ANNA; SOUZA; CUNHA-E-

SILVA, 2004). Our data suggests that the TcMyoD could be responsible for the transport and localization of the reservosomes at the posterior region of the cell, since the immunofluorescence assay showed the co-localization of cruzipain and transferrin at the perinuclear region (Figure 3 and Supplementary figure 2), data in agreement with the reservosomes found between the nucleus and the kinetoplast in the electron micrograph (Figure 4). Reservosomes are also found in their proper location, probably due to gene expression of the second allele that was not knocked out in these parasites. However, few molecules of transferrin co-localize with the reservosomes at the posterior region of the cell, maybe due to the proximity of the misplaced reservosomes to the site of the endocytic tracer uptake, the cytostome/cytopharynx complex (Supplementary figure 2).

However, the transport of organelles by myosins supposes the existence of an actin track. Although actin filaments (actin-F) have never been described for trypanosomatids until now, in *T. cruzi* a set of proteins associated with the assembly, treadmilling and nucleation of the actin are present and theoretically sufficient to promote the assembly and disassembly of actin filaments (DE MELO et al., 2008). The difficulties in observing actin-F maybe due to filament instability, deficient assembly, and accentuated severing of the actin track (DE MELO et al., 2008). These characteristics could be useful in the manner that cells manage the actin, like actin dynamics, for organelle movement. Actin dynamics refers to the rapid polymerization and depolymerization of actin filaments, extending the actin transport track while myosin moves, a phenomenon described for the transport of pigment granules and lysosomes in *Xenopus melanophores* (Semenova *et al.*, 2008). Some myosins have already been described to directly stimulate actin dynamics (CRAMER, 2008). In our study, the lack of the TcMyoD could result in the impairment of actin dynamics and therefore the retention of the reservosomes in their nascent position.

Given this, in epimastigote forms the TcMyoD seems to be related exclusively to the positioning of the reservosomes, since the positioning of other organelles is normal. However, during metacyclogenesis, this myosin could be recruited to the transport of other organelles, since cell remodeling is essential in metacyclogenesis (BRENNAND; RICO; MICHELS, 2012), and this could be the reason of the impairment of the metacyclogenesis in the sKO parasites.

Another reason could be an inefficient storage of the endocytosed material and even the storage of molecules from the secretory pathway. Proteomic analyses of the reservosomes composition have shown that this organelle accumulates a great number of proteins with a

variety of functions such as proteases like cruzipain and serine carboxypeptidase, RNA-binding proteins (GUERRA-SLOMPO et al., 2012), and surface proteins (BAYER-SANTOS et al., 2013) that may be essential to support metacyclogenesis.

A recent study demonstrated that in *T. cruzi* autophagy is induced during metacyclogenesis, with the increasing number of acidic and hydrolytic vesicles, with the colocalization of the Atg8.1 (Autophagy-related protein) and endocytic tracer (DQ-BSA, dequenched bovine serum albumin) at the posterior region of the cell (VANRELL et al., 2017). Also, the loss of the cytotome-cytopharynx complex during metacyclogenesis and the loss of endocytic activity (VIDAL et al., 2016) may be a result of the autophagy degradation which requires the participation of reservosomes.

Myosins and actin have been described to participate in autophagic processes, since the initiation and expansion of the phagophore to the autolysosome formation and degradation (KRUPPA; KENDRICK-JONES; BUSS, 2016). Our results, with the single knockout of the TcMyoD gene, could be related to the impairing of the metacyclogenesis by interfering with the autophagy process, since the wrong positioning of the reservosomes can affect their fusion with autophagosomes and thus to the formation of the autolysosomes and subsequent degradation. The link of this myosin with autophagy in *T. cruzi* needs further investigation.

Besides the involvement of TcMyoD in the endocytic system, it also appears to be related to the exocytosis, since the single-allele knockout presents exacerbated production of exocytic vesicles (Figures 5 and 6). Eukaryotic cells secrete vesicles in a constitutive or regulated way, and for different purposes (cell signaling, membrane repair, immune modulation, angiogenesis, neurotransmission, and even promoting tumor cell invasion) (SHIFRIN et al., 2013). Constitutive exocytosis is a constant process, necessary for the maintenance of the plasma membrane and other basic cellular functions, while in regulated exocytosis vesicles are released upon a stimuli that triggers their fusion with the plasma membrane (PORAT-SHLIOM et al., 2013). Parasites are able to secrete vesicles in the constitutive and regulated way, also using this pathway to release vesicles loaded with virulence factors to modulate the immune system of their hosts (TORRECILHAS et al., 2012).

In our work, epimastigotes carrying a single deletion of the TcMyoD gene present twice the number of vesicles released by wild-type epimastigotes. Although the biogenesis of these vesicles has not been assessed by us, the presence of membrane blebbings suggests that the membrane tension could be impaired. The tension in the plasma membrane promoted by

actin have already been associated with exocytosis in other organisms (PAPADOPULOS, 2017), and the lower expression of TcMyoD in the single knockout parasites could be associated by the TcMyoD acting as a membrane tether and/or actin cross-linker in *T. cruzi*. It is also possible that the plasma membrane could be damaged by this impaired membrane tension, being exocytosis a well-known mechanism of plasma membrane repair, since the fusion of the vesicles helps to seal the damaged area (BLAZEK; PALEO; WEISLEDER, 2015; DRAEGER et al., 2014; NORMA W. ANDREWS; PATRICIA E. DE ALMEIDA; MATTHIAS CORROTTE, 2015).

The association of the TcMyoD in exocytosis needs a deep investigation, since the hypotheses presented here lacks experimental evidence like the presence of a cortical actin network and the function of myosins as tethers in *T. cruzi* have never been reported. However, the presence of a cortical actin network closely associated with subpellicular microtubules in *Leishmania* (SAHASRABUDDHE; BAJPAI; GUPTA, 2004) is an interesting finding that raises the possibility that *T. cruzi* could also have a similar actin distribution, since these parasites are closely related.

The function of TcMyoD in the positioning of reservosomes is an interesting finding pointing to the function of this myosin as a processive motor or capable to induce the rapid actin polymerization promoting the movement of these organelles by actin dynamics. This is the first report of a myosin being associated with organelle positioning in trypanosomatids. Also, the impairment of metacyclogenesis together with the lack of motility of the reservosomes points out to a deficient autophagy process essential for the parasite's differentiation.

Taken together, these data demonstrated that TcMyoD plays an essential role in reservosome positioning in epimastigote forms of *T. cruzi* and provided the first demonstration of the involvement of a motor protein in organelle movement in trypanosomatids with an important impact on metacyclogenesis.

### **Acknowledgements**

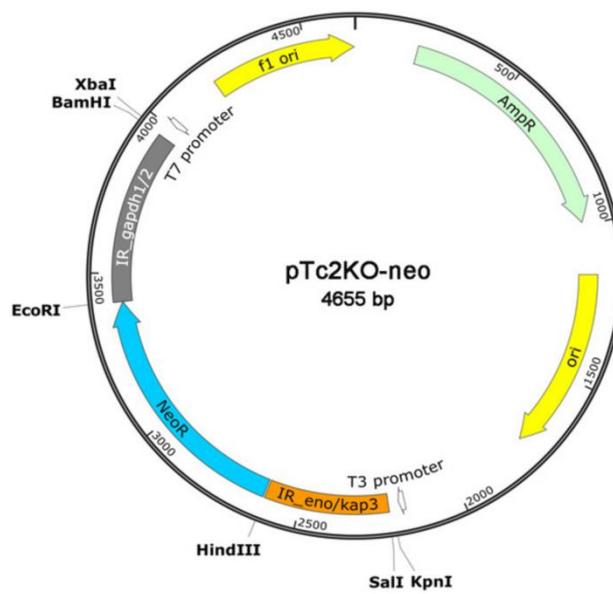
The authors thank Beatriz Borges, Luz Helena Villamizar, Rosiane Valeriano for technical assistance. The authors also thank the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS-FIOCRUZ for use of its facilities (Platform RPT07C - Confocal and Electron Microscopy-PR and Platform RPT08L – Flow Citometry). Also, this work was supported by CNPq, CAPES and Fiocruz.

## REFERENCES

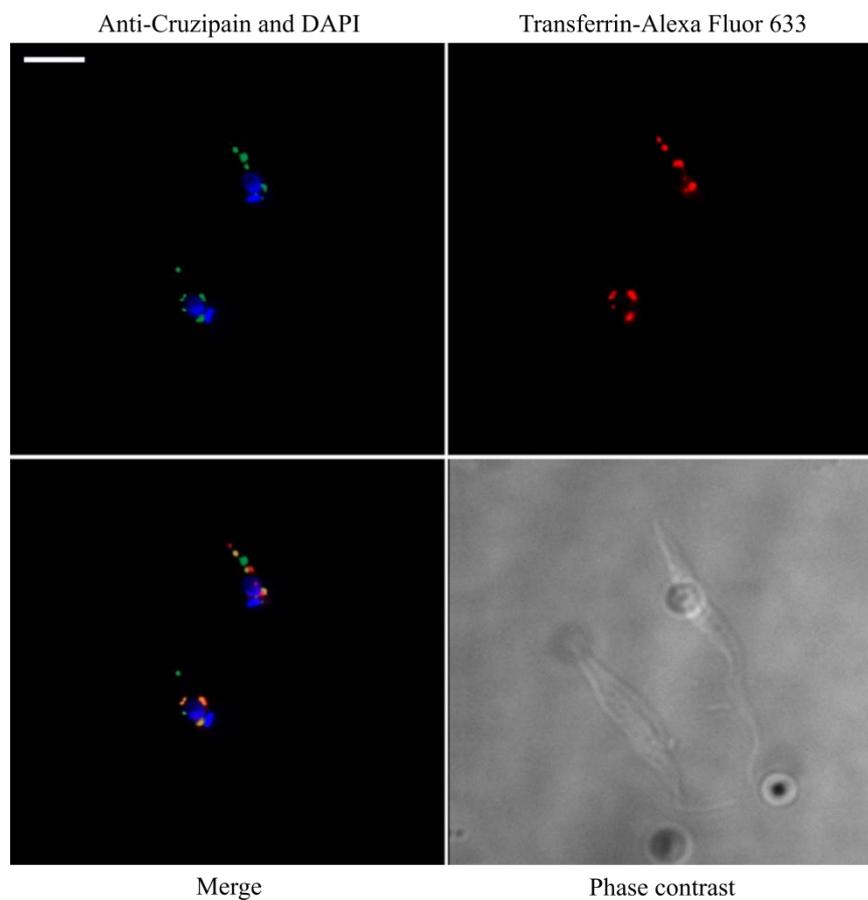
- ASLETT, M. et al. TriTrypDB: A functional genomic resource for the Trypanosomatidae. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. SUPPL.1, p. 457–462, Jan. 2009.
- BATISTA, C. M. et al. MAb CZP-315.D9: An antirecombinant cruzipain monoclonal antibody that specifically labels the reservosomes of trypanosoma cruzi epimastigotes. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.
- BATISTA, C. M. et al. Trypanosoma cruzi intracellular amastigotes isolated by nitrogen decompression are capable of endocytosis and cargo storage in reservosomes. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–18, 2015.
- BATISTA, M. et al. A high-throughput cloning system for reverse genetics in Trypanosoma cruzi. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 259, 2010.
- BAYER-SANTOS, E. et al. Expression and cellular trafficking of GP82 and GP90 glycoproteins during Trypanosoma cruzi metacyclogenesis. **Parasites & vectors**, v. 6, p. 127, 2013.
- BERRIMAN, M. et al. The Genome of the African Trypanosome Trypanosoma brucei. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 416–422, 2005.
- BLAZEK, A. D.; PALEO, B. J.; WEISLEDER, N. Plasma Membrane Repair: A Central Process for Maintaining Cellular Homeostasis. **Physiology**, v. 30, n. 6, p. 438–448, 2015.
- BONALDO, M. C. et al. Cell-substrate adhesion during Trypanosoma cruzi differentiation. **The Journal of cell biology**, v. 106, n. 4, p. 1349–58, Apr. 1988.
- BOND, L. M. et al. Myosin Motor Proteins are Involved in the Final Stages of the Secretory Pathways. **Biochemical Society Transactions**, v. 39, n. 5, p. 1115–1119, 2011.
- BRENNAND, A.; RICO, E.; MICHELS, P. A. M. Autophagy in Trypanosomatids. **Cells**, v. 1, n. 4, p. 346–371, 2012.
- CEVALLOS, A. M. et al. Trypanosoma cruzi : Multiple actin isoforms are observed along different developmental stages. **Experimental parasitology**, v. 127, p. 249–259, 2011.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n.2, p. 159-218, 1909.
- CLAYTON, C. E. Life without transcriptional control ? From fly to man and back again. **The EMBO journal**, v. 21, n. 8, p. 1881–1888, 2002.
- CONTRERAS, V. T. et al. In vitro differentiation of Trypanosoma cruzi under chemically defined conditions. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 16, n. 3, p. 315–327, 1985.
- CONTRERAS, V. T. et al. Biological aspects of Dm28c clone of Trypanosoma cruzi after metacyclogenesis in chemically defined media. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, n. 1, p. 123–133, 1988.
- CRAMER, L. Organelle Transport: Dynamic Actin Tracks for Myosin Motors. **Current Biology**, v. 18, n. 22, p. 1066–1068, 2008.
- DE MELO, L. D. et al. Evolutionary conservation of actin-binding proteins in Trypanosoma

- cruzi and unusual subcellular localization of the actin homologue. **Parasitology**, v. 135, n. 8, p. 955–965, 2008.
- DE SOUZA, D. A. S. et al. Evolutionary analyses of myosin genes in trypanosomatids show a history of expansion, secondary losses and neofunctionalization. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.
- DINKEL, H. et al. ELM 2016--data update and new functionality of the eukaryotic linear motif resource. **Nucleic acids research**, v. 44, n. D1, p. D294-300, 4 Jan. 2016.
- DRAEGER, A. et al. Dealing with damage: Plasma membrane repair mechanisms. **Biochimie**, n. Part A, p. 66–72, 2014.
- EL-SAYED, N. M. et al. **The genome sequence of Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas disease**, v. 309, n. 5733, p. 409-415, 2005.
- GUERRA-SLOMPO, E. P. et al. Molecular characterization of the Trypanosoma cruzi specific RNA binding protein TcRBP40 and its associated mRNAs. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 420, n. 2, p. 302–307, 2012.
- IVENS, A. C. et al. The Genome of the Kinetoplastid Parasite, Leishmania major. **Science (New York, N.Y.)**, v. 309, n. 5733, p. 436–442, 2005.
- JACKSON, A. P. et al. Kinetoplastid Phylogenomics Reveals the Evolutionary Innovations Associated with the Origins of Parasitism. **Current Biology**, v. 26, n. 2, p. 161–172, 2016.
- KALB SOUZA, L. C. et al. Actin expression in trypanosomatids (Euglenozoa: Kinetoplastea). **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 5, p. 631–636, 2013.
- KOLLMAR, M.; MÜHLHAUSEN, S. Myosin repertoire expansion coincides with eukaryotic diversification in the Mesoproterozoic era. **BMC Evolutionary Biology**, v. 17, n. 1, p. 211, 2017.
- KRENDEL, M.; MOOSEKER, M. S. Myosins: Tails (and Heads) of Functional Diversity. **Physiology**, v. 20, n. 4, p. 239–251, 2005.
- KRUPPA, A. J.; KENDRICK-JONES, J.; BUSS, F. Myosins , Actin and Autophagy. **Traffic**, v. 17, p. 878–890, 2016.
- KUGERATSKI, F. G. et al. pTcGW plasmid vectors 1.1 version: A versatile tool for Trypanosoma cruzi gene characterisation. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 5, p. 687–690, 2015.
- LETUNIC, I.; DOERKS, T.; BORK, P. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. **Nucleic acids research**, v. 40, n. Database issue, p. D302-5, Jan. 2012.
- MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD/SPARCLE: Functional classification of proteins via subfamily domain architectures. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D200–D203, 2017.
- NORMA W. ANDREWS; PATRICIA E. DE ALMEIDA; MATTHIAS CORROTTE. Damage Control: Cellular Mechanisms of Plasma Membrane Repair. v. 24, n. 12, p. 734–742, 2015.
- ODRONITZ, F.; KOLLMAR, M. Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species. **Genome biology**, v. 8, n. 9, p. R196, 2007.

