

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA
(PGBB) - INSTITUTO CARLOS CHAGAS

BEATRIZ SANTANA BORGES

LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DA ACTINA 2 EM *Trypanosoma cruzi*:
PRODUÇÃO DE SORO POLICLONAL E DE PARASITAS TRANSFECTANTES

CURITIBA

2016

BEATRIZ SANTANA BORGES

LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DA ACTINA 2 EM *Trypanosoma cruzi*:
PRODUÇÃO DE SORO POLICLONAL E DE PARASITAS TRANSFECTANTES

Orientadores: Dr. Maurilio José
Soares e Dra. Lia Carolina Soares
Medeiros

CURITIBA

2016

RESUMO

O protozoário *Trypanosoma cruzi* possui um citoesqueleto diferenciado, baseado em um arcabouço de microtúbulos subpeliculares. Entretanto, o papel de outros componentes do citoesqueleto, como a actina, ainda permanece pouco explorado. Até o momento foram identificados no genoma de *T. cruzi* ao menos quatro genes codificadores para diferentes isoformas dessa proteína. No entanto, uma caracterização completa dessas isoformas ainda não foi realizada. Neste contexto, a presente dissertação teve por objetivo determinar a expressão e imunolocalização específica de uma das isoformas de actina, a actina 2. A partir de análise *in silico* encontramos que a actina 2 é uma isoforma exclusiva de *T. cruzi*, com 51% de identidade quando comparada à isoforma mais conservada em eucariontes (actina 1). Para obtenção do soro policlonal, uma sequência de 14 aminoácidos correspondente a uma região não conservada da actina 2 foi utilizada para imunizar camundongos. Ensaio de imunofluorescência demonstraram que a actina 2 é distribuída por todo o corpo celular do parasita, predominantemente na região perinuclear em formas epimastigotas. Em formas tripomastigotas uma minoria das células demonstrou essa marcação perinuclear, enquanto que em amastigotas a marcação mostrou-se dispersa pelo corpo do parasita. Ainda, a sequência da actina 2 foi inserida em um cassete baseado na tecnologia Gateway, contendo a etiqueta comercial FLAG (nas posições C e N-terminal) ou GFP. Os cassetes foram transfectados em formas epimastigotas e, após seleção, a presença do cassete foi confirmada por *Western blot* e PCR. A localização subcelular por imunofluorescência indireta da etiqueta FLAG (C-terminal) mostrou que a inserção da etiqueta não afetou o endereçamento da proteína, quando comparado aos resultados obtidos com o soro policlonal, diferentemente das outras construções obtidas. Ensaio de imunomarcagem de formas epimastigotas por microscopia eletrônica de transmissão demonstrou uma marcação dispersa pelo corpo do parasita, confirmando os resultados obtidos por imunofluorescência. Nossos resultados indicam que o uso de parasitas geneticamente modificados e de anticorpos policlonais específicos permite uma avaliação mais precisa da imunolocalização de diferentes isoformas de uma mesma proteína de *T. cruzi*. Além disso, a imunolocalização da actina 2 difere daquela obtida com actina 1 por outros autores, que demonstraram uma marcação dispersa por todo o corpo do parasita, sugerindo assim que essas isoformas podem ter funções diferentes. Nossos dados abrem um leque de possibilidades no estudo da localização subcelular e função de cada uma das isoformas de actina de *T. cruzi*.

Palavras-chave: Actina, citoesqueleto, imunolocalização, *Trypanosoma cruzi*

ABSTRACT

The protozoan *Trypanosoma cruzi* presents a differentiated cytoskeleton, based on a sub-pellicular corset of microtubules. However, the role of other cytoskeleton components, such as actin, still remains poorly understood. Up to now at least four genes coding different isoforms of this protein were found in the genome of *T. cruzi*, but a full characterization of these isoforms has not yet been performed. In this context, the present dissertation aimed to determine the expression and specific immunolocalization of one of the actin isoforms. By *in silico* analysis we found that actin 2 is an exclusive isoform of *T. cruzi*, with 51% identity when compared with the most conserved isoform of other eukaryotic cells (actin 1). Thus, a sequence of 14 amino acids corresponding to a non-conserved region of actin 2 was used to immunize mice in order to obtain a polyclonal serum. Immunofluorescence assay showed that actin 2 is distributed throughout the cell body of the parasites, mainly in the perinuclear region of epimastigotes. In trypomastigotes few parasites showed this perinuclear localization, while in amastigotes labeling was found dispersed through the cell body. Furthermore, the sequence of actin 2 was inserted into a cassette based on the Gateway technology containing a commercial tag FLAG (both C and N-terminal) or GFP. The cassettes were transfected into epimastigote forms and after selection, the cassette presence was confirmed by Western blot and PCR. Subcellular localization by immunofluorescence of the C-terminal FLAG tag showed that insertion of the label did not affect the addressing of the protein, when compared to the results obtained with polyclonal serum, unlike the other obtained constructs. Immunolocalization assays with epimastigotes demonstrated labeling dispersed through the parasite body, confirming the results obtained by immunofluorescence. Our results indicate that use of genetically modified parasites and specific polyclonal antibodies allow a more precise immunolocalization of different isoforms of the same protein in *T. cruzi*. Furthermore, immunolocalization of actin 2 differs from that obtained by other authors with actin 1 (dispersed in the cytoplasm), suggesting that these isoforms may have different cellular functions. Our data open up a range of possibilities in the study of subcellular localization and function of each one of the actin isoforms in *T. cruzi*

Key words: Actin, cytoskeleton, immunolocalization, *Trypanosoma cruzi*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> E A DOENÇA DE CHAGAS.....	7
1.2 CITOESQUELETO.....	10
1.3 ACTINA.....	11
1.4 ACTINA E ENDOCITOSE.....	14
1.5 ACTINA EM TRIPANOSOMATIDEOS.....	15
1.6 ACTINA EM <i>T. cruzi</i>	17
2. OBJETIVOS.....	19
2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DO GENE DA ACTINA 2.....	20
3.2 CULTIVO DE <i>T. cruzi</i>	20
3.2.1 Epimastigotas.....	20
3.2.2 Tripomastigotas.....	21
3.2.3 Amastigotas.....	21
3.3 OBTENÇÃO DE PARASITAS EXPRESSANDO ACTINA 2 RECOMBINANTE FUSIONADA A ETIQUETA FLAG OU GFP.....	22
3.3.1 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>).....	22
3.3.2 Extração de DNA.....	23
3.3.3 Amplificação e clonagem do gene da actina 2 pela plataforma Gateway®.....	24
3.3.4 Purificação por fenol/clorofórmio.....	25
3.3.5 Montagem do vetor de entrada (pDONR™221).....	25
3.3.6 Preparo de células cálcio-competentes.....	26
3.3.7 Transformação de bactérias.....	26
3.3.8 Minipreparação de plasmídeos.....	27
3.3.9 Montagem do vetor de expressão (pNEO3xFlag).....	27
3.3.10 Amplificação e clonagem da região a jusante (<i>downstream</i>) – C-terminal.....	28
3.3.11 Seleção de clones positivos por PCR de colônia.....	29

3.3.12	Amplificação, digestão e purificação dos cassetes “ACT2/NEO/FLAG/DOWNSTREAM” para transfecção em <i>T. cruzi</i>	30
3.3.13	Montagem do vetor de expressão (pNEO_GFP).....	31
3.4	TRANSFECÇÃO DAS FORMAS EPIMASTIGOTAS DE <i>T. cruzi</i>	32
3.5	OBTENÇÃO DO EXTRATO DE PROTEÍNAS	32
3.6	WESTERN BLOTTING	33
3.6.1	Análise de expressão de Actina 2 em diferentes formas evolutivas.....	33
3.7	EXPRESSÃO HETERÓLOGA E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNA	34
3.8	PEPTÍDEO PARA INÓCULO DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DE SORO POLICLONAL	35
3.8.1	Obtenção de soro policlonal	36
3.8.2	<i>Dot Blotting</i>	36
3.8.3	Cultivo de células de Mieloma (Ag8.65)	37
3.8.4	Esplenectomia	37
3.8.5	Produção dos hibridomas	37
3.8.6	Triagem dos hibridomas de interesse.....	38
3.9	IMUNOLOCALIZAÇÃO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA	39
3.10	IMUNOLOCALIZAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRONICA DE TRANSMISSÃO.....	40
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1	ANÁLISE <i>IN SILICO</i>	42
4.2	ANTICORPO POLICLONAL	47
4.3	PARASITAS TRANSFECTANTES.....	61
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Trypanosoma cruzi* E A DOENÇA DE CHAGAS

Tripanosomatídeos são protozoários flagelados pertencentes à família Trypanosomatidae (ordem Kinetoplastea). Esta família inclui parasitas de grande importância médica como *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma cruzi*. Estes protozoários são caracterizados pela presença de uma mitocôndria única contendo uma região especializada que concentra todo o DNA mitocondrial, conhecida como cinetoplasto. Além da arquitetura única de DNA mitocondrial, os protozoários da ordem Kinetoplastea possuem muitos outros aspectos peculiares, tais como: trans-splicing de todo o mRNA transcrito, organização dos genes em clusters, compartimentalização da glicólise e a habilidade de evitar a sua degradação migrando dos vacúolos fagocíticos (SIMPSON, 2006).