- PAPADOPULOS, A. Membrane shaping by actin and myosin during regulated exocytosis. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 84, p. 93–99, 2017.
- PAVANI, R. S. et al. Replication Protein A Presents Canonical Functions and Is Also Involved in the Differentiation Capacity of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 12, p. 1–22, 2016.
- PORAT-SHLIOM, N. et al. Multiple roles for the actin cytoskeleton during regulated exocytosis. **Cell and Molecular Life Sciences**, v. 70, n. 12, p. 2099–2121, 2013.
- PORTO-CARREIRO, I. et al. *Trypanosoma cruzi* epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytostome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes. **European journal of cell biology**, v. 79, n. 11, p. 858–869, 2000.
- 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. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 134, n. 1, p. 105–114, 2004.
- SANT'ANNA, C.; SOUZA, W. DE; CUNHA-E-SILVA, N. Biogenesis of the Reservosomes of *Trypanosoma cruzi*. **Microscopy Microanalysis**, v. 10, p. 637–646, 2004.
- SEABRA, M. C.; COUDRIER, E. Rab GTPases and Myosin Motors in Organelle Motility. **Traffic**, v. 5, p. 393–399, 2004.
- SEMENOVA, I. et al. Actin Dynamics Is Essential for Myosin-Based Transport of Membrane Organelles. **Current Biology**, v. 18, n. 20, p. 1581–1586, 2008.
- SHIFRIN, D. A. et al. Extracellular vesicles: communication, coercion, and conditioning. **Molecular Biology of the Cell**, v. 24, n. 9, p. 1253–1259, 2013.
- TITUS, M. A. The Role of Unconventional Myosins in *Dictyostelium* Endocytosis. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 191–196, 2000.
- TORRECILHAS, A. C. et al. Vesicles as carriers of virulence factors in parasitic protozoan diseases. **Microbes and Infection**, v. 14, n. 15, p. 1465–1474, 2012.
- VANRELL, M. C. et al. The regulation of autophagy differentially affects *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 11, p. 1–23, 2017.
- VIDAL, J. C. et al. Loss of the cytostome-cytopharynx and endocytic ability are late events in *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Journal of Structural Biology**, v. 196, n. 3, p. 319–328, 2016.
- WHO, W. H. O. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. **Second WHO report on neglected tropical diseases**, v. 3.9, p. 67–71, 2013.
- WOOLNER, S.; BEMENT, W. M. Unconventional myosins acting unconventionally. **Trends in cell biology**, v. 19, n. 6, p. 245–52, Jun. 2009.



**Supplementary Figure 1.** Schematic representation of pTc2KO-neo vector from (PAVANI et al., 2016).



**Supplementary Figure 2.** Reserosomes located at a perinuclear region in sKO epimastigotes colocalize with endocytosed transferrin. Anti-cruzipain: with secondary antibody anti-mouse conjugated with Alexa Fluor 488 used to stain reserosomes in green; DAPI: stain nucleus and kinetoplast in blue. Transferrin-Alexa Fluor 633 used as endocytic tracer in red.

## **5 RESULTADOS PRELIMINARES DA CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DAS DEMAIS MIOSINAS DE *T. cruzi***

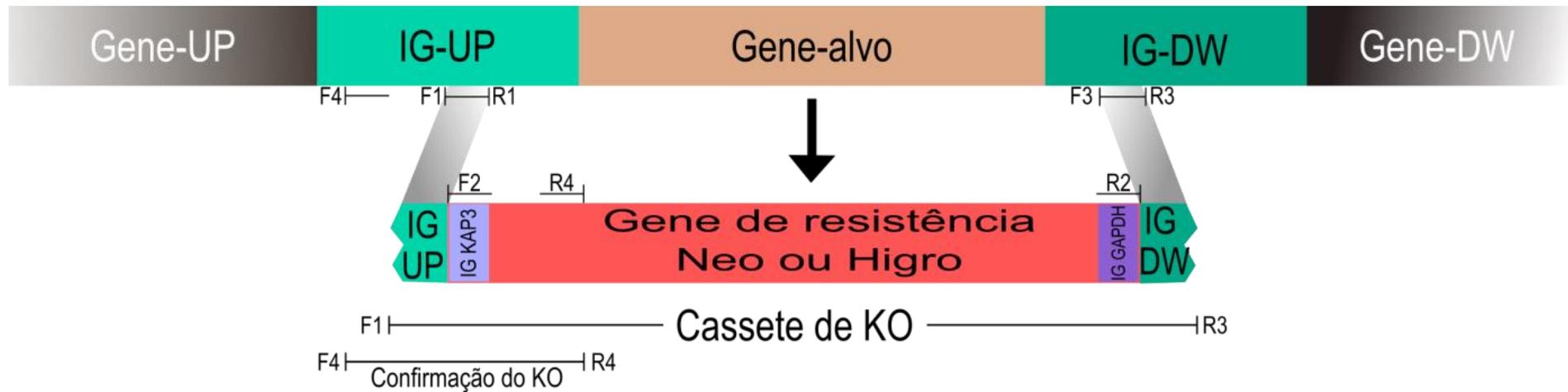
Os resultados apresentados nessa seção compreendem a caracterização funcional dos genes de miosinas para os quais foi possível obter o nocaute: TcMyo1 (semi-nocaute; SKO\_Myo1), TcMyo13 (semi-nocaute; SKO\_Myo13), TcMyoA (duplo-nocaute; DKO\_MyoA) e TcMyoE (semi-nocaute; SKO\_MyoE). Há que ressaltar que cada ensaio foi realizado para todos os nocautes citados, sendo que para TcMyoD (Capítulo 2) e TcMyoA os artigos estão sendo preparados.

Além disso, duas miosinas não contempladas aqui, TcMyoC e TcMyoG, possuem a deleção de pelo menos um dos alelos, já que a clonagem do suposto nocaute duplo destas miosinas resulta em amplificação do gene, confirmando que não são nocautes duplos verdadeiros. Desta forma, a caracterização funcional destas miosinas deverá ser feita com base nos semi-nocautes.

### **5.1 Comprovação dos nocautes de miosinas de *T. cruzi***

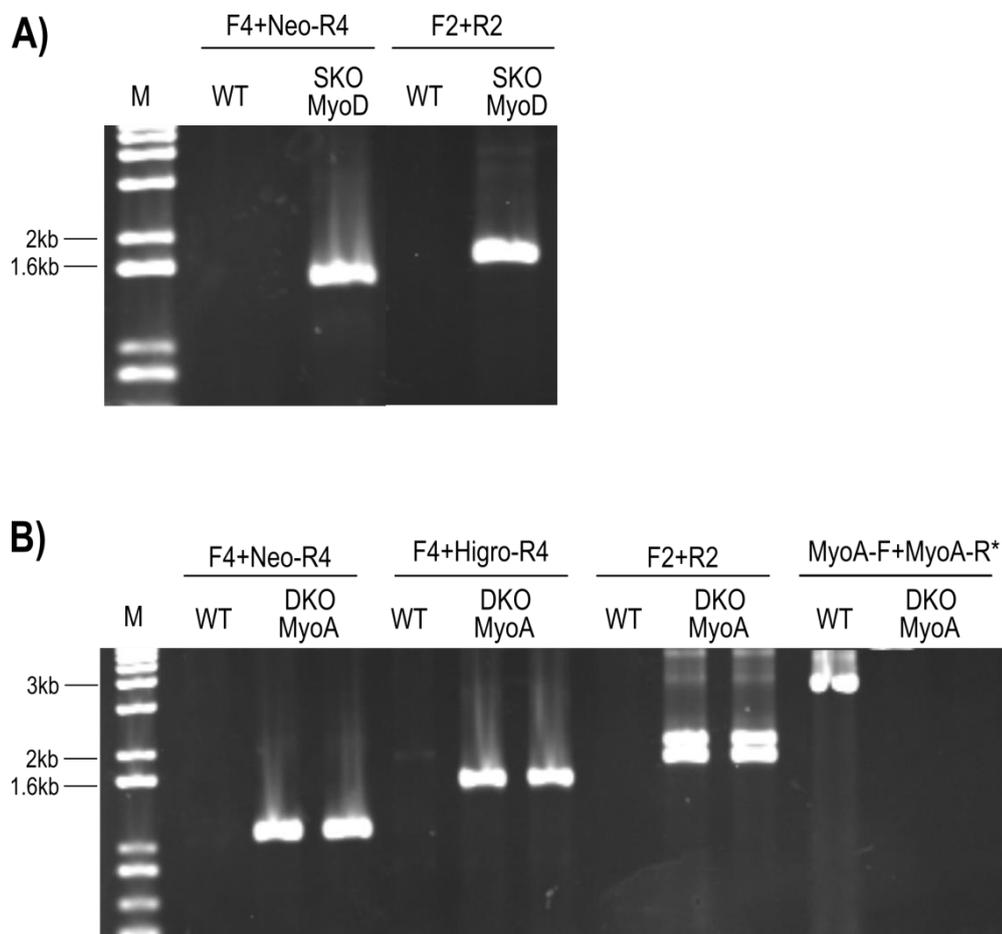
A comprovação dos nocautes de miosinas de *T. cruzi* foi feita por PCR para confirmar a correta localização de inserção dos cassetes de nocaute usando iniciadores de anelamento mais externos à intergênica (F4) e interno ao marcador de seleção usado (neomicina ou higromicina, R4) (Tabela 6.1.1-1; Figura 6.1.1-1).

Sendo assim, foi possível comprovar o semi-nocaute (apenas um dos alelos) dos genes TcMyo1, TcMyo13, TcMyoD (Figura 6.1.1-2) e TcMyoE. Dos nocautes duplos, resistentes à neomicina e higromicina, apenas TcMyoA provou ser verdadeiro (Figura 6.1.1-2). Os demais, TcMyoC e TcMyoG apresentam apenas um alelo nocauteado, já que o *sorting* clonal desses parasitos resultou em poucas culturas duplo resistentes, nas quais o respectivo gene continuou sendo amplificado, de modo que o segundo cassete de nocaute se inseriu em outro lugar do genoma.



**Figura 5.1-1 Esquema para construção de cassetes de nocaute baseado em PCR de fusão e para confirmação dos nocautes**

NOTA: O esquema apresenta os iniciadores usados para amplificação das regiões intergênicas (IG-UP iniciadores F1 e R1; IG-DW iniciadores F3 e R3), para amplificação do gene de resistência a partir do vetor pNeo2 ou pHgro2 (primers F2 e R2 que anelam-se nas intergênicas KAP3 e GAPDH dos vetores, respectivamente), para amplificação do cassete de nocaute (F1 e R3) e para confirmação do nocaute (F4, que se anela mais externamente à intergênica usada e; R4 que é específica para neomicina ou higromicina).



**Figura 5.1-2 Resultado da PCR de confirmação dos nocautes SKO\_MyoD e DKO\_MyoA**

NOTA: Eletroforese em gel de agarose 0,8%. M: marcador 1kb Plus, Invitrogen. PCR feita com o DNA de parasitos selvagem (WT), de parasitos semi-nocautes para TcMyoD (SKO\_MyoD) e de parasitos nocautes para TcMyoA (DKO\_MyoA). (A) Confirmação do semi-nocaute SKO\_MyoD. Iniciadores: F4+Neo-R4 (anelamento à região intergênica upstream à TcMyoD e ao gene de resistência à neomicina; tamanho esperado do amplicon igual a 1,5 kb); F2+R2 (amplificação do gene de resistência à neomicina, 1,7 kb). (B) Confirmação do nocaute duplo DKO\_MyoA. Iniciadores: F4+Neo-R4 (anelamento à região intergênica upstream à TcMyoA e ao marcador de seleção neomicina; tamanho esperado do amplicon igual a 1 kb); F4+Higro-R4 (anelamento à região intergênica upstream à TcMyoA e ao gene de resistência à higromicina, 1,4 kb); F2+R2 (amplificação dos genes de resistência à neomicina e higromicina, bandas de 1,7 e 1,9 kb, respectivamente); MyoA-F+MyoA-R: amplificação de TcMyoA somente no WT, comprovando a deleção completa do gene. \*Primers com sítios attB para clonagem do gene TcMyoA no sistema Gateway.

**Tabela 5.1-1 Número de acesso das miosinas de acordo com a base de dados TritrypDB e lista de iniciadores para construção dos cassetes de nocaute, confirmação dos cassetes de nocaute por PCR convencional e RT-PCR e clonagem gênica com etiquetas FLAG**

INICIADORES PARA CONSTRUÇÃO DE CASSETES DE NOCAUTE			
Miosina	Dm28c Nº Acesso	Iniciadores Intergênica Upstream (5'-3')	Iniciadores Intergênica Downstream (5'-3')
TcMyo1	TCDM_07314	<b>Myo1_F1:</b> GGGGGGGGAAGAGAATTGCGGGAAAGC <b>Myo1_R1:</b> AGTGCGGAAAGAGAAATGGACGGTGCATTTTTCTCGCTTTTT CTACAATAGAGAT	<b>Myo1_F3:</b> ACATTGAACAGAAATTTAACATGCCCATCAACCGGGTATTTCTCA GGAGATT <b>Myo1_R3:</b> GGGGGGGGAAGAGAAAAGCGGAGTGC
TcMyo13	TCDM_05821	<b>Myo13_F1:</b> GGGGGGGGAAGAGAAAAGACCAGCGG <b>Myo13_R1:</b> AGTGCGGAAAGAGAAATGGACGGTGCATTTCACTCTCTGTTT TCCGTGTATGA	<b>Myo13_F3:</b> ACATTGAACAGAAATTTAACATGCCCATCAACCGTTTTGTCAAAT ACAGAAAAA <b>Myo13_R3:</b> GGGGGGGGGTCCCCACAGTCTCGCT
TcMyoA	TCDM_09957	<b>MyoA_F1:</b> GGGGGGGTTTTCTGCCTTTTAGACATTCG <b>MyoA_R1:</b> AGTGCGGAAAGAGAAATGGACGGTGCATTTGGATGGGGTAA ATTCTTCTCG	<b>MyoA_F3:</b> ACATTGAACAGAAATTTAACATGCCCATCAATGAGATGGATGTA TCGGAAGG <b>MyoA_R3:</b> GGGGGGGGAAATGCTCTTCTTTTTGACCAGC
TcMyoB	TCDM_07433	<b>MyoB_F1:</b> GGGGGGGGACGCGCGGAAATAACAAG <b>MyoB_R1:</b> AGTGCGGAAAGAGAAATGGACGGTGCATTTCACTAAACAC CTCGCCAC	<b>MyoB_F3:</b> ACATTGAACAGAAATTTAACATGCCCATCAATTGGAGTGTAAT GTTGAGAGAAAA <b>MyoB_R3:</b> GGGGGGGGTGAACTGTCTTGGGGAGAGC
TcMyoC	TCDM_02877	<b>MyoC_F1:</b> GGGGGGGGCATGTTACACAGAAACACACAG <b>MyoC_R1:</b> AGTGCGGAAAGAGAAATGGACGGTGCATTTGCGGCTCTTTA GACAGTTCAA	<b>MyoC_F3:</b> ACATTGAACAGAAATTTAACATGCCCATCAATAGACGGCGTTGT GAGGTT <b>MyoC_R3:</b> GGGGGGGGCGTTTTGCGACGATAAATGAG