As doenças causadas por esses parasitas, por estarem frequentemente associadas a populações desfavorecidas, que têm acesso precário a atendimentos apropriados e a potencialmente longos períodos para o desenvolvimento de patologias, têm sido difíceis de serem estudadas e quantificadas (HOLLINGSWORTH, 2015).

O *Trypanosoma cruzi* é o agente causador da doença de Chagas (ou tripanossomíase americana) que representa a terceira maior carga de doença parasitária após malária e esquistossomose (GUZMAN-BRACHO, 2001). Sem vacina ou droga de tratamento efetivo (as poucas drogas disponíveis exibem efeitos colaterais tóxicos), a principal estratégia para controle permanece na prevenção da transmissão pelos insetos vetores e pela transfusão de sangue (TEIXEIRA, 2012).

A doença de Chagas é endêmica da América Latina e tem sido dispersa até outras partes do mundo, incluindo América do Norte, Europa e Austrália (RASSI, 2010). É estimado que mais de 8 milhões de pessoas no mundo inteiro

estejam infectadas, porém, como muitos casos podem passar despercebidos, o número real de infecções pode ser maior do que isso. Um estudo realizado recentemente estima que aproximadamente mais de 600 milhões de dólares são gastos em cuidados médicos com esta doença (LEE, 2010). Entretanto, como a doença de Chagas pode resultar em doenças crônicas do coração após anos assintomáticos, a maioria desses gastos podem aumentar no futuro.

Os triatomíneos dos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* são os vetores mais comuns desta doença, e são mais popularmente conhecidos como “barbeiros”. Estes insetos se alimentam do sangue de mamíferos e quando fazem o seu repasto sanguíneo, se estiverem infectados, liberam as formas tripomastigotas metacíclicas em suas fezes, próximo ao local da picada. Os tripomastigotas metacíclicos entram no hospedeiro pela ferida da picada ou até por mucosas intactas, como as conjuntivas. Dentro do hospedeiro, os tripomastigotas invadem as células próximas ao local da inoculação, onde se diferenciam em amastigotas intracelulares. Estes amastigotas se multiplicam por fissão binária e se diferenciam em tripomastigotas novamente, sendo então liberados na corrente sanguínea. Estes tripomastigotas sanguíneos infectam vários tipos de células e tecidos e se transformam em amastigotas nos novos sítios de infecção. Normalmente, as manifestações clínicas durante a fase aguda da doença são provenientes desse ciclo infectivo. Na corrente sanguínea, os tripomastigotas não se replicam (diferente da tripanossomíase africana). Essa replicação recomeça apenas quando o parasita entra em outra célula ou é ingerido por outro vetor. Desta forma, o “barbeiro” se torna infectado quando se alimenta do sangue de um humano ou outro mamífero que contém o parasita circulante. Após a ingestão desses parasitas, eles se diferenciam em epimastigotas no intestino do inseto, onde se multiplicam, e posteriormente se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, reiniciando o ciclo (Figura 1).

T. cruzi também pode ser transmitido via transfusão sanguínea, transplante de órgãos, via oral ou placentária (Centers For Disease Control And Prevention, 2014).

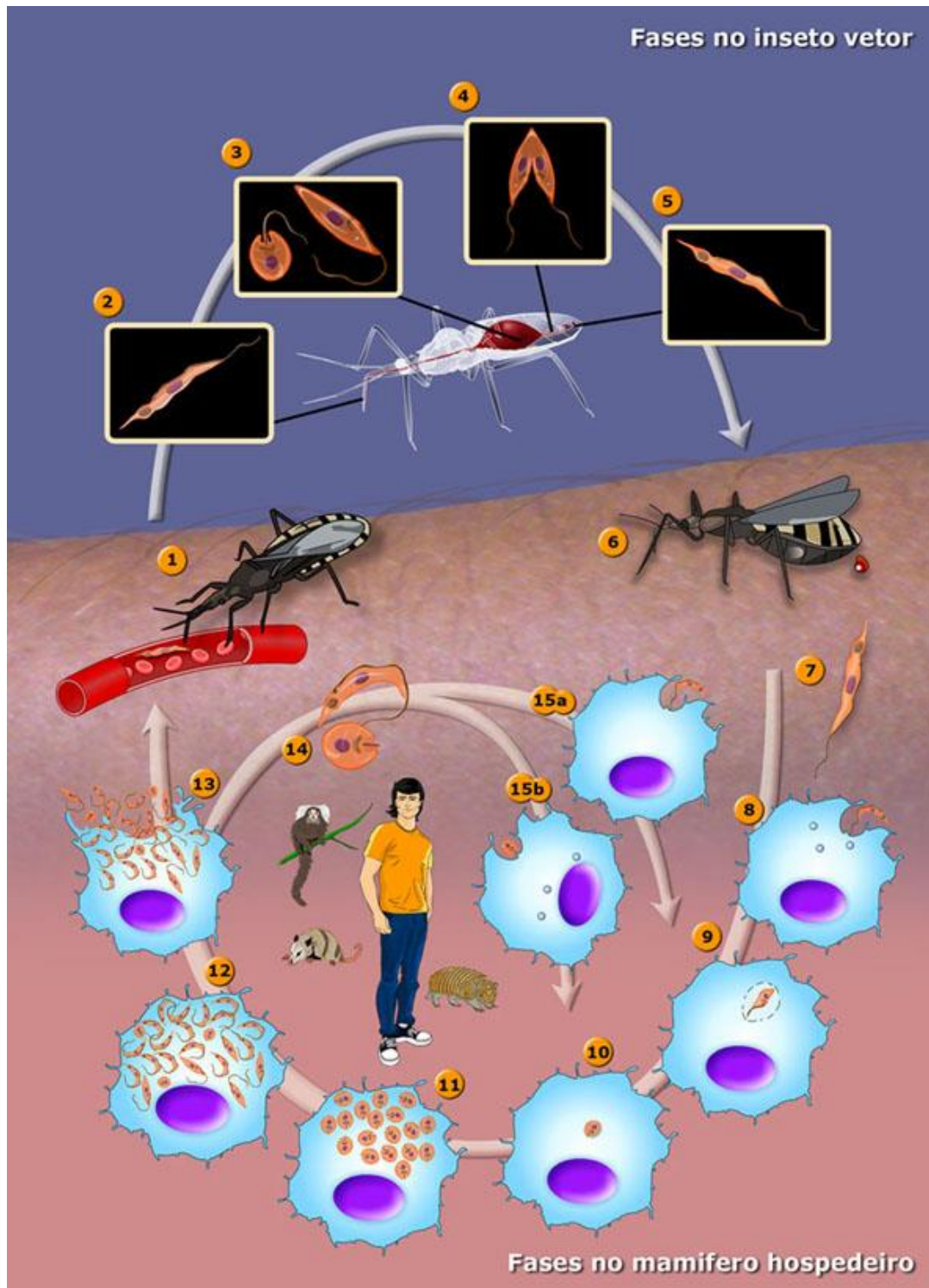


Figura 1. Ciclo de vida do *T. cruzi*. Fonte: Atlas Didático - O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* (TEIXEIRA, 2011).

Uma vez que se desenvolve através de um ciclo de vida complexo envolvendo o trato digestivo de insetos vetores e o interior das células hospedeiras de mamíferos, *T. cruzi* está sujeito à muitos estresses ambientais, que exigem drásticas mudanças morfológicas e fisiológicas. Desta forma, para

sua adaptação são necessárias mudanças significativas, por exemplo, na organização do seu citoesqueleto (ELIAS, 2007).

1.2 CITOESQUELETO

Os tripanosomatídeos possuem um citoesqueleto diferenciado, que, diferentemente de *Amoebae*, contém preferencialmente microtúbulos à microfilamentos e filamentos intermediários na maior parte de seu citoesqueleto (SAHASRABUDDHE 2015). Nestes protozoários, os microtúbulos formam uma rede subpelicular que se mantém intacta durante todo o ciclo celular. Porém, à medida que o ciclo celular progride, a célula precisa construir um novo complexo de microtúbulos e um novo flagelo para as duas células filhas (SHERWIN AND GULL, 1989).

Em *T. cruzi* foi observada por meio de microscopia eletrônica de transmissão a presença dessa rede de microtúbulos subpeliculares distribuídos por todo o corpo do parasita, exceto na região da bolsa flagelar. Esses microtúbulos mantêm uma distância constante um do outro, de aproximadamente 44 nm, e da membrana plasmática, de aproximadamente 12 nm como pode ser observado na figura 2 (SOUTO-PADRÓN, 1984).

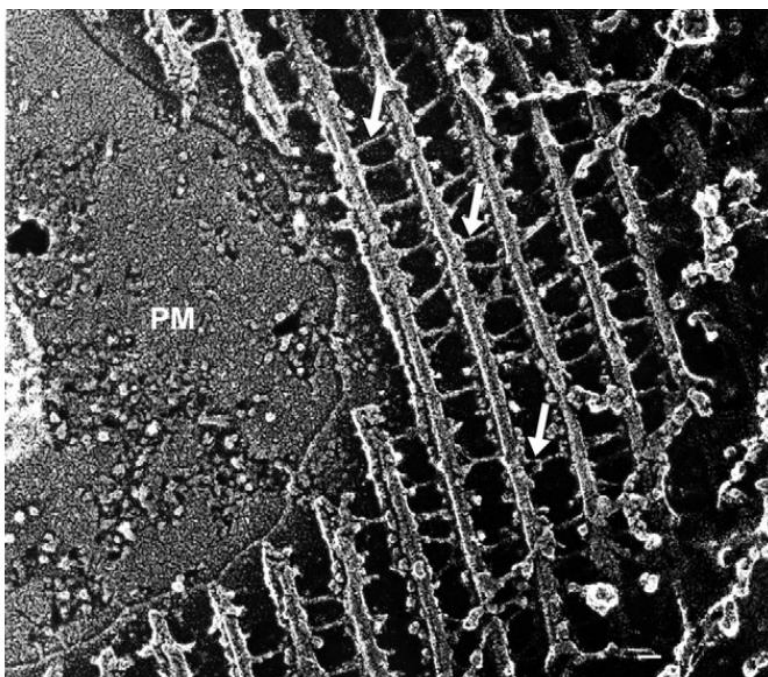


Figura 2. Ultra estrutura de microtúbulos subpeliculares em *T. cruzi*. Técnica de *deep-etching* mostrando porções da membrana plasmática (PM) e a camada subpelicular de microtúbulos. Setas mostram a conexão entre os filamentos. Barra = 100 nm (Souto-Padron et al. 1984).

Actina, outra importante proteína do citoesqueleto, é essencial para a estrutura e dinâmica da maioria das células eucarióticas, o que sugere que essa proteína desempenhe um papel semelhante em tripanosomas. Entretanto, há poucos dados disponíveis sobre o assunto. O gene da actina foi caracterizado e imunolocalizado em *T. brucei* (BEN AMAR, 1988) e *L. major* (DE ARRUDA, 1994) utilizando antissoro contra actina de coelho. Porém, o filamento propriamente dito ainda não foi identificado por microscopia eletrônica e nenhum papel ainda foi estabelecido em relação à actina em tripanosomatídeos (KOLL & GULL, 1998).

Ainda que os microfilamentos nunca tenham sido observados, em 2007 e 2008, Correa e colaboradores demonstraram que o tratamento com citocalasina B causa alterações morfológicas em elementos do citoesqueleto, associadas ao complexo citóstoma-citofaringe, que é responsável pela captura de transferrina. Análises comparativas de genômica identificaram um papel potencial do complexo acto-miosina em *T. cruzi*, e que este protozoário apresenta uma grande família de miosina e CapZ além dos genes de actina. Tem sido sugerido que o complexo acto-miosina pode ter alguma função no citóstoma (DE MELO, 2008).

Actina de *T. cruzi* foi observada em várias estruturas citoplasmáticas e estágios evolutivos. Apesar da actina de *T. cruzi* ter uma estrutura similar aquelas encontradas em eucariotos superiores, modelos de homologia tem revelado diferenças fundamentais, predominantemente nas regiões responsáveis pela oligomerização e interação com proteínas ligantes à actina. Como consequência disso, filamentos de actina nunca foram identificados em *T. cruzi* (DE SOUZA, 2009).

1.3 ACTINA

A actina foi descrita pela primeira vez em 1942 por Straub. O autor constatou que formas de actina, vinculadas à miosinas e acto-miosinas têm a

capacidade de contração muscular e que íons cálcio e potássio tem efeitos antagonistas sobre estas proteínas.

Posteriormente em 1993, Herman descreveu a forma monomérica ou globular dessa proteína, conhecida como actina G. Segundo este mesmo trabalho, esta forma de actina contém dimensões de 55 Å X 55 Å X 35 Å, possuindo três principais isoformas (α , β e γ) que se diferem em apenas poucos aminoácidos, principalmente na região N-terminal. Enquanto a actina α está presente majoritariamente na constituição do aparato contráctil, as actinas β e γ constituem principalmente o citoesqueleto. Ainda, a actina-G tem a capacidade de realizar ligações com ATP ou ADP, que são importantes para a sustentação dos monômeros unidos (ASAKURA & OOSAWA, 1960).

Além da forma globular da actina, também há uma forma filamentosa (actina F), formada por uma dupla fita, rearranjada de forma helicoidal constituída pelos monômeros de actina G, em condições fisiológicas e iônicas adequadas (HILD, 2010).

A actina apresenta tendência a polimerizar, o que previne a formação de cristais (um fator necessário para determinar a estrutura tridimensional por análise de raio X). Esta capacidade da actina de polimerizar é perdida quando é formado um complexo com a desoxiribonuclease I (DNAse I). Esse complexo pode ser cristalizado e sua estrutura determinada a uma baixa resolução (KABSCH, 1990).

Análises da estrutura tridimensional, tanto da actina globular quanto dos complexos actina-DNAse I e actina-profilina, indicam que os monômeros da proteína consistem em dois principais domínios, originalmente referenciados como grande e pequeno, e cada um deles é composto por dois sub-domínios. Enquanto o domínio pequeno compreende os subdomínios 1 e 2, o domínio grande compreende os subdomínios 3 e 4, como pode ser observado na figura 3 (KABSH, 1990 e SAHASRABUDDHE, 2015).

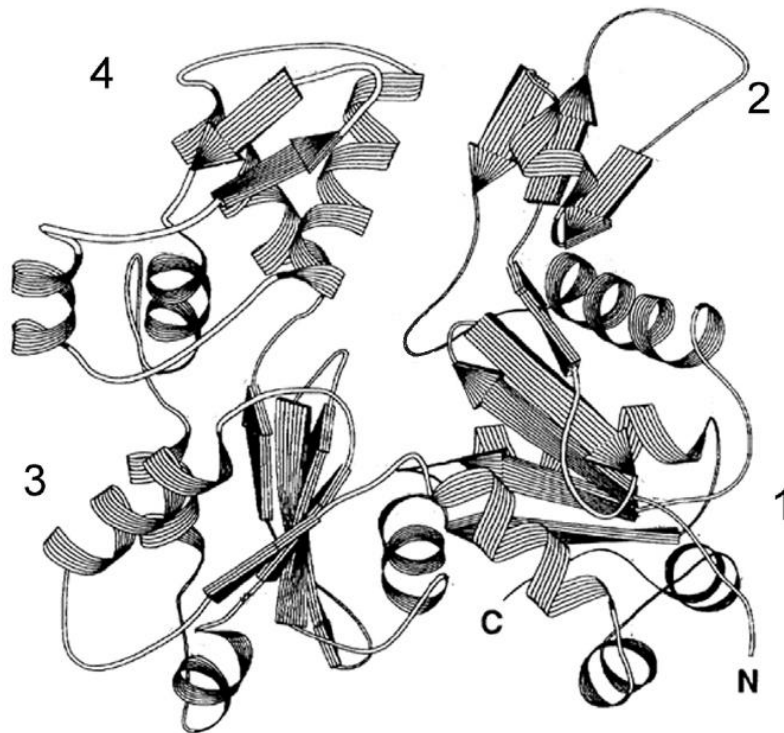


Figura 3. Estrutura esquemática da actina e seus sub-domínios. Os números de 1 a 4 indicam os subdomínios da estrutura tridimensional da proteína. N e C demonstram as porções amino e carboxi terminal, respectivamente (Adaptado de Kabsch et al., 1990 e Sahasrabudde, 2015).

Os filamentos de actina, também conhecidos como microfilamentos, compõem os filamentos mais finos do citoesqueleto, com um diâmetro de 80 Å, também capazes de formar redes. Quando associados com miosinas, os filamentos de actina são responsáveis pela maioria dos movimentos celulares (tais como contração muscular e divisão celular) (IKAWA, 2007).