TcMyoD	TCDM_07686	<b>MyoD_F1:</b> GGGGGGGGCCATTCTTCCATTTCTCATTCC <b>MyoD_R1:</b> AGTGCGGAAAGAGAAATGGACGGTGCATTTATTGACGAGTC CTCAGGGTC	<b>MyoD_F3:</b> ACATTGAACAGAAATTTAACATGCCCATCAAGGGGGTGTAACTT CCTTTTCG <b>MyoD_R3:</b> GGGGGGGGGTGCATGCATTTACAATCCG
TcMyoE	TCDM_06166	<b>MyoE_F1:</b> GGGGGGGGCCCTTGCATTAATCTTTGCC <b>MyoE_R1:</b> AGTGCGGAAAGAGAAATGGACGGTGCATTTACGATAAATAA ATAAATAAAAAGGCAG	<b>MyoE_F3:</b> ACATTGAACAGAAATTTAACATGCCCATCAAGGTAAGGAGAGA GACGGATAGA <b>MyoE_R3:</b> GGGGGGGGCTTGCCCCACAGAATGAGAT
pNeo2 pHigro2		<b>F2:</b> <u>GTCGACCGTCCATTTCTCTTTCC</u>	<b>R2:</b> <u>CCTCTGATGGGCATGTAAATTCTGT</u>

**INICIADORES PARA AMPLIFICAÇÃO DAS MIOSINAS PARA INSERÇÃO EM VETORES GATEWAY**

<b>Miosina</b>	<b>Iniciadores (5'-3')</b>	<b>Tamanho esperado do amplicon</b>
TcMyoA	<b>MyoA-F-attB1:</b> GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGCCTGCCGGACGCATAG <b>MyoA-R-attB2:</b> GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCCTATCGTTGTTGCTTCTGGAATG	3 kb
TcMyoD	<b>MyoD-F-attB1:</b> GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGAAGTGGGCAGTAGCGA <b>MyoD-R-attB2:</b> GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCCTCACAAGTCGCTGACCTTCC	3,7 kb

**INICIADORES PARA CONFIRMAÇÃO DOS NOCAUTES POR PCR CONVENCIONAL – Amplificação da região upstream ao sitio de inserção\***

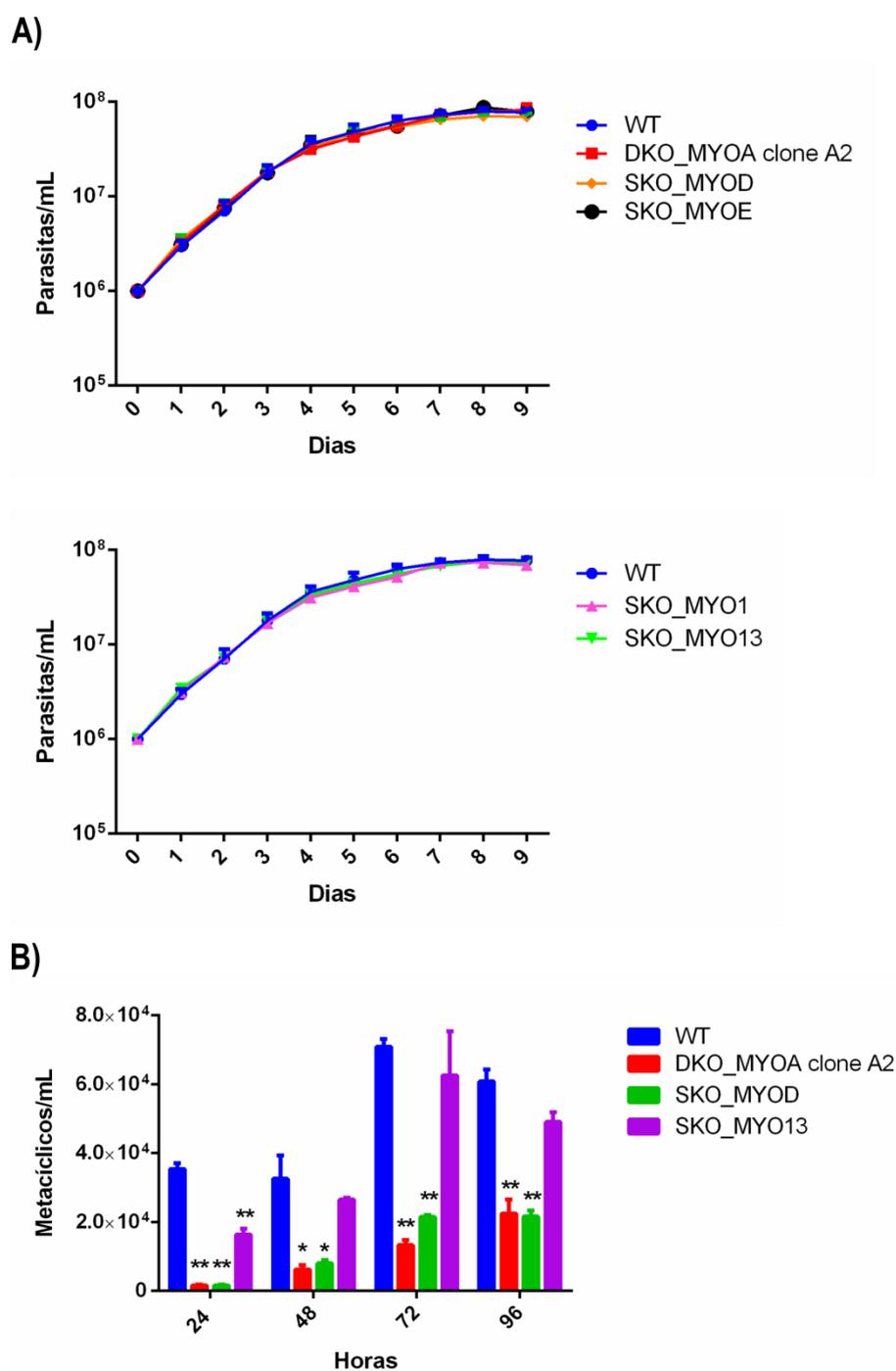
<b>Miosina</b>	<b>Iniciadores (5'-3')</b>	<b>Tamanho esperado do amplicon</b>
TcMyo1	<b>KO1_UP_F4:</b> CGTCGTGCTTCTGCGTATGC	Com Neo-R4: 2,17kb
TcMyo13	<b>KO13_UP_F4:</b> CACTCGTGTTAAAGCAGCAGCAGC	Com Neo-R4: 934pb
TcMyoA	<b>S-KOA_UP_F4:</b> GGCGTGTGTTGTTGTTTGGATTGTTG	Com Neo-R4: 1kb; Com Higo: 1,4kb
TcMyoC	<b>S-KOC_UP_F4:</b> GTGGGACTGCAGGCAAATAGAATGG	Com Neo-R4: 1,2kb; Com Higo: 1,6kb
TcMyoD	<b>KOD_UP_F4:</b> CAAAATGAGCACCAGATGAAAAAAC	Com Neo-R4: 1,5kb
TcMyoE	<b>KOE_DW_R4:</b> GAATACCGCCCCGTTTGC (Região downstream)	Com primer Neo-F4 (5'GGCTGACCGCTTCCTCGTG3'): 1,2kb
Neomicina	<b>Neo_R4:</b> GAACCTGCGTGCAATCCATC	Amplificação de neomicina com F2 + R2: 1,7kb
Higromicina	<b>Higo_R4:</b> ATTGACCGATTTCCTTGCGGT	Amplificação de higromicina com F2 + R2: 1,98kb

**INICIADORES PARA CONFIRMAÇÃO DOS NOCAUTES POR RT-PCR (5'-3')**

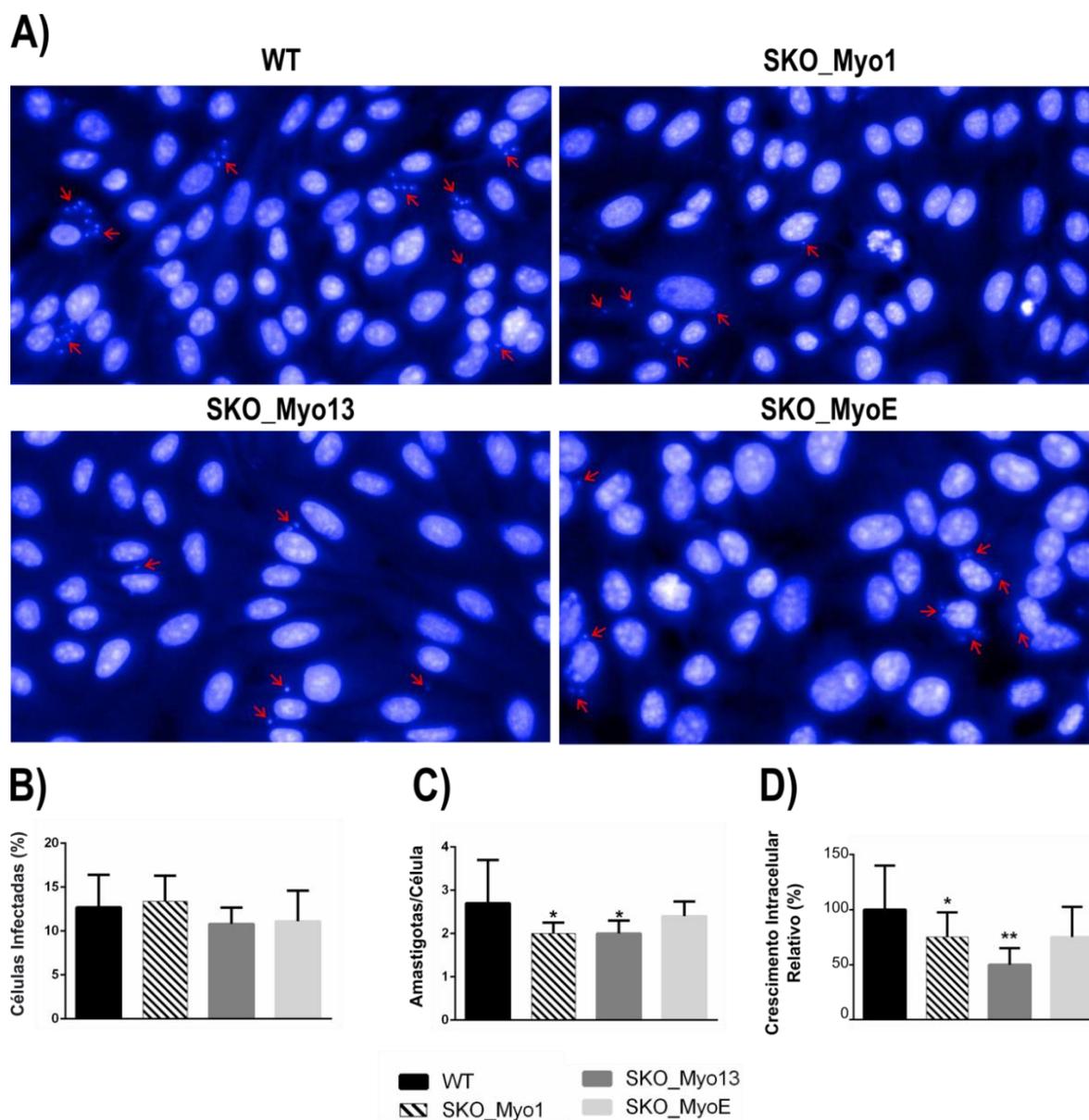
TcMyo1	<b>Myo1-1155-F:</b> CTTAATGCTTGGCGTTCTT	<b>Myo1-1290-R:</b> CTCTTGCTCAACCTTCAAC
TcMyo13	<b>Myo13-1335-F:</b> CATTGGACTTCTTGACATT	<b>Myo13-1444-R:</b> TGTATTTGTTGTAGTGGTTT
TcMyoA	<b>MyoA-1309-F:</b> ACGCATTGGATAGGTCTT	<b>MyoA-1466-R:</b> ATTCCTTCATTCTGGCATT
TcMyoD	<b>MyoD-3001-F:</b> CAGGCCGTGGCTGCGGAAGA	<b>MyoD-3164-R:</b> CCACCACGGCAAGACGTCGCA
TcMyoE	<b>MyoE-2557-F:</b> CGGTTGTTGAGAAGATA	<b>MyoE-2696-R:</b> CTAATATACTGGTGCTGAGA

NOTA: sequências sublinhadas são complementares aos marcadores de seleção pNeo2 e pHigo2 para PCR de fusão. \*Iniciadores específicos para cada intergênica combinados com o iniciador Neo-R4 para confirmação dos alelos nocauteados com gene de resistência à G418 (neomicina) ou com o iniciador Higo-R4 para confirmação dos alelos nocauteados com gene de resistência à higromicina.

## 5.2 Crescimento e diferenciação de parasitos-nocaute de miosinas de *T. cruzi*



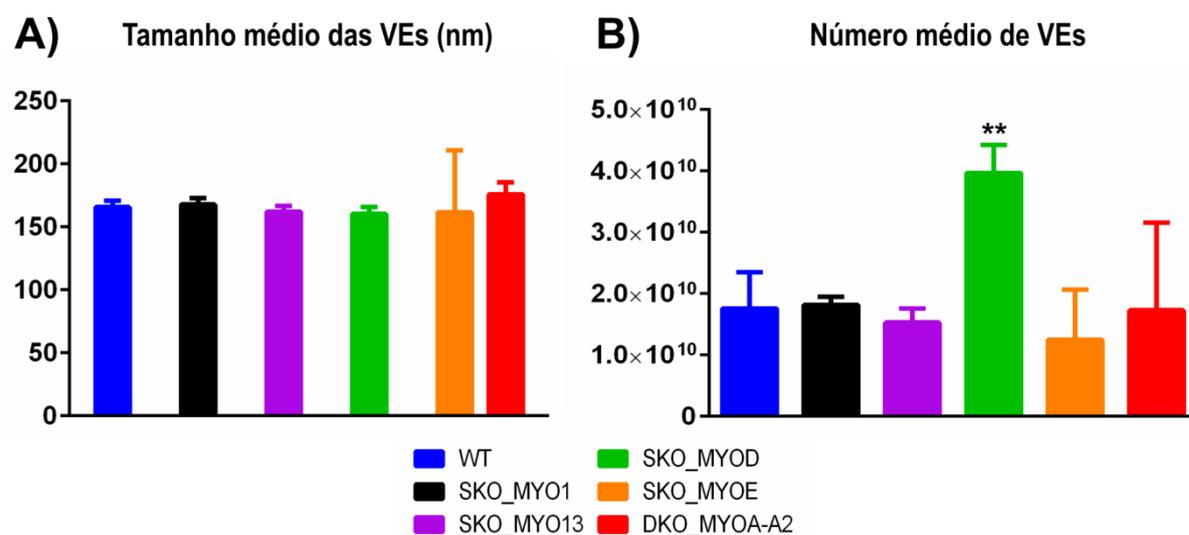
### 5.3 Infecção de células Vero por parasitos-nocaute de miosinas de *T. cruzi*



**Figura 5.3-1 Infecção de células Vero por parasitos-nocaute de miosinas**

NOTA: células Vero foram infectadas com formas tripomastigotas metacíclicas de parasitos selvagem (WT) e semi-nocaute para TcMyo1 (SKO\_Myo1), TcMyo13 (SKO\_Myo13), e TcMyoE (SKO\_MyoE) por 72 horas. Após este tempo, as células foram marcadas com DAPI para detecção do DNA celular e parasitário (azul). As células foram visualizadas pelo Operetta Imaging System (PerkinElmer) e analisadas usando o software Harmony High Content Imaging e Analysis Software (PerkinElmer). (A) Imunofluorescência de células Vero infectadas com amastigotas intracelulares (pontos azuis menores). Para cada poço, o algoritmo identifica células infectadas e não-infectadas, faz a contagem de amastigotas intracelulares e calcula a porcentagem de células infectadas (B), e a média do número de parasitas intracelulares por célula (C). Esses dados foram usados para calcular o fator de crescimento intracelular relativo (D) (usando a fórmula  $riGF = iGF\ SKO / iGF\ WT$ , onde  $iGF = \text{porcentagem de células infectadas} \times \text{número médio de amastigotas/célula}$ ). Os cálculos feitos pelo software baseiam-se em  $\geq 5.000$  células/poço (16 poços/SKO ou WT). Os dados representam a média e o desvio padrão de 1 experimento representativo. Teste t não pareado: \* $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,005$ .