Os filamentos de actina são importantes componentes do citoesqueleto da célula, onde estão frequentemente envolvidos em processos de transporte. Em todo tipo de tecido muscular há a interação cíclica entre a actina e a miosina, geralmente organizada em filamentos. Como dito anteriormente, Straub originalmente isolou o monômero de actina mostrando que o aumento da concentração de sal leva à formação de polímeros de actina filamentosos. Os monômeros se ligam à uma molécula de ATP que é hidrolisada a ADP. A alongação do filamento acontece nas duas extremidades do filamento, porém em proporções distintas.

Em 1985, Egelman, por meio de espectrometria, difração por raio-X e microscopia eletrônica, foi capaz de descrever o formato e a estrutura do

monômero e do filamento de actina. Neste trabalho ele constata que o filamento é composto por duas subunidades de aproximadamente 70 Å de comprimento e é orientado de modo que o seu eixo longitudinal está situado num plano quase perpendicular ao eixo do filamento. Ainda, uma propriedade importante da actina é a habilidade das subunidades de rotacionarem até 10° e por causa desta deformação é possível a formação de uma hélice ideal em filamentos livres. Porém, em sistemas como músculo de voo de insetos, por serem sistemas muito ordenados, os filamentos de actina podem não ser helicoidais.

1.4 ACTINA E ENDOCITOSE

A endocitose é essencial para a sobrevivência de células eucarióticas como um mecanismo básico de ingestão de macromoléculas, e tem sido vastamente caracterizado em células de mamíferos e leveduras. Entre os protozoários parasitas, a endocitose é também importante para evasão do sistema imune do hospedeiro e para apoiar a intensa proliferação dos diferentes estágios de vida (DE SOUZA, 2009).

A ideia de que a malha de actina é o maior sítio de endocitose é atualmente bem aceita. Estudos genéticos em leveduras identificaram um grande número de proteínas envolvidas na endocitose, incluindo muitas proteínas conhecidas como controladoras da dinâmica da actina. Ensaio de imunocitoquímica revelaram actina e proteínas associadas a ela em invaginações da membrana plasmática. Mais recentemente, outras abordagens foram capazes de estabelecer uma ligação clara entre a estrutura da trama da actina e locais de endocitose na membrana plasmática, revelando que proteínas endocíticas e regulatórias de actina co-localizam em estruturas no córtex da malha de actina (Revisado por Galleta, 2009).

Em tripanosomatídeos, ensaios de endocitose têm sido realizados predominantemente em *T. brucei*, *T. cruzi* e *Leishmania*. Na maioria deles a atividade endocítica é polarizada e restrita à membrana da bolsa flagelar (DE SOUZA 2009).

Em formas sanguíneas de *T. brucei*, a actina parece ser necessária para a formação de vesículas provenientes da bolsa flagelar e, o silenciamento dessa proteína parece provocar a perda da atividade endocítica, indicando que a actina possui um papel essencial na endocitose neste parasita (GARCIA-SALCEDO, 2004).

Em *T. cruzi*, o que acontece é diferente. Já foi visto que as formas epimastigotas tem capacidade de endocitar diversos tipos de macromoléculas como transferrina, albumina e peroxidase do meio extracelular. Porém, essa endocitose não é feita majoritariamente pela bolsa flagelar como nos outros tripanosomatídeos, mas sim pelo complexo citóstoma-citofaringe, que é uma característica exclusiva de *T. cruzi* (PORTO-CARRERO, 2000).

1.5 ACTINA EM TRIPANOSOMATÍDEOS

O sequenciamento dos genes de tripanosomatídeos indica que seu genoma contém sequências que codificam para actina, além de proteínas que se ligam a actina (incluindo cofilina, profilina, forminas e miosinas). Apesar disso, genes que codificam para alguns componentes da nucleação do filamento (como o complexo Arp2/3), de capeamento (CapZ) e do *crosslinking* de proteínas com o filamento não foram encontrados no genoma (BERRIMAN, 2005 e IVENS, 2005).

Apesar dos primeiros estudos que atestam a existência e a distribuição intracelular de actina em *T. brucei* e *L. major* terem sido publicados em 2004 (GARCIA-SALCEDO, 2004 e SAHASRABUDDHE, 2004, respectivamente) somente a actina de *Leishmania* (uma proteína de 42 kDa) foi caracterizada detalhadamente até hoje (SAHASRABUDDHE, 2015).

A actina de *Leishmania* não está presente apenas no citoplasma, regiões corticais, flagelo e núcleo, mas também no cinetoplasto onde é associada com o DNA do cinetoplasto (kDNA) (SAHASRABUDDHE, 2004 e KAPOOR 2010). Ainda, estudos *in vitro* da interação de actina de *Leishmania* com o DNA revelaram que a actina se liga especificamente ao DNA por

interações eletrostáticas e, além de se ligar ao DNA também parece converter minicirculos de kDNA em formas abertas, inibindo a atividade da topoisomerase II, sugerindo que a actina possui um papel importante no remodelamento de kDNA em tripanosomatídeos (KAPOOR, 2010)

Diferentemente de *Leishmania*, não há muita informação disponível sobre a presença de actina no núcleo e cinetoplasto de *T. brucei* e *T. cruzi*. Porém, já foi demonstrado que a distribuição intracelular de actina de *T. brucei* é diferente entre as formas procíclicas e sanguíneas. Enquanto em formas procíclicas a actina é localizada por todo o corpo do parasita, nas formas sanguíneas ela é localizada fortemente entre o núcleo e o cinetoplasto do parasita, marcando sua via endocítica (Figura 4), sendo indispensável para a atividade de endocitose (GARCÍA-SALCEDO, 2004).

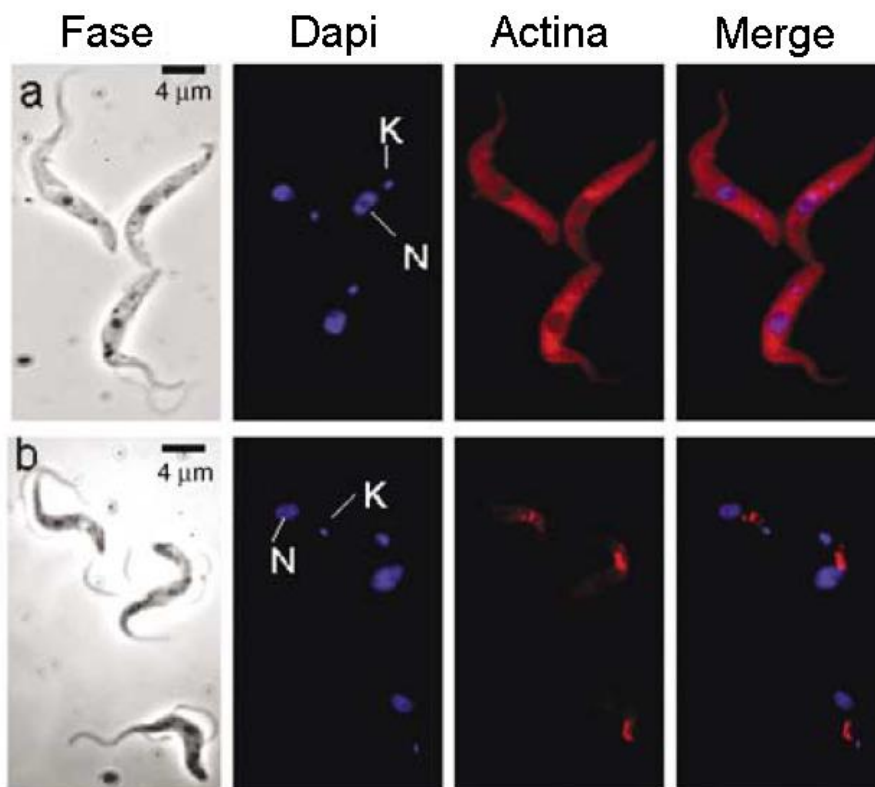


Figura 4. Distribuição da actina em *T. brucei*. a) Formas procíclicas. b) Formas sanguíneas. N, núcleo. K, cinetoplasto. Adaptado de García-Salcedo, 2004.

Em *Herpetomonas samuelpeessoai*, a distribuição de actina é concentrada perto da bolsa flagelar, também sugerindo que pode estar relacionada a funções endo e exocíticas (MORTARA, 1989).

Em *T. cruzi*, entretanto, tal diferença na localização não foi observada em diferentes estágios evolutivos. Em vez disso, a actina nesses parasitas é distribuída de forma granular por todo o corpo do parasita (SOUZA, 2013).

Análises realizadas através do programa ClustalW, mostraram que *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania major* possuem actinas com aproximadamente 70% de identidade de aminoácidos com actina de humanos (SAHASRABUDDHE, 2015).