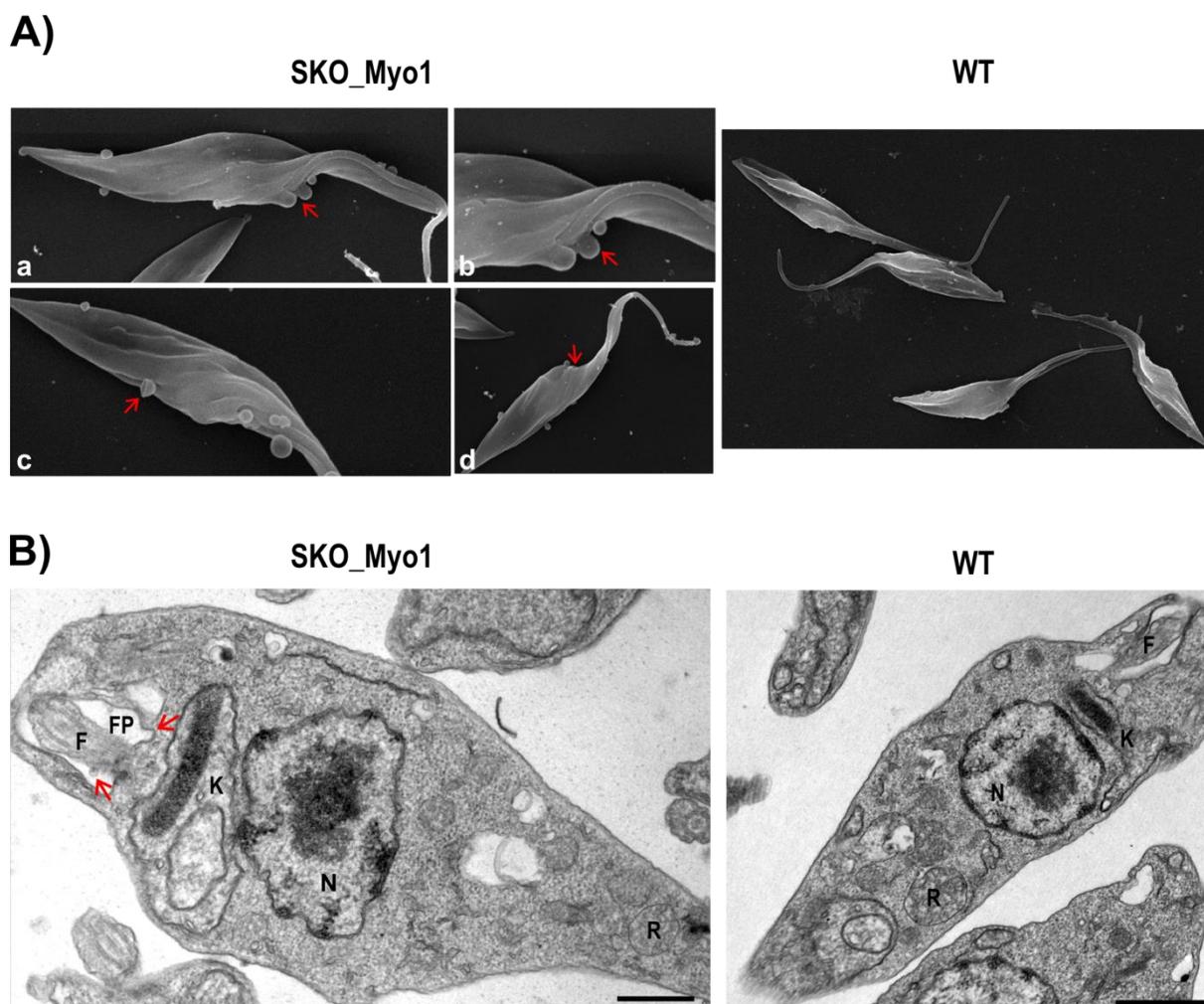
#### 5.4 Análise da atividade exocítica de parasitos-nocautes de miosinas de *T. cruzi*



**Figura 5.4-1 Análise de vesículas extracelulares (VEs) isoladas de epimastigotas selvagem e nocautes de miosinas**

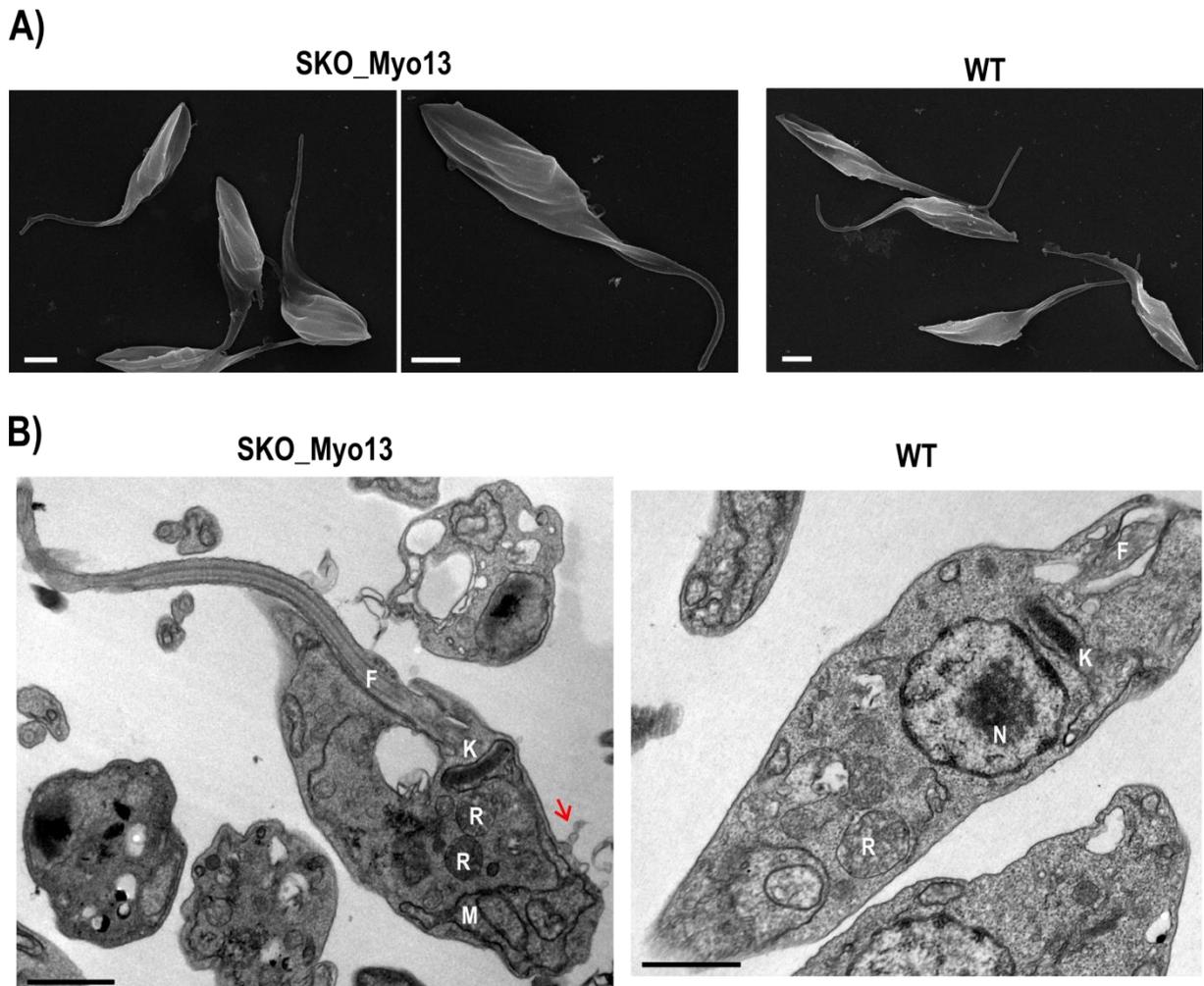
NOTA: Vesículas extracelulares produzidas por  $1 \times 10^9$  epimastigotas selvagem (WT) e nocautes de TcMyo1 (SKO\_Myo1), TcMyo13 (SKO\_Myo13), TcMyoD (SKO\_MyoD), TcMyoE (SKO\_MyoE) e TcMyoA (DKO\_MyoA), analisadas por NTA (Nanoparticle Tracking System, NanoSight, Amesbury, United Kingdom). (A) Tamanho médio das vesículas (nm). (B) Número médio de vesículas extracelulares. Os dados representam a média e o desvio padrão de 1 experimento representativo com cinco réplicas técnicas. Teste t não pareado: \*\*  $p < 0,005$ .

## 5.5 Análise da morfologia de parasitos-nocaute de miosinas de *T. cruzi*



**Figura 5.5-1 Aspectos morfológicos do semi-nocaute de TcMyo1 (SKO\_Myo1) comparado ao parasito selvagem (WT)**

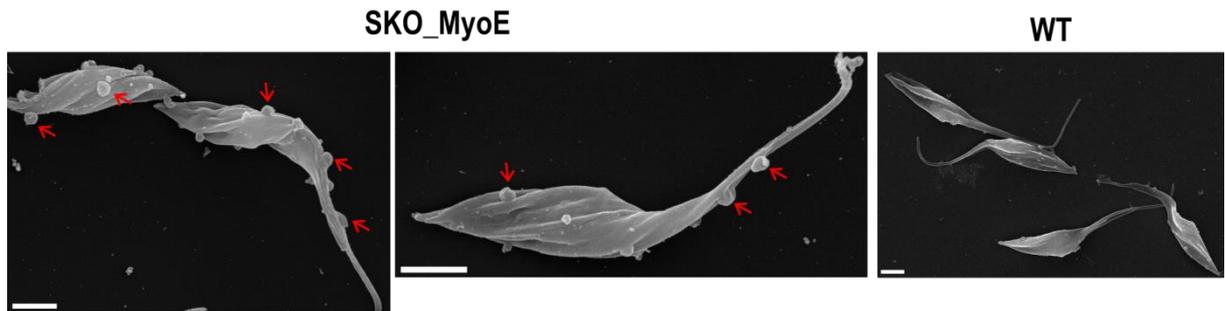
NOTA: (A) Microscopia eletrônica de varredura mostrando o brotamento de vesículas em SKO\_Myo1 a partir da bolsa flagelar (setas em a- e b- aumento), vesícula em formato de copo em c) e, d) seta apontando para a abertura do citóstoma. O parasito selvagem (WT) não apresenta vesículas evidentes na superfície celular. (B) Microscopia eletrônica de transmissão mostrando a morfologia interna de epimastigotas semi-nocaute de TcMyo1 (SKO\_Myo1) e selvagem (WT). FP: bolsa flagelar; F: flagelo; K: cinetoplasto; N: núcleo; R: reservossomos. Setas em SKO\_Myo1 mostram vesículas brotando do flagelo (exocitose) e uma invaginação da bolsa flagelar (endocitose). Barras: 1  $\mu$ m.



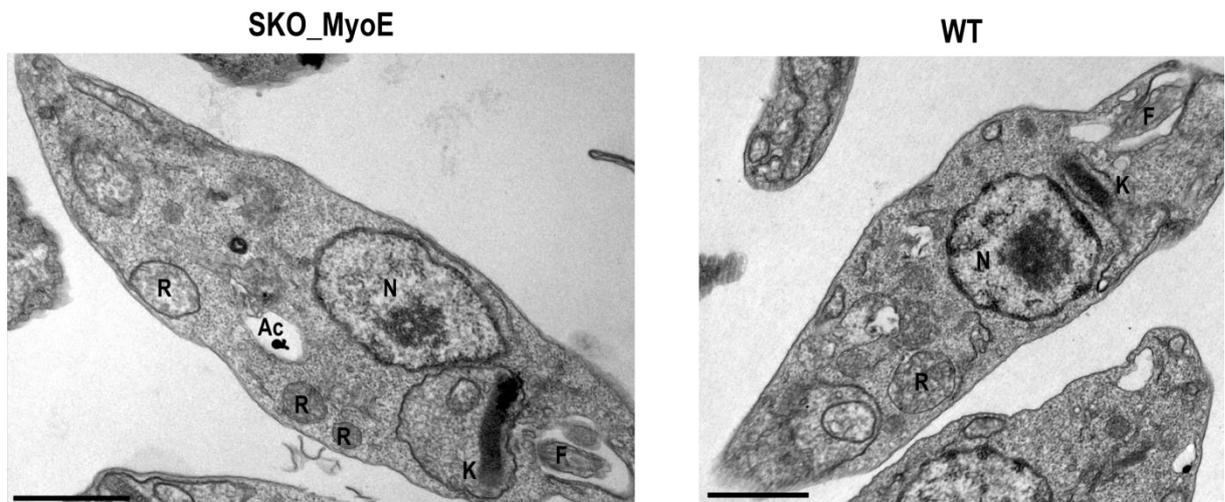
**Figura 5.5-2 Aspectos morfológicos do semi-nocaute de TcMyo13 (SKO\_Myo13) comparado ao parasito selvagem (WT)**

NOTA: (A) Microscopia eletrônica de varredura mostrando que o parasita nocaute SKO\_Myo13 apresenta superfície semelhante ao parasito selvagem (WT). (B) Microscopia eletrônica de transmissão mostrando a morfologia interna de epimastigotas semi-nocaute de TcMyo13 (SKO\_Myo13) e selvagem (WT). F: flagelo; K: cinetoplasto; N: núcleo; R: reservossomos; M: mitocôndria. Seta em SKO\_Myo13 mostra uma projeção de membrana, podendo ser vesículas brotando da superfície celular. Barras brancas: 2  $\mu\text{m}$ ; barras pretas: 1  $\mu\text{m}$ .

A)

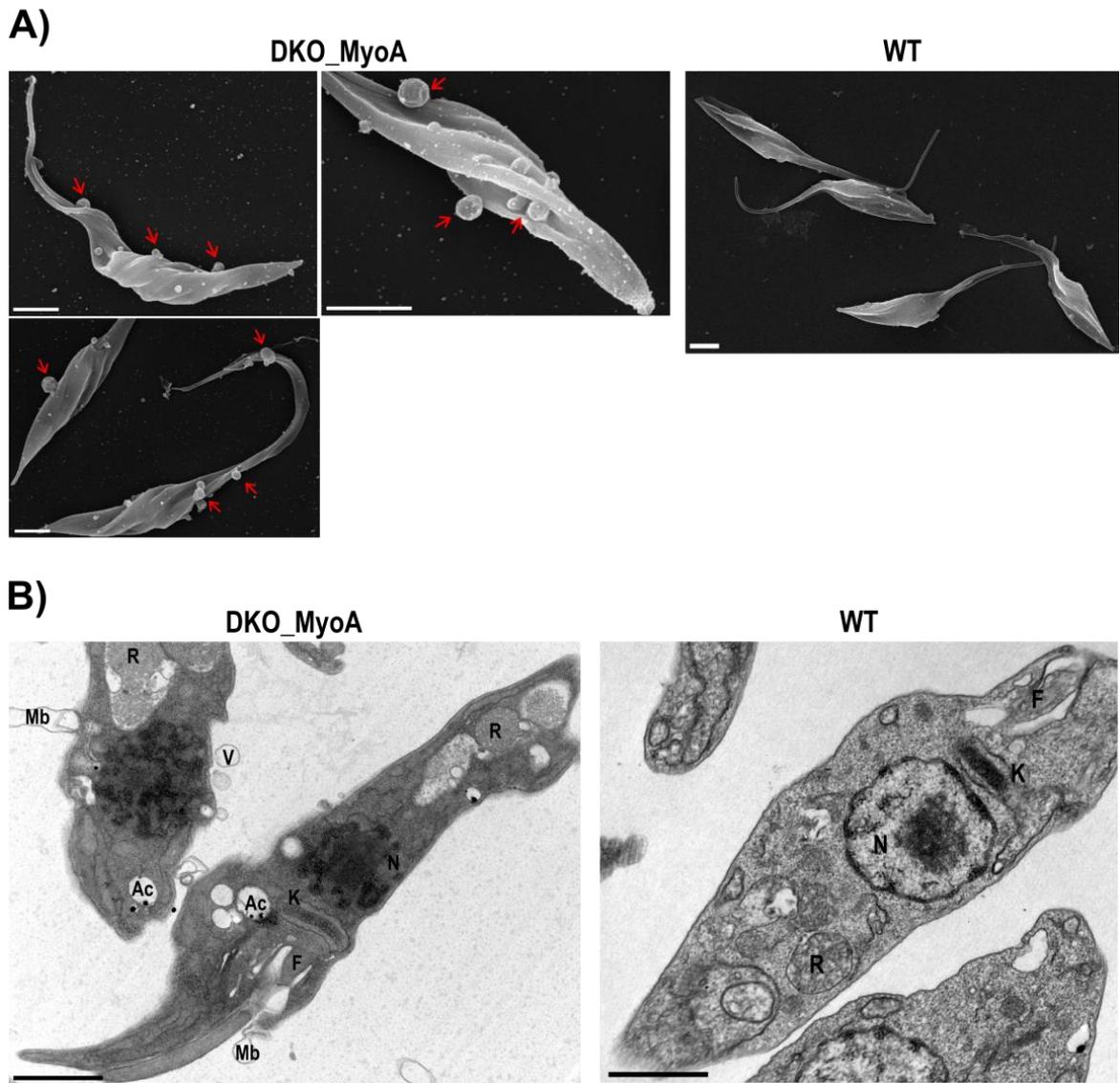


B)



**Figura 5.5-3 Aspectos morfológicos do semi-nocaute de TcMyoE (SKO\_MyoE) comparado ao parasito selvagem (WT)**

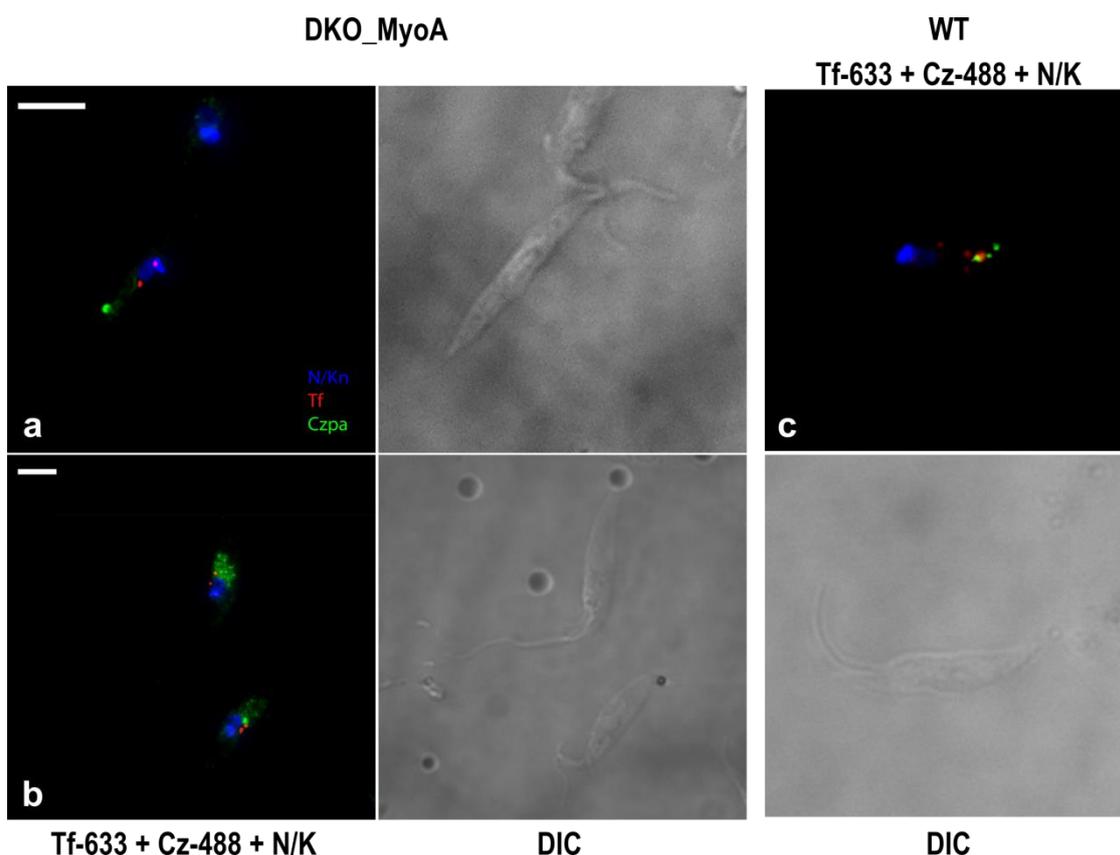
NOTA: (A) Microscopia eletrônica de varredura mostrando que o parasito nocaute SKO\_MyoE apresenta grandes vesículas (setas) em sua superfície quando comparado ao parasito selvagem (WT). (B) Microscopia eletrônica de transmissão mostrando a morfologia interna de epimastigotas semi-nocaute TcMyoE (SKO\_MyoE) e selvagem (WT). F: flagelo; K: cinetoplasto; N: núcleo; R: reservossomos; Ac: acidocalcisomos. Barras brancas: 2  $\mu$ m; barras pretas: 1  $\mu$ m.



**Figura 5.5-4 Aspectos morfológicos do nocaute total de TcMyoA (DKO\_MyoA) comparado ao parasito selvagem (WT)**

NOTA: (A) Microscopia eletrônica de varredura mostrando que o parasito nocaute DKO\_MyoA apresenta grandes vesículas (setas) em sua superfície quando comparado ao parasito selvagem (WT). (B) Microscopia eletrônica de transmissão mostrando a morfologia interna de epimastigotas nocaute total de TcMyoA (DKO\_MyoA) e selvagem (WT). F: flagelo; K: cinetoplasto; N: núcleo; R: reservossomos; Mb: *membrane blebbings*, Ac: acidocalcisomos. Barras brancas: 2  $\mu\text{m}$ ; barras pretas: 1  $\mu\text{m}$ .

## 5.6 Análise da atividade endocítica do nocaute total de TcMyoA (DKO\_MyoA)



**Figura 5.6-1** Efeito da deleção do gene TcMyoA (DKO\_MyoA) na endocitose de transferrina por formas epimastigotas de *T. cruzi*

NOTA: imunofluorescência do ensaio de endocitose com transferrina conjugada com Alexa-633 e co-localização com cruzipaina. O nocaute duplo de TcMyoA (DKO\_MyoA) não apresenta colocalização de transferrina (vermelho) com a cruzipaina (verde, marcador de reservossomo). Além disso, DKO\_MyoA apresenta um padrão disperso de reservossomos que não é visto no parasito selvagem (WT, em c-; onde é possível ver a co-localização da transferrina e cruzipaina em amarelo). Transferrina-Alexa633 (vermelho); Cruzipaina-Alexa488 (verde); Núcleo e cinetoplasto-DAPI (azul). DIC: Barras: 5  $\mu$ m.

## 6 DISCUSSÃO

No Capítulo 1 (Seção 3), vimos como os genes da família das miosinas evoluiu na classe de protozoários chamada Kinetoplastea, que compreende espécies patogênicas e de vida livre. Entre eles, como os parasitos *T. cruzi*, *T. brucei* e *Leishmania* spp., destacamos que a diversidade de miosinas não é igualmente distribuída, com vários eventos de perda e, surpreendentemente, neofuncionalização de alguns genes ao longo da evolução dessas espécies. Além disso, o representante de um ramo basal de cinetoplastídeos, *Bodo saltans*, possui um repertório ainda maior de miosinas quando comparado à *T. cruzi*, mostrando que o ancestral dos cinetoplastídeos possuía um grande número de miosinas e que, à medida que essa classe se diversificava, o fenômeno geral foi de perda da grande maioria desses genes em um grande número de espécies.

As filogenias apresentadas no Capítulo 1 por si só nos mostram a importância desses genes para esse grupo e como a sua manutenção ou perda reflete as necessidades biológicas de cada espécie, já que genes com possíveis funções redundantes foram perdidos ou serviram como matéria-prima para a formação de novos genes como, por exemplo, o grupo Stercoraria que manteve um maior número de genes de miosinas (como o *T. cruzi*, que possui nove genes codificadores de miosinas), enquanto que o grupo Salivaria perdeu a maior parte desses genes (como o *T. brucei*, que possui apenas dois). Com base nesses resultados, a caracterização funcional desses genes é de extrema importância para compreensão da biologia desses parasitos. Nosso modelo experimental, o *T. cruzi* (causador da doença de Chagas de importância epidemiológica nacional), manteve grande parte das miosinas presentes no ancestral dos cinetoplastídeos e, portanto, é uma importante ferramenta para o estudo dessa família gênica.

Os resultados preliminares da caracterização funcional de genes da família das miosinas em *T. cruzi* mostraram que esses genes estão envolvidos em vários aspectos da biologia do parasito: metacicloênese, infecção de células mamíferas (Vero), endocitose e exocitose, além de alterações na morfologia celular. Os genes que foram avaliados nesse trabalho, para os quais foi possível realizar ao menos o nocaute parcial (de apenas um dos alelos; semi-nocaute, SKO), são TcMyoD, TcMyoE, TcMyo1 e TcMyo13 e TcMyoA (único nocaute total, DKO). Para TcMyoD, o esboço do artigo foi apresentado no Capítulo 2 (Seção 4), com uma discussão mais ampla.

Com relação à metacicloênese, os nocautes que apresentaram diminuição na diferenciação foram TcMyoA (DKO) e TcMyoD (SKO) (Figura 5.2-1B, Seção 5). A

metaciclologênese é uma importante etapa do ciclo de vida de *T. cruzi*, na qual o parasito na forma replicativa epimastigota diferencia-se na forma infectiva e não-replicativa denominada metacíclica (HERNÁNDEZ et al., 2012). Durante a metaciclologênese, uma série de modificações morfológicas ocorre, exigindo do parasito o controle da expressão gênica (que ocorre a nível pós-transcricional) e a atenção às alterações ambientais, como o estresse nutricional, que funcionam como o gatilho para a diferenciação (ALVES; GOLDENBERG, 2016; GOLDENBERG; ÁVILA, 2011; GONÇALVES et al., 2018; JIMENEZ, 2014). Os nutrientes absorvidos pelo parasito em sua fase epimastigota são armazenados numa organela denominada reservossomo, que tem sido associada à metaciclologênese por possivelmente fornecer a energia necessária para a diferenciação (SOARES, 1999).

Os reservossomos dos nocautes de TcMyoA e TcMyoD apresentam-se alterados: em TcMyoD estão localizados ao redor do núcleo (Figuras 3 e 4 do Capítulo 2, Seção 4), enquanto que em TcMyoA estão na região posterior formando uma massa disforme (Figuras 5.5-4 e 5.6-1 da Seção 5) ao invés de várias organelas arredondadas que comumente se encontram nessa região. Ainda não se sabe se o posicionamento e a morfologia dos reservossomos impactam na sua função e composição química (nutrientes vindos da via endocítica, proteases e outras proteínas vindas da via secretória), mas essas alterações podem estar associadas à falta de sucesso dos parasitos-nocautes em realizar a metaciclologênese. Além disso, recentemente os reservossomos têm sido apontados como potenciais ferramentas na metaciclologênese ao auxiliar o processo de remodelamento celular por meio da autofagia, sendo que suas proteases podem digerir organelas quando os reservossomos fundem-se aos autofagossomos (VANRELL et al., 2017). No caso dos nocautes de TcMyoA e TcMyoD, a alteração da morfologia e do posicionamento dos reservossomos, respectivamente, podem estar afetando o recrutamento dessas organelas, e é intrigante pensar que a miosina pode estar envolvida no tráfego para fusão dos reservossomos com autofagossomos.

Com relação à infecção de células hospedeiras, parasitos metacíclicos dos SKOs TcMyo1, TcMyo13 e TcMyoE, além do parasito selvagem usado como controle (WT), foram usados para infectar células Vero (Figura 5.3-1 da Seção 5) e avaliar sua capacidade de infecção e diferenciação em formas amastigotas. Como resultado, os nocautes de TcMyo1 e TcMyo13 apresentaram uma diminuição do fator de crescimento intracelular relativo (riGF: iGF SKO/iGF WT) (Figura 5.3-1D da Seção 5), sendo que o iGF (fator de crescimento intracelular) é calculado como a porcentagem de células infectadas vezes o número médio de amastigotas/célula. Como a porcentagem de células infectadas não foi diferente entre os nocautes e o parasito selvagem (Figura 5.3-1B da Seção 5), mas o número de amastigotas por

células encontra-se diminuído nos nocautes de TcMyo1 e TcMyo13 (Figura 5.3-1C da Seção 5), pode-se dizer que a capacidade infectiva dos metacíclicos não teve alteração, mas a capacidade de diferenciação nas formas amastigotas foi prejudicada nesses nocautes, levando à diminuição do fator de crescimento intracelular relativo.