Como relatado anteriormente, alguns estudos em tripanosomatídeos mostraram que a actina participa no processo de endocitose e do transporte intracelular destes organismos. Em um desses trabalhos, foi demonstrado que a inibição da expressão de actina por RNA de interferência em formas sanguíneas de *T. brucei* resultou na inibição do crescimento, perda de atividade endocítica e interrupção de tráfico vesicular proveniente da bolsa flagelar (GARCÍA-SALCEDO, 2004).

1.6 ACTINA EM *T. cruzi*

A actina é uma proteína que se manteve altamente conservada ao longo da evolução, e desempenha um papel fundamental na estrutura e dinâmica da maioria das células eucariotas e, como tal, poderia ser assumido que desempenha um papel central semelhante em tripanosomatídeos. No entanto, há muito poucos dados disponíveis. Sabe-se que a actina de *T. cruzi* tem uma estrutura semelhante à encontrada em eucariotos superiores (SOUZA, 2009). Genes para actina foram mais bem caracterizados em *T. brucei* e *L. major*. Dados de imunofluorescência confirmaram a presença da actina no corpo celular de *T. brucei* e *T. cruzi*. (KOHL & GULL, 1998), ainda que os filamentos de actina propriamente ditos nunca tenham sido observados por microscopia eletrônica.

Em 1983, De Souza publicou o primeiro trabalho relatando a presença de actina em *T. cruzi*, utilizando anticorpo heterólogo anti-actina (coelho), obtendo uma marcação por todo o corpo do parasita, principalmente no flagelo

de formas epimastigotas. Assim, foi sugerido que os microfilamentos poderiam estar envolvidos na organização da estrutura paraxial do parasita. Mais tarde, em 1989, Mortara indicou uma marcação semelhante, também utilizando anticorpo heterólogo, em *H. samuelpessoai*. Neste mesmo trabalho, ele sugere que a presença de actina não só em *H. samuelpessoai*, mas também em *T. cruzi*, pode estar intimamente relacionada com compartimentalização e tráfego de vesículas (MORTARA, 1989).

Em 2003, Cevallos e colaboradores descreveram a presença de dois genes que codificam actina em *T. cruzi*, e demonstraram que existe um pico na quantidade de mRNA para actina no período que precede a fase estacionária de crescimento de formas epimastigotas. Mais tarde, em 2011, este mesmo grupo descreveu a presença de quatro genes que codificam actina no genoma do *T. cruzi*, bem como a presença de vários genes para proteínas do tipo actina e proteínas relacionadas a actina. Os autores também demonstraram diferenças no padrão de expressão de actina nos diferentes estágios de desenvolvimento do parasita, através de imunolocalização utilizando anticorpos policlonais contra uma actina recombinante produzida a partir da sequência genômica de um dos genes que codificam actina em *T. cruzi*. Neste mesmo trabalho, são abordadas questões como modificações pós-transcricionais que podem estar envolvidas na expressão da actina nos diferentes estágios evolutivos do parasita. Modificações como metilação, oxidação, carbonilação podem afetar a regulação da dinâmica da actina, como mudança de ponto isoelétrico, através das formas evolutivas, indicando que a proteína pode ter papéis fisiológicos diferentes em cada um dos estágios (CEVALLOS, 2011).

Assim, ainda não se sabe exatamente quantos genes e quantas cópias de cada gene que codificam actina existem em *T. cruzi*, bem como seus níveis de expressão, localização celular e função nas diferentes formas de desenvolvimento do parasita. Nesse contexto, a caracterização da actina do parasita é um grande passo para o entendimento do seu funcionamento, já que provavelmente é uma proteína essencial para a sua fisiologia.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o gene que codifica a actina 2 no genoma do *T. cruzi* e determinar sua localização subcelular por imunolocalização através da produção de soro policlonal específico contra esta isoforma de estudo, e de parasitas expressando esta proteína fusionada a uma etiqueta.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar as sequências de nucleotídeos e aminoácidos da actina 2 e compará-las com outras sequências para actina no genoma de *T. cruzi* e também com diferentes tripanosomatídeos de importância médica (*T. brucei* e *L. major*) através do alinhamento de sequências e árvore filogenética;
- Produzir o vetor de entrada para transfecção no parasita, com o cassete contendo o gene da actina 2 fusionada a uma etiqueta e um gene de resistência a antibiótico;
- Produzir anticorpo policlonal a partir de peptídeo contendo sequência específica da actina 2;
- Analisar expressão da proteína em formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas;
- Determinar a localização sub-celular da actina 2 nas diferentes formas de desenvolvimento de *T. cruzi*, através de imunolocalização indireta com anticorpos específicos contra a etiqueta presente no cassete transfectado, e anticorpo policlonal produzido, tanto por imunofluorescência quanto por microscopia eletrônica de transmissão.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANÁLISE *IN SILICO* DO GENE DA ACTINA 2

Uma busca em bancos de dados genômicos (GeneDB, TriTryp) foi realizada para identificar todas as sequências que codificam actina no genoma do *T. cruzi*. Todas as sequências encontradas foram analisadas, alinhadas e comparadas entre si e com sequências que codificam actina em outros modelos celulares, principalmente *T. brucei* e *L. major*. O alinhamento foi realizado utilizando diferentes ferramentas como BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) e Clustal Omega (no site do Instituto Europeu de Bioinformática). A sequência de aminoácidos da actina 2 foi também analisada pelo programa Phyre 2 (*Protein Homology/analogY Recognition Engine*) para prever seu modelo estrutural (KELLEY, 2015).

3.2 CULTIVO DE *T. cruzi*

3.2.1 Epimastigotas

Neste trabalho foi utilizado o clone Dm28c de *T. cruzi* (CONTRERAS et al., 1985, CONTRERAS et al., 1988). As formas epimastigotas foram cultivadas em meio LIT (CAMARGO, 1964) a 28 °C com passagens a cada três dias e inóculo de 10⁶ células/mL. As formas epimastigotas foram coletadas por centrifugação no terceiro dia de cultivo (correspondente a fase logarítmica de crescimento, baseada em curva de crescimento realizada nas mesmas condições), quando a densidade celular apresentou-se em aproximadamente 10⁷ células/mL.

3.2.2 Tripomastigotas

As formas tripomastigotas foram obtidas através da diferenciação das formas epimastigotas em meio TAU3AAG (Triatomine Artificial Urine) de acordo com Contreras e colaboradores (1985). Após 72 horas de cultivo, os parasitas foram coletados do sobrenadante.

3.2.3 Amastigotas

As formas amastigotas foram obtidas através do processo de infecção de células Vero (ATCC CCL-81™) com formas tripomastigotas, mantidas em garrafas de cultivo celular de 150 cm² (Corning™) com meio DMEM suplementado com 10% de SFB a 37 °C em estufa de 5% de CO₂.

Após 24h de cultivo, as células Vero foram infectadas com tripomastigotas numa proporção de 10 parasitas por célula hospedeira. Após 4 horas de interação, as células foram lavadas com PBS para a remoção de células não aderentes e posteriormente foram incubadas nas mesmas condições mencionadas anteriormente.

Para liberação dos amastigotas intracelulares, as células Vero foram lisadas 48 horas após a infecção pelo método de cavitação, utilizando 180 psi de pressão por 5 minutos com uma bomba SPAN com gás nitrogênio pressurizado (*Parr Instrument Company™*). Células Vero não lisadas foram removidas por centrifugação a 800 g por 10 minutos, e os amastigotas foram recuperados do sobrenadante (BATISTA, 2015).

3.3 OBTENÇÃO DE PARASITAS EXPRESSANDO ACTINA 2 RECOMBINANTE FUSIONADA A ETIQUETA FLAG OU GFP

3.3.1 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*)

Para o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores foi utilizada a sequência completa da actina 2 (1179 pb) para vetor episomal, tanto com etiquetas na porção N como C terminal. Essa sequência foi clonada em vetor pDEST® (plataforma Gateway®) contendo as etiquetas FLAG ou GFP (gentilmente cedido pelo Dr. Stênio Perdigão Fragoso do Instituto Carlos Chagas).

Também foi utilizada apenas a porção final da sequência da proteína (480 pb) para posterior recombinação homóloga com etiqueta FLAG na porção C-terminal, ou apenas a porção inicial da sequência da proteína (480 pb) para recombinação homóloga com etiqueta FLAG na porção N-terminal. A amplificação apenas uma porção (final ou inicial) da sequência da proteína é realizada pelo fato de que a recombinação homóloga permite que o vetor contendo o gene de interesse seja integrado no genoma do parasita, fazendo com que este seja expresso constitutivamente contendo a etiqueta FLAG. Porém, para que essa recombinação seja possível, é necessária que haja uma sequência codificadora a jusante (*downstream*) ou a montante (*upstream*) do gene, dependendo de qual posição a etiqueta será expressa. A clonagem das regiões a jusante ou a montante foi realizada via clonagem clássica.

Pelo programa SnapGene® foi feita uma busca por sítios de clivagem de enzimas de restrição. Duas enzimas que não possuíam sítios na região a jusante foram selecionadas (*NdeI* e *HindIII*), e as sequências para seus sítios de corte foram adicionadas aos oligonucleotídeos iniciadores para amplificar esta região. As sequências para estas enzimas também estavam presentes no vetor pDEST.

No desenho dos oligonucleotídeos iniciadores para a expressão da etiqueta FLAG na porção N-terminal da actina 2 não foi necessário incluir sítios

para enzimas de restrição, pois o vetor utilizado já possuía o sítio M13 para recombinação da sequência.

Os oligonucleotídeos iniciadores desenhados tanto para recombinação homóloga quanto para expressão episomal podem ser observados na Tabela 1.

ACT 2 Epissomal F'	GW	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTC ATGGAGGCAACGCTGTGGG -3'
ACT 2 Homólogo F'	GW	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTC GAAGAGGATGGCATT AACGAG -3'
ACT 2 GW R'		5'- GGGGACCAC TTTGTACAAGAAAGCTGGGTC CTTGAGACAAA ACTG AGGGA -3'
ACT 2 (down) Ndel F'		5'- AATC CATATG AGTCCACTATTTTTTGCATCTCA -3'
ACT 2 (down) HindIII R'		5'- AATC AAGCTT CACCTCGTCAAGTGCCTC -3'
ACT 2 (ups) F'		5'- TTGCGCGCCGGGTTTTTATGAG -3'
ACT 2 (ups) R'		5'- GAAGACCACAGTTCACCATCCAAACGT -3'
ACT 2 N-terminal F'		5'- GGGGACCAC TTTGTACAAGAAAGCTGGGTC ACGGGGACAAGATGC GT TACACC -3'

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste trabalho. Em vermelho as sequências necessárias para utilizar o vetor da plataforma Gateway®. Em verde, os sítios de clivagem das enzimas de restrição específicas.

3.3.2 Extração de DNA

A obtenção do DNA genômico foi realizada mediante extração em pequena escala utilizando cloreto de lítio. Para isso, foi utilizada cultura de 3 dias de *T. cruzi* (aproximadamente 10⁷ parasitas por mL). Da cultura foi retirado 1 mL, centrifugado por 5 minutos a 6.000 g e lavado 2 vezes com PBS. O *pellet* foi ressuscitado em 500 µL de TELT (Tris-HCl 50 mM, EDTA 62,5 mM, LiCl 2,5 mM e Triton X-100 4%) e incubado por 5 minutos, vertendo o tubo algumas vezes. Foram adicionados 300 µL de fenol/clorofórmio e o material foi centrifugado a 13.000 g por 5 minutos. A fase superior da solução foi coletada e transferida para um novo tubo, onde foram adicionados mais 300 µL de fenol/clorofórmio e o material foi centrifugado novamente. Essa etapa foi repetida até que o menisco da solução bifásica se tornasse totalmente

transparente. A partir disto, foram adicionados 2 volumes de etanol 100%, e o material foi centrifugado por 5 minutos a 9.000 g. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1 mL de etanol 70% e centrifugado novamente. O sobrenadante foi descartado e o tubo foi seco em termoblock (Provocell®) a 42 °C. O *pellet* seco foi ressuspendido em 50 µL de T.E/RNase (Tris HCl 10 mM pH 7,4, EDTA 1 mM pH 8, RNase 1 mM).

3.3.3 Amplificação e clonagem do gene da actina 2 pela plataforma Gateway®

A clonagem do gene da actina 2 (Tc00.1047053507969.50) no vetor NEOMICINA-FLAG (NF) foi realizada utilizando a plataforma Gateway®. Para a obtenção do inserto foi feita amplificação por PCR de uma ORF de 1131 pb da actina 2 com os oligonucleotídeos iniciadores *forward*: 5' – GGG GACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGATGACGTTCACTACGTCTGCCG AG -3' e *reverse*: 5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGG GTCAAAGCATTTGTTGTGCACAATGCTTGGGCC -3'. A solução de PCR foi preparada com os seguintes reagentes: 0,2 µL de Taq DNA (Invitrogen®), 1 µL de cada primer (*forward* e *reverse*), 1 µL de DNA genômico de *T. cruzi* (obtido conforme descrito no item 3.3.2), 2 µL de MgSO₄ 50 mM, 4 µL de dNTPs 2,5 mM, 5 µL de tampão Taq DNA polimerase 10x *High Fidelity* e quantidade suficiente de H₂O 18.2 para completar 50 µL. Os tubos contendo a solução foram colocados em termociclador (modelo MWG da Biotech®) sob os seguintes parâmetros: 94 °C por 4 minutos para a etapa da primeira desnaturação e 30 segundos para demais desnaturações do ciclo, 55 °C por 30 segundos para a etapa do anelamento e 72 °C por 90 segundos para a etapa da extensão. Essas três etapas foram repetidas 35 vezes. Após esses ciclos, foi adicionada uma etapa de 7 minutos a 72 °C para finalizar a extensão das fitas.

3.3.4 Purificação por fenol/clorofórmio

O produto da amplificação pela reação de PCR foi purificado pelo método do fenol/clorofórmio. Para isso, foi adicionada na solução a ser purificada, a mesma proporção de fenol/clorofórmio (Fenol saturado 24 partes, clorofórmio 24 partes, álcool isoamílico 1 parte, Tris-HCL 100 mM, pH 8, 10 partes). A solução foi centrifugada a 15.000 g por 2 minutos em temperatura ambiente. Após a centrifugação, formaram-se duas fases na solução, das quais apenas a fase superior foi coletada e aplicada em um novo tubo, onde foi adicionado Acetato de Sódio, pH 6, numa concentração final de 0,3 M. Foram adicionadas 3 partes de etanol 100% e o material foi colocado em gelo seco por 20 minutos. A solução foi centrifugada a 12.000 g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 1 mL de etanol 70% e a solução foi novamente centrifugada a 12.000 g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o tubo colocado em banho seco a 42 °C até a secagem total do tubo. Após seco, o pellet foi ressuspendido em 20 µL de H₂O 18.2.

3.3.5 Montagem do vetor de entrada (pDONR™221)

O produto da purificação da reação de PCR (contendo a sequência da actina 2) foi utilizado para gerar um vetor. A inserção desse produto no vetor pDONR™221 foi realizada com a preparação da seguinte reação: 150 ng do inserto (sequência amplificada da actina 2), 150 ng µL do pDONR™221, 1 µL da enzima BP *Clonase™ enzyme mix* e 6,5 µL de tampão T.E. (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) a 25 °C por 16 horas. Para parar a reação da enzima, foi adicionado 1 µL da enzima proteinase K por 10 minutos em banho seco a 37 °C. Todas as sequências e vetores construídos neste trabalho foram enviados para sequenciamento e posteriormente alinhadas com sequências originárias do banco de dados (Trityp, BLAST) para a verificação da qualidade da montagem das sequências.

3.3.6 Preparo de células cálcio-competentes

As células competentes utilizadas nesse trabalho foram estirpes de *Escherichia coli* (TOP10F' ou Rosetta-gami™ 2). Para isso, foram utilizadas alíquotas previamente congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para estriar placas de LB sólido (em ágar 15%) que foram deixadas em estufa a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 16 horas.

A partir das colônias crescidas na placa, foi feito um pré-inóculo em 5 mL de LB líquido e deixado em estufa a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 16 horas em agitação (200 rpm). Dessa cultura foram retirados 4 mL e inoculados em 200 mL de LB e deixado em agitação por aproximadamente 2 horas até densidade óptica de 0,5 nm. Após isso, a cultura foi deixada em gelo por 15 minutos e centrifugada por 10 minutos a 10.000 g. O pellet foi ressuscitado em 200 mL de CaCl_2 100 mM e Hapes 10 mM e deixado em gelo por 2 horas. A solução foi centrifugada por 10 minutos a 10.000 g, ressuscitada em 4 mL de CaCl_2 100 mM, Hapes 10 mM, glicerol 14%, alíquotada em tubos eppendorf® de 1,5 mL e estocadas em freezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3.7 Transformação de bactérias

Após a reação para inserção da sequência da actina 2 no vetor de entrada, foram adicionados 50 μL de solução de bactérias da estirpe TOP10F' de *E. coli* no tubo da solução, o qual foi colocado por 30 minutos no gelo. As células foram submetidas a um choque térmico de 90 segundos a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ em banho seco. Em fluxo laminar foi adicionado 1 mL de meio de cultivo Luria-Bertani (LB), sem antibiótico. Essa solução foi deixada em agitação a 200 rpm por 1 hora a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Foram plaqueados 100 μL da solução de bactérias em placas de Petri com meio de cultura seletivo LB (Luria-Bertani, ágar 15% e canamicina), e colocadas em estufa a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 16 horas.