Os tripomastigotas metacíclicos são capazes de infectar uma variedade de células mamíferas, sendo que a invasão depende de um remodelamento dos microtúbulos do citoesqueleto das células hospedeiras a fim de recrutar seus lisossomos para o local de entrada do parasito (RODRÍGUEZ et al., 1996). Uma vez no citoplasma celular, os metacíclicos iniciam a amastigogênese primária, processo de diferenciação em formas amastigotas, sendo que a amastigogênese secundária ocorre a partir de formas tripomastigotas sanguíneas (NAVARRO; ASKUE; CONTRERAS, 2003). Ambos os processos ocorrem no interior de células mamíferas, embora seja possível a obtenção de formas amastigotas em culturas axênicas (NAVARRO; ASKUE; CONTRERAS, 2003). Ainda não se sabe como o nocaute das miosinas TcMyo1 e TcMyo13 podem estar alterando a eficiência da amastigogênese mas, assim como as miosinas TcMyoA e TcMyoD diminuem a eficiência da metaciclogênese, é possível que as miosinas TcMyo1 e TcMyo13 estejam envolvidas em processos como o remodelamento celular (por meio do transporte de organelas, participação em processos autofágicos, etc.) durante esta fase específica da diferenciação em formas amastigotas. Estes fatos devem ser cuidadosamente analisados já que, ao avaliar e identificar o mecanismo pelo qual a ausência destas miosinas contribui para uma ineficiente diferenciação em formas replicativas amastigotas no interior de células mamíferas, os resultados podem ajudar no desenvolvimento de fármacos mais eficazes no controle da doença em indivíduos infectados, uma vez que os remédios atualmente utilizados, Benzonidazol e Nifurtimox, possuem baixa eficiência na fase crônica da doença de Chagas e considerável toxicidade que acarreta em indesejáveis efeitos colaterais (BERMUDEZ et al., 2016). A grande divergência molecular entre essas miosinas e as miosinas humanas, fazem delas um interessante alvo para desenvolvimento de fármacos com diminuída reação cruzada.

A análise da atividade exocítica de parasitos-nocaute de miosinas a partir da coleta e quantificação de vesículas extracelulares, revelou que apenas o nocaute de TcMyoD (SKO\_MyoD) libera o dobro de vesículas extracelulares quando comparado com o parasito selvagem, embora o tamanho das vesículas liberadas pelos parasitos-nocaute de miosinas e selvagem possuem um tamanho similar de cerca de 150 nm (Figura 5.4-1 da Seção 5). Contudo, a partir dos dados de microscopia eletrônica de varredura e transmissão (Figuras 5.5-1 à 5.5-4, Seção 5), podemos observar que os nocautes de miosinas, exceto o nocaute de

TcMyo13 (SKO\_Myo13), apresentam vesículas brotando da bolsa flagelar, como em SKO\_Myo1 (Figura 5.5-1, Seção 5), ou da superfície do corpo celular (SKO\_Myo1, SKO\_MyoE e DKO\_MyoA). De modo semelhante, os resultados para o nocaute de TcMyoD foram apresentados e discutidos no Capítulo 2, Seção 4.

A produção e liberação de vesículas esféricas e revestidas por membrana a partir da superfície celular é uma característica conservada em microrganismos, desde os procariotos bactérias (tanto Gram-negativas quanto Gram-positivas) e arqueobactérias até os eucarióticos fungos e parasitos, e parecem contribuir para a capacidade adaptativa da vida microbiana (DEATHERAGEA; COOKSONA, 2012). Essas vesículas possuem uma variedade de funções como: mensageiros moleculares de comunicação inter-microbiana (*quorum sensing* em bactérias), para entrega de fatores de virulência contra o hospedeiro em espécies patogênicas tanto procariotas quanto eucariotas, estímulo da resposta imune inata e adaptativa, etc. (DEATHERAGEA; COOKSONA, 2012). As células eucarióticas de metazoários também liberam vesículas (tanto de forma constitutiva quanto regulada) com vários propósitos como sinalização celular, reparo de membrana, modulação da resposta imune, angiogênese, neurotransmissão e, até mesmo, promovendo a invasão de células tumorais (SHIFRIN et al., 2013). Parasitos liberam vesículas de ambas as formas (constitutiva ou regulada), carregadas de fatores de virulência para modulação da resposta imune do hospedeiro (TORRECILHAS et al., 2012) e também para modificação da sua própria superfície celular a fim de evitar a sua detecção pelo sistema imune do hospedeiro (DEATHERAGEA; COOKSONA, 2012).

Vesículas extracelulares também estão envolvidas na manutenção da composição e tensão da membrana plasmática (PAPADOPULOS, 2017), sendo a exocitose um importante mecanismo de reparo de membrana (ANDREWS; DE ALMEIDA; CORROTTE, 2014; BLAZEK; PALEO; WEISLEDER, 2015; DRAEGER et al., 2014). Embora neste trabalho não tenhamos avaliado a biogênese das vesículas extracelulares, a presença marcante dessas vesículas na superfície da maioria dos nocautes obtidos aponta para a sua utilização como um mecanismo de reparo de membrana, já que os nocautes apresentam características como embolhamento de membrana (*membrane blebbing*), indicando uma possível alteração em sua tensão. Contudo, a utilização das vesículas extracelulares como mensageiros intercelulares, ou ainda para outros propósitos, não pode ser descartada até que sua biogênese e composição química (proteínas e ácidos nucleicos) sejam determinadas.

A morfologia de SKO\_MyoD foi apresentada e discutida na Capítulo 2, Seção 4. Com relação aos demais nocautes, as principais alterações morfológicas foram apresentadas nas

Figuras 5.5-1 à 5.5-4, Seção 5. SKO\_Myo1 além do brotamento de vesículas da bolsa flagelar na micrografia eletrônica de varredura (Figura 5.5-1A), apresenta vesículas aparentemente brotando do flagelo e invaginação na bolsa flagelar conforme micrografia eletrônica de transmissão (Figura 5.5-1B). Em *T. brucei*, o *knockdown* da Myo1 em formas sanguíneas desse parasito mostrou uma importante alteração morfológica: o alargamento da bolsa flagelar, fenótipo chamado *big eye*, que está associado ao desequilíbrio do tráfego intracelular com uma redução da atividade endocítica (comprometida no *knockdown* de TbMyo1) e a manutenção da atividade exocítica de moléculas recém-sintetizadas para a superfície celular (SPITZNAGEL et al., 2010). A análise preliminar da atividade endocítica de SKO\_Myo1 não apresentou alterações, embora novos ensaios devam ser feitos.

O nocaute de TcMyo13, SKO\_Myo13, por sua vez, apresenta morfologia semelhante ao parasito selvagem (Figura 5.5-2). É interessante notar que o semi-nocaute da miosina 13 (classe XIII de acordo com de Souza et al., 2018; classe XXI, de acordo com Foth et al., 2016) apresenta um flagelo normal, semelhante ao parasito selvagem, enquanto que o semi-nocaute deste mesmo gene em *Leishmania* apresenta uma drástica redução do tamanho do flagelo, diminuição do tráfego intracelular e ausência da estrutura paraflagelar (KATTA et al., 2010). É possível que o nocaute de miosinas em *T. cruzi*, como visto em SKO\_Myo1 e SKO\_Myo13, tenha um efeito diferente de outras espécies de tripanossomatídeos como *T. brucei* e *Leishmania*, já que o *T. cruzi* possui um repertório maior de miosinas, sendo possível a sobreposição ou até mesmo redundância de função entre elas, resultando na compensação do fenótipo. Isso ocorre, por exemplo, em *Toxoplasma gondii* onde o nocaute da miosina A (TgMyoA, membro da classe XIV exclusiva de Apicomplexa), integrante do sistema glideossomo de invasão de células hospedeiras, é compensado pelo gene TgMyoC (classe XIV) garantindo uma invasão residual (FRÉNAL et al., 2014; FRÉNAL; SOLDATI-FAVRE, 2015). Novas tentativas devem ser feitas para o nocaute total desses genes e concomitantemente ao nocaute de outras miosinas para avaliar a sobreposição de funções. Com o advento da tecnologia de CRISPR-Cas9 e seus constantes melhoramentos, a realização de nocautes múltiplos, especialmente de famílias gênicas como a das miosinas, em *T. cruzi* é bastante promissora (PENG et al., 2015; ROMAGNOLI et al., 2018; SOARES MEDEIROS et al., 2017).

Já o nocaute de TcMyoE, SKO\_MyoE (Figura 5.5-3), não possui nenhuma alteração morfológica além da liberação de vesículas na superfície do corpo celular. Em marcante contraste está o nocaute duplo do gene TcMyoA, DKO\_MyoA (Figura 5.5-4), que apresenta drásticas alterações morfológicas com relação ao parasito selvagem:

1. Presença de embolhamento de membrana (*membrane blebbings*): o embolhamento é uma protrusão da membrana celular causado por um descolamento transiente ou ruptura da actina cortical, causando o extravasamento do citosol para fora do corpo celular e causando o insuflamento da bolha (CHARRAS, 2008). Contudo, em *T. cruzi* ainda não foi descrita a presença de uma rede de actina cortical, embora a sua presença em associação com os microtúbulos subpeliculares tenha sido descrita para seu parente próximo, *Leishmania* (SAHASRABUDDHE; BAJPAI; GUPTA, 2004). O aumento da tensão da membrana plasmática, conforme indicado pelo embolhamento de membrana, pode ser um dos fatores desencadeantes da exocitose exacerbada, conforme comentado acima, com o intuito de preservar a integridade da membrana plasmática (BABYCHUK et al., 2011);
2. Ausência do nucléolo: além do seu importante papel na biogênese ribossomal, o nucléolo tem uma grande influência na proliferação celular e silenciamento gênico ao sequestrar fatores de regulação e como um sensor de estresse celular (OLSON, 2004). A redução e desmontagem do nucléolo foram observadas em epimastigotas em fase estacionária e durante a metaciclogênese de *T. cruzi*; ao servir como um sensor de estresse, a desmontagem do nucléolo pode promover o sinal crucial para início da metaciclogênese (GLUENZ; TAYLOR; KELLY, 2007; NÁZER; VERDÚN; SÁNCHEZ, 2011). Apesar disso, o nocaute de TcMyoA possui uma taxa de diferenciação muito inferior ao parasito selvagem, talvez porque a célula esteja em constante estresse devido às demais alterações morfológicas/fisiológicas que o parasito apresenta. A ausência do nucléolo e a ineficiência na metaciclogênese dos parasitos DKO\_MyoA precisam ser melhor estudadas;
3. Acidocalcissomos próximos à bolsa flagelar: os acidocalcissomos são organelas de armazenamento de cálcio e polifosfato, denominado polyP, formando um polímero composto de poucas a centenas unidades de fosfato, embora em *T. cruzi* os acidocalcissomos sejam ricos em polifosfatos de cadeia curta: polyP<sub>3</sub>, polyP<sub>4</sub> e polyP<sub>5</sub> (MORENO et al., 2000). Os acidocalcissomos possuem bombas, canais e permutadores em sua membrana, transportando prótons, íons de cálcio e sódio, e até mesmo água através de uma aquaporina (TcAQP1) (DOCAMPO et al., 2013). Constituem importantes organelas na osmorregulação de *T. cruzi* ao fundirem-se com o complexo do vacúolo contrátil (CVC), próximo à bolsa flagelar, por fornecer ao CVC a aquaporina que permite o fluxo de água tanto no estresse hiper quanto hiposmótico, além do polyP que no estresse hiposmótico fornece os osmólitos inorgânicos e no estresse hiperosmótico sequestra esses osmólitos prevenindo o

aumento da força iônica citosólica (DOCAMPO et al., 2013). A presença de acidocalcissomos próximo à bolsa flagelar de DKO\_MyoA, sugere que o parasito pode estar sofrendo estresse osmótico;

4. Reservossomos disformes (não-arredondados) na região posterior do corpo do parasito e a dispersão da marcação da cruzipaína no ensaio de endocitose mostram a alteração da morfologia dos reservossomos. Além disso, a análise preliminar da atividade endocítica revelou que a transferrina não atinge os reservossomos, já que não colocaliza com a cruzipaína (Figura 5.6-1), indicando um possível envolvimento da TcMyoA no transporte de vesículas endocíticas até os reservossomos. Também é possível que a morfologia alterada dos reservossomos esteja comprometendo o reconhecimento desta organela, impedindo assim a sua fusão com vesículas endocíticas. A alteração da morfologia e possivelmente do conteúdo dos reservossomos pode ser um dos fatores que compromete a metaciclogênese neste parasito, tanto por sua associação com o fornecimento nutricional durante a diferenciação (SOARES, 1999), quanto por sua atuação em processos autofágicos necessários para o remodelamento celular na metaciclogênese (VANRELL et al., 2017).

A ocorrência de fenótipos tão distintos quanto os apresentados, apontam para uma ampla variedade de funções de uma única miosina, TcMyoA, indo na contramão do que até então se imaginava: um número restrito de miosinas leva a uma generalização de funções, enquanto que um número maior de miosinas leva a sua especialização. De fato, a análise da história evolutiva da família das miosinas mostra que as miosinas mais ancestrais apresentam funções generalistas, enquanto que miosinas que divergiram mais tarde possuem funções mais especializadas (THOMPSON; LANGFORD, 2002). Conforme mostra a história evolutiva dos genes da família das miosinas em tripanossomatídeos, o repertório atual de miosinas presentes em *T. cruzi* já estava presente no ancestral dos cinetoplastídeos, um dos primeiros ramos a surgir na árvore dos eucariotos, há mais de 500 milhões de anos (DE SOUZA et al., 2018), de forma que algumas miosinas podem ter se especializado, enquanto outras se mantiveram generalistas. Um estudo detalhado sobre o nocaute de TcMyoA está sendo realizado pelo nosso grupo com o objetivo de determinar a participação desta miosina em diferentes processos celulares, como metaciclogênese, infecção de células hospedeiras e diferenciação em outras formas ao longo do ciclo de vida do parasito.

## 7 CONCLUSÃO

A análise da evolução da família das miosinas, tendo como base o genoma de *T. cruzi*, revelou aspectos interessantes sobre a perda e a evolução de novos genes a partir de miosinas em tripanossomatídeos. Interessantemente, o *T. cruzi* manteve boa parte das miosinas ancestrais, já que foram encontrados órtologos em *B. saltans*, membro de um ramo que divergiu há mais tempo em Kinetoplastea. Algumas espécies, assim como *T. cruzi*, também mantiveram esse repertório mais amplo de miosinas, o que levanta questões acerca da função que estas miosinas desempenham em determinadas espécies, mas que estão ausentes na grande maioria dos tripanossomatídeos, como é o caso das miosinas de Classe XIII.

O conhecimento da história evolutiva desses genes permite perceber que as miosinas remanescentes em *T. cruzi* e espécies próximas são valiosas para o funcionamento desses parasitos, uma vez que a perda e, ainda, o aproveitamento desses genes para construção de novos genes não relacionados à miosinas em espécies como *Leishmania*, indicam que para *T. cruzi*, *T. grayi* e *T. theileri*, o maior número de miosinas deve ter uma importância funcional ainda não descoberta.

A partir da caracterização funcional do gene TcMyoD (classe XIII) e dos resultados preliminares da caracterização de outras miosinas de *T. cruzi* a partir de nocaute gênico, foi possível observar que as miosinas estão relacionadas com importantes funções celulares como endocitose, exocitose, posicionamento de organelas (reservossomos) e metaciclogênese. Dessa forma, essa família gênica é de grande importância para o entendimento da dinâmica celular deste parasito e, devido à grande divergência entre as miosinas de *T. cruzi* e demais eucariotos (como o ser humano), pode ser de grande interesse como alvo para o desenvolvimento de fármacos e vacinas anti-tripanosomais.