Nas placas de Petri, cresceram colônias de bactérias que deveriam conter o plasmídeo clonado. Para confirmar a transformação do plasmídeo, amostras dessas colônias foram analisadas por eletroforese em gel de agarose, utilizando o plasmídeo original como controle de tamanho. A corrida foi feita em gel de agarose 1% em tampão TBE, a 100 V por 1 hora. Ao fim da eletroforese o gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL), lavado com água ultrapura e analisado sob luz ultravioleta. O gel foi fotografado em transiluminador L-PIX EX (Loccus Biotecnologia, São Paulo – SP) sob luz ultravioleta (312 nm).

3.3.8 Minipreparação de plasmídeos

As colônias positivas foram expandidas em 5 mL de meio LB líquido com 10% de canamicina em agitador a 200 rpm por 16 horas. Após esse tempo, foram purificadas pelo método da lise alcalina usando o kit de minipreparação de plasmídeos (Qiagen®), de acordo com as recomendações do fabricante.

3.3.9 Montagem do vetor de expressão (pNEO3xFlag)

Após a obtenção da minipreparação das colônias contendo o vetor de entrada, a sequência de interesse foi transferida para um vetor de expressão chamado pNEO3xFlag, já contendo os sítios de resistência ao antibiótico de seleção (neomicina) e a etiqueta FLAG para as construções C ou N terminal. Esse vetor (aqui chamado NF) foi construído e gentilmente cedido pela Dra. Rosana Elisa Gonçalves Gonçalves Pinho (ICC) e pelo Dr. Stênio Perdigão Fragoso (ICC). Para esta reação de transferência, chamada de reação LR, foi feita a seguinte solução: 150 ng do pDONRTM (da minipreparação contendo o pDONR com a sequência da actina 2), 150 ng do pNEO3xFlag (NF), 1,5 unidades da enzima LR *ClonaseTM enzyme mix* e 6,5 µL de tampão T.E. A reação foi colocada a 25 °C em banho seco por 16h. Após esse tempo, a LR clonase foi inativada pela adição de 1 µL da enzima proteinase K por 10 minutos em banho seco a 37 °C. Após essa reação, foi feita a transformação

das bactérias (item 3.3.5) e a seleção das colônias positivas, contendo o vetor pNEO3xFlag, para a realização da minipreparação de plasmídeos (item 3.3.6). Após isso, além de partirmos para a construção do vetor para recombinação homóloga, foram transfectados os vetores provenientes das colônias positivas para expressão episomal em formas epimastigotas de *T. cruzi* (item 3.3.10).

3.3.10 Amplificação e clonagem da região a jusante (*downstream*) – C-terminal

Após a obtenção do vetor de entrada, também foi clonada junto a este cassete, uma região a jusante (ou *downstream*) do gene da actina 2, a fim de produzir uma recombinação homóloga do gene no parasita recombinante. Para isso, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores *forward* (com sítio para enzima de restrição *NdeI*): 5' - AATCCATATGAGTCCACTATTTTTTGCATCTCA -3' e *reverse* (com sítio para enzima de restrição *HindIII*): 5'- AATCAAGCTTTCAC CTCGTCAAGTGCCTC -3'. Após esta reação, o produto da PCR foi purificado por fenol/clorofórmio (Item 3.3.3).

O produto da purificação contendo as sequências da região *downstream* (insertos) e os vetores (minipreparação do pDEST NF com a sequência da actina 2) foram digeridos com a enzima de restrição *NdeI* (NEB®), em solução contendo o tampão 2 (NEB®, NaCl 50 mM, Tris HCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, pH 7), por 16 horas em estufa a 37 °C. Após a verificação da digestão por eletroforese em gel de agarose, a reação foi purificada por fenol/clorofórmio. Insertos e vetores foram então digeridos com a enzima de restrição *HindIII* (NEB®) em tampão 2, em estufa a 37 °C por 16 horas.

As reações de digestão dos vetores e dos insertos foram inativadas a 65 °C (em banho seco) por 20 minutos. Após purificação por fenol/clorofórmio, foi feita a reação de ligação da região *downstream* no vetor de entrada (pDEST NF). A solução foi feita da seguinte maneira: 1 µL do vetor (0,01 pmol), 1 µL do inserto (0,04 pmol) (relação molar inserto:plasmídeo de 3:1), 1 µL de enzima *DNA T4 Ligase*, 2 µL de tampão *T4 DNA Ligase* e 5 µL de H₂O 18.2 em geladeira, por 16 horas.

Após a reação de ligação, bactérias da cepa TOP10F' de *E. coli* cálcio-competentes foram transformadas, como descrito no item 3.3.5, em meio contendo ampicilina como antibiótico de seleção. A seleção dos clones positivos foi feita através de PCR de colônia (item 3.3.10), utilizando os oligonucleotídeos iniciadores INT2 F' (flanqueia uma região intergênica do vetor) e Actina 2 R' (de *T. cruzi*). O mapa do vetor pTcNeo3xFlag C-Terminal pode ser observado na figura 5.

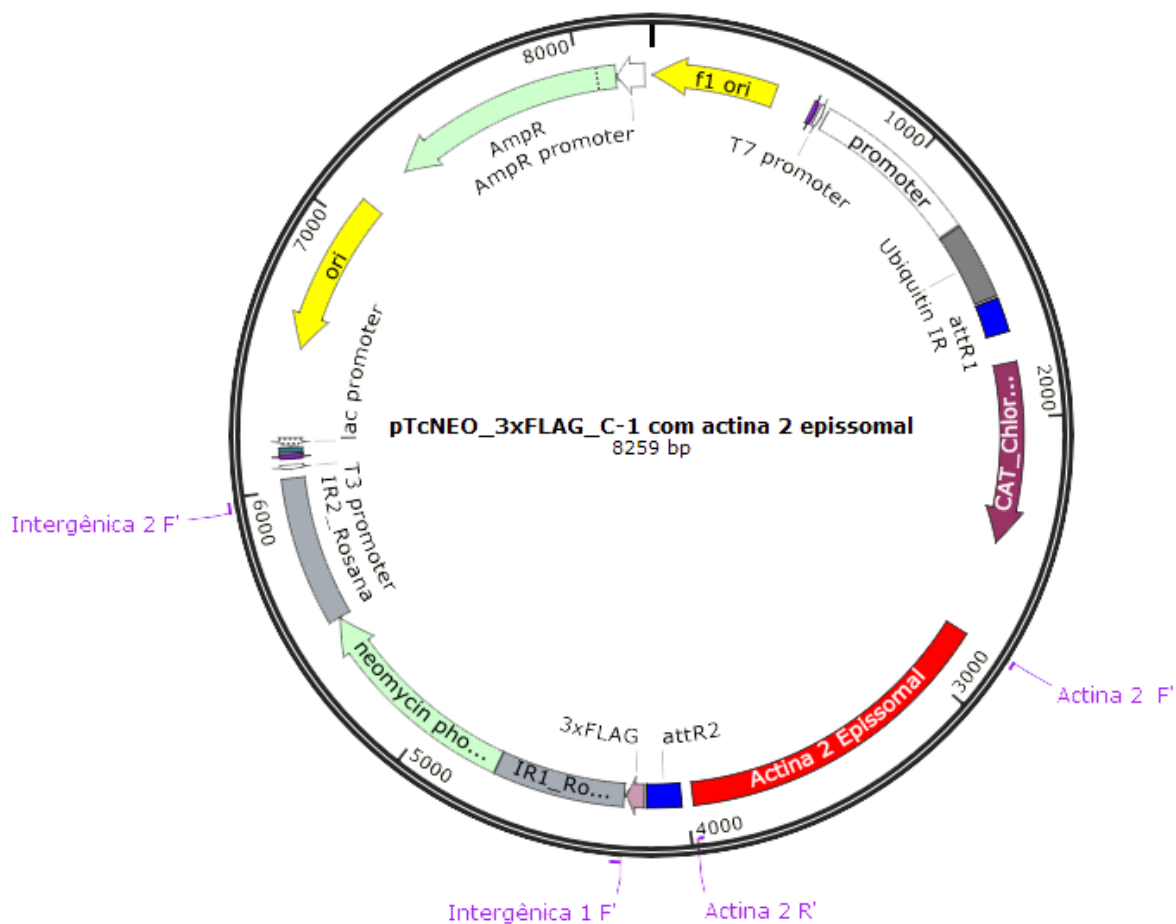


Figura 5. Vetor pTcNeo3xFlag C-Terminal com oligonucleotídeos iniciadores utilizados (roxo) para montagem e confirmação do cassete. Em vermelho, a sequência da actina 2 e em cinza as intergênicas utilizadas para confirmação do cassete.