## 8 REFERÊNCIAS USADAS NA INTRODUÇÃO E DISCUSSÃO

- ALCÂNTARA, C. E. L. et al. The cytostome–cytopharynx complex of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes disassembles during cell division. **Journal of Cell Science**, v. 130, n. 1, p. 164–176, 2017.
- ALVAREZ, V. E. et al. Autophagy is involved in nutritional stress response and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 6, p. 3454–3464, 2008.
- ALVES, L. R.; GOLDENBERG, S. RNA-binding proteins related to stress response and differentiation in protozoa. **World journal of biological chemistry**, v. 7, n. 1, p. 78–87, 2016.
- AMORIM, J. C. et al. Quantitative proteome and phosphoproteome analyses highlight the adherent population during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 9899, 2017.
- ANDREWS, N. W.; DE ALMEIDA, P. E.; CORROTTE, M. Damage Control: Cellular Mechanisms of Plasma Membrane Repair. **Trends in Cell Biology**, v. 24, n. 12, p. 734–742, 2014.
- ARAÚJO, A. et al. Paleoparasitology of Chagas disease--a review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl, n. June, p. 9–16, 2009.
- BABIYCHUK, E. B. et al. Blebbing confers resistance against cell lysis. **Cell Death and Differentiation**, v. 18, n. 1, p. 80–89, 2011.
- BALDAUF, S. L. Phylogeny for the faint of heart: A tutorial. **Trends in Genetics**, v. 19, n. 6, p. 345–351, 2003.
- BATISTA, C. M. et al. *Trypanosoma cruzi* intracellular amastigotes isolated by nitrogen decompression are capable of endocytosis and cargo storage in reservosomes. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–18, 2015.
- BATTERS, C. et al. Calmodulin regulates dimerization, motility, and lipid binding of *Leishmania* myosin XXI. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 2, p. E227-36, 2014.
- BATTERS, C.; VEIGEL, C. Mechanics and Activation of Unconventional Myosins. **Traffic**, v. 17, p. 860–871, 2016.
- BERMUDEZ, J. et al. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Tropica**, v. 156, p. 1–16, 2016.
- BERRIMAN, M. et al. The Genome of the African Trypanosome *Trypanosoma brucei*. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 416–422, 2005.
- BILLINGS, E. et al. HIV-1 Genetic Diversity Among Incident Infections in Mbeya, Tanzania. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 33, n. 4, p. 373–381, 2017.
- BLAZEK, A. D.; PALEO, B. J.; WEISLEDER, N. Plasma Membrane Repair: A Central Process for Maintaining Cellular Homeostasis. **Physiology**, v. 30, n. 6, p. 438–448, 2015.
- BONHIVERS, M. et al. Biogenesis of the trypanosome endo-exocytotic organelle is cytoskeleton mediated. **PLoS Biology**, v. 6, n. 5, p. 1033–1046, 2008.

- BONIFACINO, J. S.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. Coat proteins: shaping membrane transport. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 4, n. May, p. 409–414, 2003.
- CAVALIER-SMITH, T. The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification on protozoa. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 297–354, 2002.
- CERVANTES, M. D. et al. Selecting One of Several Mating Types through Gene Segment Joining and Deletion in *Tetrahymena thermophila*. **PLoS Biology**, v. 11, n. 3, 2013.
- CEVALLOS, A. M. et al. Trypanosoma cruzi: Allelic comparisons of the actin genes and analysis of their transcripts. **Experimental Parasitology**, v. 103, n. 1–2, p. 27–34, 2003.
- CEVALLOS, A. M. et al. Trypanosoma cruzi : Multiple actin isovariants are observed along different developmental stages. **Experimental parasitology**, v. 127, p. 249–259, 2011.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiolojico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159-218, 1909.
- CHARRAS, G. T. A short history of blebbing. **Journal of Microscopy**, v. 231, n. 3, p. 466–478, 2008.
- CHENEY, R. E.; RILEY, M. A; MOOSEKER, M. S. Phylogenetic analysis of the myosin superfamily. **Cell motility and the cytoskeleton**, v. 24, n. 4, p. 215–223, 1993.
- CHOI, J.; EL-SAYED, N. M. Functional genomics of trypanosomatids. **Parasite Immunology**, v. 34, n. 2–3, p. 72–79, 2012.
- CLAYTON, C. E. Gene expression in Kinetoplastids. **Current Opinion in Microbiology**, v. 32, p. 46–51, 2016.
- CLAYTON, C.; SHAPIRA, M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 156, n. 2, p. 93–101, Dec. 2007.
- CUNHA-E-SILVA, N. et al. Reservosomes: Multipurpose organelles? **Parasitology Research**, v. 99, n. 4, p. 325–327, 2006.
- DAROCHA, W. D. et al. Tests of cytoplasmic RNA interference ( RNAi ) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 133, p. 175–186, 2004.
- DE MELO, L. D. et al. Evolutionary conservation of actin-binding proteins in *Trypanosoma cruzi* and unusual subcellular localization of the actin homologue. **Parasitology**, v. 135, n. 8, p. 955–965, 2008.
- DE SOUZA, D. A. S. et al. Evolutionary analyses of myosin genes in trypanosomatids show a history of expansion, secondary losses and neofunctionalization. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.
- DE SOUZA, W. et al. *Trypanosoma cruzi*: distribution of fluorescently labeled tubulin and actin in epimastigotes. **The Journal of parasitology**, v. 69, n. 1, p. 138–142, 1983.
- DE SOUZA, W. et al. Two special organelles found in *Trypanosoma cruzi*. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 72, n. 3, p. 420–432, 2000.

- DE SOUZA, W. Special organelles of some pathogenic protozoa. **Parasitology International**, v. 88, p. 1013–1025, 2002.
- DE SOUZA, W. Macro, micro and nano domains in the membrane of parasitic protozoa. **Parasitology International**, v. 56, n. 3, p. 161–170, 2007.
- DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M. U.; BARRIAS, E. S. Review on Trypanosoma cruzi: Host cell interaction. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, 2010.
- DE SOUZA, W.; SANT'ANNA, C.; CUNHA-E-SILVA, N. L. Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v. 44, n. 2, p. 67–124, 2009.
- DEATHERAGEA, B. L.; COOKSONA, B. T. Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: A conserved yet underappreciated aspect of microbial life. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 6, p. 1948–1957, 2012.
- DOCAMPO, R. et al. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n. 3, p. 251–261, 2005.
- DOCAMPO, R. et al. New insights into roles of acidocalcisomes and contractile vacuole complex in osmoregulation in protists. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 305, p. 69–113, 2013
- DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. J. The acidocalcisome. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 114, n. 2, p. 151–159, 2001.
- DRAEGER, A. et al. Dealing with damage: Plasma membrane repair mechanisms. **Biochimie**, n. Part A, p. 66–72, 2014.
- EL-SAYED, N. M. et al. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. **Science (New York, N.Y.)**, v. 309, n. 5733, p. 404–9, 15 Jul. 2005a.
- EL-SAYED, N. M. et al. The genome sequence of Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas disease. **Science (New York, N.Y.)**, v. 309, n. 5733, p. 409–15, 15 Jul. 2005b.
- FIELD, M. C.; CARRINGTON, M. The trypanosome flagellar pocket. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 775–786, 2009.
- FOTH, B. J.; GOEDECKE, M. C.; SOLDATI, D. New insights into myosin evolution and classification. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 10, p. 3681–6, 7 Mar. 2006.
- FRANKE DE CAZZULO, B. M. et al. Effects of proteinase inhibitors on the growth and differentiation of Trypanosoma cruzi. **FEMS Microbiology Letters**, v. 124, p. 81–86, 1994.
- FRÉNAL, K. et al. Plasticity between MyoC- and MyoA-Glideosomes: An Example of Functional Compensation in Toxoplasma gondii Invasion. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 11, 2014.
- FRÉNAL, K.; SOLDATI-FAVRE, D. Plasticity and Redundancy in Proteins Important for Toxoplasma Invasion. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 8, p. 1–6, 2015.
- GARCÍA-SALCEDO, J. A. et al. A differential role for actin during the life cycle of Trypanosoma brucei. **The EMBO journal**, v. 23, n. 4, p. 780–789, 2004.

- GLUENZ, E.; TAYLOR, M. C.; KELLY, J. M. The *Trypanosoma cruzi* metacyclic-specific protein Met-III associates with the nucleolus and contains independent amino and carboxyl terminal targeting elements. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 6, p. 617–625, May 2007.
- GOLDENBERG, S.; ÁVILA, A. R. Aspects of *Trypanosoma cruzi* Stage Differentiation. In: WEISS, L. M.; TANOWITZ, H. B.; KIRCHHOFF, L. V. (Eds.). . **Advances in Parasitology**. 1. ed. Amsterdã, Holanda: Elsevier Ltd., 2011. v. 75p. 285–305.
- GONÇALVES, C. S. et al. Revisiting the *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis: morphological and ultrastructural analyses during cell differentiation. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 83, 2018.
- GROLLEMUND, R. et al. Bantu expansion shows that habitat alters the route and pace of human dispersals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 43, p. 13296–13301, 2015.
- HAMILTON, P. B.; STEVENS, J. R. Classification and Phylogeny of *Trypanosoma cruzi*. In: TELLERIA, J.; TIBAYRENC, M. (EDS.). **American trypanosomiasis (Chagas disease) One hundred years of research**. London: Elsevier, 2010, p. 321-338.
- HEINTZELMAN, M. B. et al. Myosin Diversity in Apicomplexa. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 2, p. 429–432, 2001.
- HEISSLER, S. M.; SELLERS, J. R. Kinetic Adaptations of Myosins for Their Diverse Cellular Functions. **Traffic**, v. 17, n. 8, p. 839–859, 2016.
- HERNÁNDEZ, P. C. et al. Myosin B of *Plasmodium falciparum* (PfMyoB): in silico prediction of its three-dimensional structure and its possible interaction with MTIP. **Parasitology Research**, v. 116, n. 4, p. 1373–1382, 2017.
- HERNÁNDEZ, R. et al. Stationary phase in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes as a preadaptive stage for metacyclogenesis. **Parasitology Research**, v. 111, n. 2, p. 509–514, 2012.
- IVENS, A. C. et al. The Genome of the Kinetoplastid Parasite, *Leishmania major*. **Science (New York, N.Y.)**, v. 309, n. 5733, p. 436–442, 2005.
- JACKSON, A. P. et al. Kinetoplastid Phylogenomics Reveals the Evolutionary Innovations Associated with the Origins of Parasitism. **Current Biology**, v. 26, n. 2, p. 161–172, 2016.
- JANOUSKOVEC, J.; KEELING, P. J. Evolution: Causality and the origin of parasitism. **Current Biology**, v. 26, n. 4, p. R174–R177, 2016.
- JIMENEZ, V. Dealing with environmental challenges: mechanisms of adaptation in *Trypanosoma cruzi*. **Research in Microbiology**, v. 165, n. 3, p. 155–165, 2014.
- KAKSONEN, M.; TORET, C. P.; DRUBIN, D. G. Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 6, p. 404–414, 2006.
- KALB SOUZA, L. C. et al. Actin expression in trypanosomatids (Euglenozoa: Kinetoplastea). **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 5, p. 631–636, 2013.
- KALHAMMER, G.; BÄHLER, M. Unconventional myosins. **Essays in Biochemistry**, v. 35, p. 33–42, 2000.

- KATTA, S. S. et al. Trafficking activity of myosin XXI is required in assembly of *Leishmania* flagellum. **Journal of cell science**, v. 123, p. 2035–2044, 2010.
- KATTA, S. S.; SAHASRABUDDHE, A. A.; GUPTA, C. M. Flagellar localization of a novel isoform of myosin, myosin XXI, in *Leishmania*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 164, n. 2, p. 105–110, 2009.
- KAUFER, A. et al. The evolution of trypanosomatid taxonomy. **Parasites & vectors**, v. 10, n. 1, p. 287, 2017.
- KOLLMAR, M.; MÜHLHAUSEN, S. Myosin repertoire expansion coincides with eukaryotic diversification in the Mesoproterozoic era. **BMC Evolutionary Biology**, v. 17, n. 1, p. 211, 2017.
- KOSTER, D. V.; MAYOR, S. Cortical actin and the plasma membrane: inextricably intertwined. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 38, p. 81–89, 2016.
- KRENDEL, M.; MOOSEKER, M. S. Myosins: tails (and heads) of functional diversity. **Physiology (Bethesda, Md.)**, v. 20, n. 4, p. 239–51, Aug. 2005.
- LUKES, J. et al. Kinetoplast DNA Network: Evolution of an Improbable Structure MINIREVIEW Kinetoplast DNA Network: Evolution of an Improbable Structure. **Eukaryotic Cell**, v. 1, n. 4, p. 495–502, 2002.
- MANNA, P. T.; KELLY, S.; FIELD, M. C. Adaptin evolution in kinetoplastids and emergence of the variant surface glycoprotein coat in African trypanosomatids. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 67, n. 1, p. 123–128, 2013.
- MARION, S. et al. Overexpression of myosin IB in living *Entamoeba histolytica* enhances cytoplasm viscosity and reduces phagocytosis. **Journal of cell science**, v. 117, n. Pt 15, p. 3271–3279, 2004.
- MEISSNER, M.; FERGUSON, D. J. P.; FRISCHKNECHT, F. Invasion factors of apicomplexan parasites: Essential or redundant? **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 438–444, 2013.
- MENNA-BARRETO, R. F. S.; DE CASTRO, S. L. The double-edged sword in pathogenic trypanosomatids: The pivotal role of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.
- MORENO, B. et al. 31P NMR spectroscopy of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, and *Leishmania major*. Evidence for high levels of condensed inorganic phosphates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 37, p. 28356–28362, 2000.
- MORRISSETTE, N. S.; SIBLEY, L. D. Cytoskeleton of Apicomplexan Parasites. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 1, p. 21–38, 2002.
- MORTARA, R. A. Studies on Trypanosomatid Actin I. Immunochemical and Biochemical Identification. **The Journal of Protozoology**, v. 36, n. 1, p. 8–13, 1989.
- MUELLER, C.; GRAINDORGE, A.; SOLDATI-FAVRE, D. Functions of myosin motors tailored for parasitism. **Current Opinion in Microbiology**, v. 40, p. 113–122, 2017.
- NAVARRO, M.; ASKUE, J.; CONTRERAS, V. Morphological comparison of axenic amastigogenesis of trypomastigotes and metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. January, p. 81–91, 2003.

- NÁZER, E.; VERDÚN, R. E.; SÁNCHEZ, D. O. Nucleolar localization of RNA binding proteins induced by Actinomycin D and heat shock in *Trypanosoma cruzi*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, 2011.
- NUNES, M. C. P. et al. Chagas disease: An overview of clinical and epidemiological aspects. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 9, p. 767–776, 2013.
- ODRONITZ, F.; KOLLMAR, M. Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species. **Genome biology**, v. 8, n. 9, p. R196, 2007.
- OLSON, M. O. J. Sensing Cellular Stress : Another New Function for the Nucleolus? **Science's STKE**, v. 224, 2004.
- OPPERDOES, F. R. et al. Comparative Metabolism of Free-living Bodo saltans and Parasitic Trypanosomatids. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 63, n. 5, p. 657–678, 2016.
- PAPADOPULOS, A. Membrane shaping by actin and myosin during regulated exocytosis. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 84, p. 93–99, 2017.
- PARK, S. Y.; GUO, X. Adaptor protein complexes and intracellular transport. **Bioscience Reports**, v. 34, n. 4, p. 381–390, 2014.
- PARSONS, M. Glycosomes: Parasites and the divergence of peroxisomal purpose. **Molecular Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 717–724, 2004.
- PENG, D. et al. CRISPR-Cas9-mediated single-gene and gene family disruption in *Trypanosoma cruzi*. **mBio**, v. 6, n. 1, p. 1–11, 2015.
- POLLARD, T. D. Actin and actin-binding proteins. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 2016.
- PORTO-CARREIRO, I. et al. *Trypanosoma cruzi* epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytostome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes. **European journal of cell biology**, v. 79, n. 11, p. 858–869, 2000.
- PROVANCE, D. W. et al. Myosin-Vb functions as a dynamic tether for peripheral endocytic compartments during transferrin trafficking. **BMC cell biology**, v. 9, n. 1, p. 44, 2008.
- RICHARDS, T. A.; CAVALIER-SMITH, T. Myosin domain evolution and the primary divergence of eukaryotes. **Nature**, v. 436, n. 7054, p. 1113–8, 2005.
- RODRÍGUEZ, A. et al. Host cell invasion by trypanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport. **The Journal of Cell Biology**, v. 134, n. 2, p. 349–362, 1996.
- ROMAGNOLI, B. A. A. et al. Improvements in the CRISPR/Cas9 system for high efficiency gene disruption in *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 178, n. December, p. 190–195, 2018.
- 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. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 134, n. 1, p. 105–114, 2004.
- SANT'ANNA, C. et al. Subcellular proteomics of *Trypanosoma cruzi* reservosomes. **Proteomics**, v. 9, n. 7, p. 1782–1794, 2009.

- SANT'ANNA, C.; SOUZA, W. DE; CUNHA-E-SILVA, N. Biogenesis of the Reservosomes of *Trypanosoma cruzi*. **Microscopy Microanalysis**, v. 10, p. 637–646, 2004.
- SEBÉ-PEDRÓS, A. et al. Evolution and classification of myosins, a pan-eukaryotic whole-genome approach. **Genome Biology and Evolution**, v. 6, n. 2, p. 290–305, 2014.
- SHIFRIN, D. A. et al. Extracellular vesicles: communication, coercion, and conditioning. **Molecular Biology of the Cell**, v. 24, n. 9, p. 1253–1259, 2013.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral transmission of chagas disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 6, p. 845–852, 2012.
- SIMPSON, A. G. B.; STEVENS, J. R.; LUKES, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends in parasitology**, v. 22, n. 4, p. 168–74, Apr. 2006.
- SLEATOR, R. D. Phylogenetics. **Archives of Microbiology**, v. 193, p. 235–239, 2011.
- SOARES, M. J.; SOUTO-PADRÓN, T.; DE SOUZA, W. Identification of a large pre-lysosomal compartment in the pathogenic protozoon *Trypanosoma cruzi*. **Journal of cell science**, v. 102 ( Pt 1), p. 157–167, 1992.
- SOARES, M. J. The Reservosome of *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes: An Organelle of the Endocytic Pathway with a Role on Metacyclogenesis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. SUPPL. 1, p. 139–141, 1999.
- SOARES MEDEIROS, L. C. et al. Rapid, selection-free, high-efficiency genome editing in protozoan parasites using CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. **mBio**, v. 8, n. 6, p. 1–15, 2017.
- SOSA-ESTANI, S.; SEGURA, E. L. Integrated control of chagas disease for its elimination as public health problem - A review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 289–298, 2015.
- SOUZA, W. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, n. 4, p. 269–285, 2002.
- SOUZA, W. DE. Electron microscopy of trypanosomes - a historical view. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 4, p. 313–325, 2008.
- SOUZA, W. DE; ATTIAS, M. Subpellicular Microtubules in Apicomplexa and Trypanosomatids. In: SOUZA, W. **Structures and Organelles in Pathogenic Protist**. Springer Berlin Heidelberg, 2010. v. 17, p. 27-62.
- SPITZNAGEL, D. et al. Identification and characterization of an unusual class I myosin involved in vesicle traffic in *Trypanosoma brucei*. **PLoS ONE**, v. 5, n. 8, 2010.
- STAMATAKIS, A. Phylogenetics: Applications, software and challenges. **Cancer Genomics and Proteomics**, v. 2, n. 5, p. 301–305, 2005.
- STANAWAY, J. D.; ROTH, G. The Burden of Chagas Disease Estimates and Challenges. **Global Heart**, v. 10, n. 3, p. 139–144, 2015.
- STEVENS, J. R. et al. The Molecular Evolution of Trypanosomatidae. **Advances in Parasitology**, v. 48, p. 2–55, 2001.
- SUGITA, M. et al. Unique sequences and predicted functions of myosins in *Tetrahymena thermophila*. **Gene**, v. 480, n. 1–2, p. 10–20, 2011.

- SZUL, T.; SZTUL, E. COPII and COPI Traffic at the ER-Golgi Interface. **Physiology**, v. 26, n. 5, p. 348–364, 2011.
- THOMPSON, R. F.; LANGFORD, G. M. Myosin superfamily evolutionary history. **Anatomical Record**, v. 268, n. 3, p. 276–289, 2002.
- THORNE, J. L. Models of protein sequence evolution and their applications. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 10, n. 6, p. 602–605, 2000.
- TOMAS, A. M.; MILES, M. A.; KELLY, J. M. Overexpression of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, is associated with enhanced metacyclogenesis. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 244, n. 2, p. 596–603, 1997.
- TORRECILHAS, A. C. et al. Vesicles as carriers of virulence factors in parasitic protozoan diseases. **Microbes and Infection**, v. 14, n. 15, p. 1465–1474, 2012.
- TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 472–481, 2001.
- VANRELL, M. C. et al. The regulation of autophagy differentially affects *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 11, p. 1–23, 2017.
- VIDAL, J. C. et al. Lysosome-like compartments of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes may originate directly from epimastigote reservosomes. **Parasitology**, v. 144, n. 6, p. 841–850, 2017.
- VIDAL, J. C.; DE SOUZA, W. Morphological and Functional Aspects of Cytoskeleton of Trypanosomatids. In: JIMENEZ-LOPEZ, J. C. (Ed.). **Cytoskeleton - Structure, Dynamics, Function and Disease**. Intech, 2017, p. 55-71.
- VIEIRA, M. et al. Role for a P-type H<sup>+</sup>-ATPase in the acidification of the endocytic pathway of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical Journal**, v. 392, n. 3, p. 467–474, 2005.
- WEATHERLY, D. B.; BOEHLKE, C.; TARLETON, R. L. Chromosome level assembly of the hybrid *Trypanosoma cruzi* genome. **BMC Genomics**, v. 10, n. 1, p. 255, 2009.
- WHEELER, R. J.; GLUENZ, E.; GULL, K. The limits on trypanosomatid morphological diversity. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, 2013.
- WHO (World Health Organization). **Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected diseases**. Geneva: WHO Document Production Services, 211 p., 2015.
- WOOLNER, S.; BEMENT, W. M. Unconventional myosins acting unconventionally. **Trends in cell biology**, v. 19, n. 6, p. 245–52, 2009.
- YANG, Z.; RANNALA, B. Molecular phylogenetics: Principles and practice. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 5, p. 303–314, 2012.
- YAZAKI, E. et al. Global Kinetoplastea phylogeny inferred from a large-scale multigene alignment including parasitic species for better understanding transitions from a free-living to a parasitic lifestyle. **Genes & Genetic Systems**, v. 92, n. 1, p. 35-42, 2017.
- ZINGALES, B. et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 240–253, 2012.



## Cystic fibrosis in Afro-Brazilians: *XK* haplotypes analysis supports the European origin of *p.F508del* mutation

D. A. S. de Souza<sup>1,2,9</sup> · F. R. Faucz<sup>1,3</sup> · R. B. de Alexandre<sup>1</sup> · M. A. Santana<sup>4</sup> ·  
E. L. S. de Souza<sup>5</sup> · F. J. C. Reis<sup>6</sup> · L. Pereira-Ferrari<sup>7</sup> · V. S. Sotomaior<sup>1</sup> · L. Culp<sup>7</sup> ·  
J. A. Phillips III<sup>8</sup> · S. Raskin<sup>1</sup>

Received: 8 July 2016 / Accepted: 30 November 2016 / Published online: 3 February 2017  
© Springer International Publishing Switzerland 2017

**Abstract** Cystic fibrosis (CF) is a common autosomal recessive disorder, being the *p.F508del* the most frequent mutation. Also, a nearby restriction fragment length polymorphism (RFLP) named *XK* (*KM19* and *XV2C*) is non-randomly associated with specific CF alleles. Our aim was to analyze the occurrence of the *p.F508del* mutation and *XK* haplotypes in Afro-Brazilians CF patients and controls, since these data is available for the other two main ethnic groups found in Brazil (Euro-Brazilians and Brazilian Amerindians), contributing for the whole comprehension of these haplotypes in the Brazilian population. A total of 103 patients and 54 controls were studied. PCR and PCR-RFLP methodologies were used to identify the presence of the *p.F508del* and the *XK* haplotype in the subjects. The combined data show that 84.2% of *p.F508del* mutation is associated with haplotype B and only 15.8% with haplotype A; no other haplotypes were found to be associated with this mutation. Our data suggest that the occurrence of *p.F508del* mutation and haplotype B in Afro-Brazilian patients occurs probably due to admixture with

Euro-descendants. Therefore this mutation and haplotype could be used as a admixture marker.

**Keywords** Cystic fibrosis · *CFTR* · *XK* haplotypes · *p.F508del* · Afro-Brazilians

### Introduction

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive disorder with an estimated incidence in Euro-Brazilians of about 1 in 7576 live births, corresponding to a carrier frequency of about 1 in 44 (Raskin et al. 2008). The incidence is lower in Afro-Brazilians being estimated as 1 in 14 085 live births corresponding to a carrier frequency of about 1 in 60 (Raskin et al. 2003). Since the CF gene was mapped to chromosome 7 in 1985, a variety of DNA segments tightly linked to the CF gene have been identified (Estivill et al. 1987a; Knowlton et al. 1985). These segments contain a variety of restriction fragment length polymorphisms

✉ D. A. S. de Souza  
denise\_andreass@yahoo.com.br

<sup>1</sup> Group for Advanced Molecular Investigation (NIMA), School of Health and Biosciences, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, Paraná, Brazil

<sup>2</sup> Functional Genomics Laboratory, Carlos Chagas Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Curitiba, Paraná, Brazil

<sup>3</sup> Section on Endocrinology and Genetics, Program on Developmental Endocrinology and Genetics, Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development (NICHD), NIH, Bethesda, MD 20892, USA

<sup>4</sup> Octávio Mangabeira Hospital, Reference Center of Cystic Fibrosis, Salvador, Bahia, Brazil

<sup>5</sup> Pediatric Division, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

<sup>6</sup> Pneumology Division, Department of Pediatrics, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>7</sup> Department of Biomedicine, UniBrasil, Curitiba, Paraná, Brazil

<sup>8</sup> Division of Medical Genetics and Genomic Medicine, Department of Pediatrics, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN, USA

<sup>9</sup> 61H Travessa Chile, São José dos Pinhais, Paraná 83035-200, Brazil

## REVIEW ARTICLE

## Correspondence:

Salmo Raskin, Group for Advanced Molecular Investigation (NIMA), School of Health and Biosciences, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Saldanha Marinho St, 1782 Curitiba, Paraná 80730-180, Brazil.  
E-mail: s.raskin@genetica.com.br

## Keywords:

assisted reproductive techniques, *CFTR*, congenital bilateral absence of the vas deferens, cystic fibrosis, genetic counseling, infertility

Received: 10-Aug-2016

Revised: 2-Sep-2017

Accepted: 7-Nov-2017

doi:10.1111/andr.12450

## Congenital bilateral absence of the vas deferens as an atypical form of cystic fibrosis: reproductive implications and genetic counseling

<sup>1,2</sup>D. A. S. de Souza, <sup>1,3</sup>F. R. Fauz, <sup>4</sup>L. Pereira-Ferrari, <sup>1</sup>V. S. Sotomaior and <sup>1</sup>S. Raskin

<sup>1</sup>Group for Advanced Molecular Investigation (NIMA), School of Health and Biosciences, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, PR, Brazil, <sup>2</sup>Functional Genomics Laboratory, Carlos Chagas Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Curitiba, PR, Brazil, <sup>3</sup>Section on Endocrinology & Genetics, Program on Developmental Endocrinology & Genetics, Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development (NICHD), NIH, Bethesda, MD, USA, and <sup>4</sup>Department of Biomedicine, Unibrasil, Curitiba, PR, Brazil

## SUMMARY

Congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD) is found in 1% to 2% of males with infertility and is present in 6% of obstructive azoospermia cases. Nearly 95% of men with cystic fibrosis (CF, an autosomal recessive disorder) have CBAVD. There are genetic links between CBAVD and CF. Some mutations in the gene encoding cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) can lead to CBAVD as a monosymptomatic form of CF. With the use of assisted reproductive techniques (ART), especially testicular or epididymal sperm aspiration, intracytoplasmic sperm injection, and in vitro fertilization, it is possible that men with CBAVD can produce offspring. Therefore, genetic counseling should be offered to couples undergoing ART to discuss the probability of having offspring that carry *CFTR* gene mutations. The aim of this review was to present the main cause of CBAVD, to call attention to its implications for assisted reproduction, and to show the importance of genetic counseling for couples where men have CBAVD, as they can have offspring with a lethal disease.

## INTRODUCTION

About one in every six to ten couples has fertility problems. Subfertility originates from males in 20–25% of the cases, from females in 30–40% of the cases, and from both in 30% of the cases. The causes of subfertility remain unknown in 15% of the cases (World Health Organization, 1997). Among the 20–25% of males with subfertility, CBAVD accounts for 1–2% (Hussein *et al.*, 2011). Diagnosis of CBAVD is generally based on these criteria: the presence of normal- to slightly small-sized testicles, non-palpable vas deferens, normal plasma levels of FSH (follicle-stimulating hormone), and reduced ejaculate volume (<1 mL). Semen characteristics are as follows: azoospermic, acidic pH, undetectable or low fructose concentrations (normal: >25  $\mu$ M) (Boucher *et al.*, 1999),  $\alpha$ -glucosidase less than or equal to 5 mIU/ejaculate (normal: greater than or equal to 35 mIU/ejaculate) and carnitine less than or equal to 40 nm/ejaculate (normal: more than 260 nm/ejaculate) (Boucher *et al.*, 1999), and production of spermatozoa in the testicles.

When CBAVD is the only manifestation in a patient who harbors at least one mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene, this condition is known as the genital form of cystic fibrosis (CF) (Anguiano *et al.*, 1992; Chillón *et al.*, 1995) and can be named CF-CBAVD. CF is an autosomal recessive genetic disease frequent in Euro-descendant populations, occurring in one of 2,000 newborns (Wainwright *et al.*, 1985; Boat *et al.*, 1989). Its incidence varies among different ethnic groups, with lower incidences in non-Euro-descendant populations. In Afro-descendants, the incidence varies from one in 14,000 to one in 17,000 newborns (Boat *et al.*, 1989; Fitzsimmons, 1993; Hamosh *et al.*, 1998), while in Asian populations, the frequency is one in 90,000 newborns (Boat *et al.*, 1989). The frequency of disease-causing mutation carriers is one in 20 in certain populations (Wainwright *et al.*, 1985).

Clinically, typical CF is characterized by chronic pulmonary obstruction, pancreatic insufficiency, high electrolyte concentration in sweat ('salty sweat') (White *et al.*, 1985), male infertility