3.3.11 Seleção de clones positivos por PCR de colônia

Após a montagem do cassete, bactérias *E. coli* da estirpe TOP10' foram transformadas, plaqueadas em meio sólido ágar 15% com antibiótico de

resistência específico do vetor utilizado (canamicina ou ampicilina) e colocadas em estufa de CO₂ a 37 °C por aproximadamente 16 horas. A confirmação da transformação foi feita pelo método do palito de dente, utilizando palitos de madeira autoclavados para retirar das colônias quantidade de DNA necessário para ser utilizado como molde na PCR.

Para a PCR foram utilizados tanto os oligonucleotídeos iniciadores que flanqueiam a sequência da actina 2, quanto uma combinação de oligonucleotídeos iniciadores que englobam as sequências das regiões intergênica dos vetores. Após realizada a PCR, os amplicons foram aplicados em gel de agarose 1% para eletroforese por 45 min a 100 V. Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídeo (1 µg/mL) e fotografado no sistema de foto-documentação UVP (Biorad®).

3.3.12 Amplificação, digestão e purificação dos cassetes “ACT2/NEO/FLAG/DOWNSTREAM” para transfecção em *T. cruzi*

Os clones contendo plasmídeos recombinantes (previamente selecionados mediante PCR de colônia (conforme descrito no item 3.3.9) foram expandidos em 20 mL de meio LB com ampicilina, e purificados pelo método da lise alcalina, usando o kit de minipreparação de plasmídeos (Qiagen) (Item 3.3.6). Essas minipreparações foram digeridas na seguinte solução: 20 µg de mini-preparação, 3 µL da enzima *EcoRV* (NEB®), 3 µL da enzima *HindIII* (NEB®), 5 µL de tampão 2 (NEB®) e 8 µL de H₂O 18.2. Essa solução foi colocada em banho seco por 2 horas a 37 °C. Após a verificação da reação de digestão (por eletroforese em gel de agarose), a solução foi purificada por fenol/clorofórmio e quantificada por nanodrop (NanoVue Plus, GE®).

3.3.13 Montagem do vetor de expressão (pNEO GFP)

Para realizar mais uma abordagem de fusão da proteína com uma etiqueta, a sequência completa da actina 2 foi clonada em vetor de entrada pDONR e posteriormente em vetor de expressão pDEST pNEO_GFP, gentilmente cedido pelo Dr. Stênio Fragoso (como descrito no item 3.3.9). Neste vetor, a etiqueta GFP (28 kDa) está posicionada na porção C-terminal da sequência de interesse e o sítio de resistência a antibiótico utilizado foi a da neomicina (Figura 6).

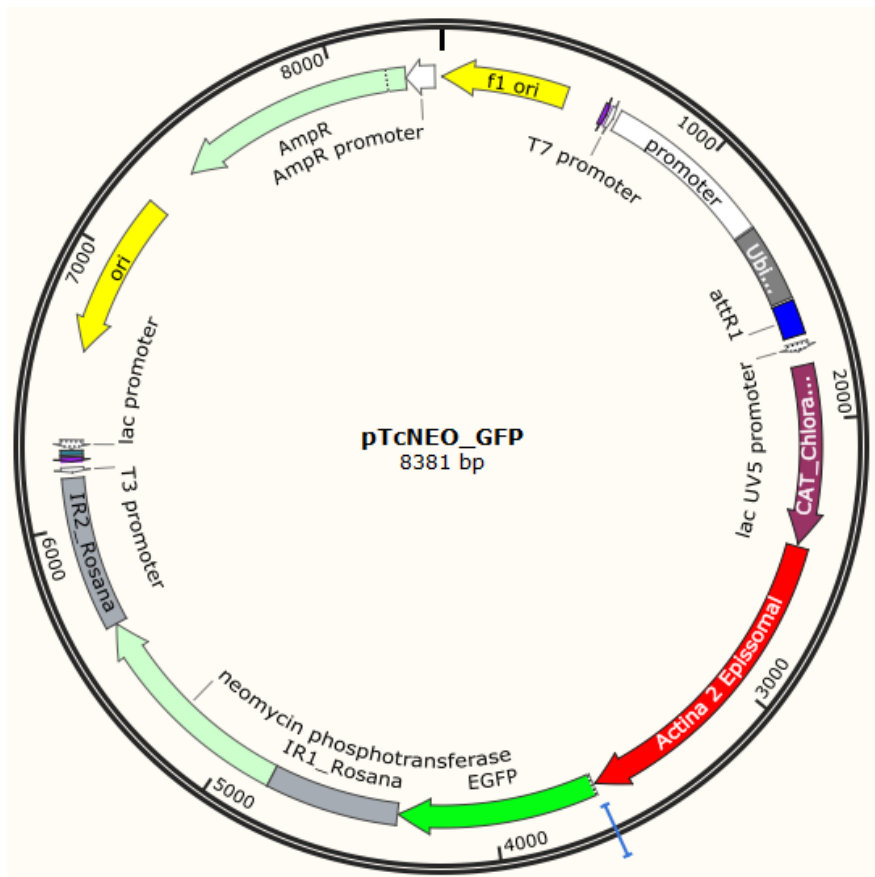


Figura 6. Vetor pTcNeo_GFP. Em vermelho, a sequência da actina 2, em cinza as intergênicas utilizadas para confirmação do cassete e em verde claro a sequência para o gene de resistência ao antibiótico neomicina.

3.4 TRANSFEÇÃO DAS FORMAS EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi*

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) até a densidade de 2×10^8 células/mL. Os parasitas foram centrifugados a 4.000 g por 10 minutos a 4 °C. O sedimento celular foi lavado em solução de eletroporação, centrifugado novamente e ressuscitado na mesma solução. Para cada transfeção, 0,4 mL da suspensão de células foram transferidos para cubetas de eletroporação estéreis (0,2 cm de GAP) (BioAgency®) e pré-resfriadas. Foram adicionados 25 µg do plasmídeo a ser transfectado (contendo a sequência da actina 2, a etiqueta FLAG ou GFP, e a região de resistência a neomicina). Para o controle da seleção dos parasitas, foi utilizada uma cubeta contendo apenas a suspensão de parasitas a serem eletroporados.

Após 10 minutos no gelo, as amostras contidas nas cubetas foram submetidas a 2 pulsos de 450 volts, 500 µF, utilizando o eletroporador GenePulser® II Apparatus (Bio-Rad). As amostras foram incubadas por 5 a 10 minutos à temperatura ambiente e em seguida transferidas para garrafas de cultura de 25 cm², contendo 10 mL de meio LIT (suplementado com 10.000 U de penicilina e estreptomicina a 10 µg/mL). As culturas foram então incubadas a 28 °C.

Após 24 horas de incubação foi adicionado o antibiótico neomicina na concentração de 500 µg/mL. As culturas foram mantidas por sucessivas passagens (diluição de 1:10) em meio LIT suplementado com neomicina a cada 5 - 7 dias, até a ausência de proliferação celular na cultura controle (eletroporadas na ausência do cassete).

3.5 OBTENÇÃO DO EXTRATO DE PROTEÍNAS

O extrato proteico de formas epimastigotas foi obtido a partir de culturas mantidas por 3 dias. As culturas foram contadas, lavadas em PBS e centrifugadas por 5 minutos a 3000 g e ressuscitadas em tampão de amostra [Tris HCl 40mM, SDS 1%, β-mercaptoetanol 2,5%, Glicerol 6%, azul de

bromofenol 0,005% e coquetel de inibidor de proteases (Sigma®) em PBS] a uma concentração de 10^6 parasitas por mL.

Os extratos de tripomastigotas e amastigotas foram obtidos através de culturas conforme descrito nos itens 3.2.1 e 3.2.2 respectivamente. Os parasitas foram centrifugados e ressuspensos em tampão de amostra sem glicerol nem azul de bromofenol. Esses extratos tiveram sua quantidade de proteínas dosada segundo protocolo de Bradford (1976).

3.6 WESTERN BLOTTING

Para a realização do ensaio de *Western Blotting* foi feito primeiramente gel de poliacrilamida 13% segundo Laemmli (1970). Após aplicação dos extratos no gel (5×10^6 parasitas ou 15 μ g de proteína por poço), este foi submetido a uma corrente de 30 mA por 90 minutos. A transferência das proteínas do gel para membrana de nitrocelulose foi feita a 20V *overnight*, segundo Towbin (1979). A membrana foi incubada com tampão de bloqueio (4% de leite desnatado diluído em PBS/Tween 0,05%) por 1 hora. A membrana foi lavada com PBS/Tween 0,05% e incubada com anticorpo primário diluído em solução de bloqueio por 1 hora, lavada com PBS/Tween 0,05% por 3 vezes de 5 minutos e incubada por 1 hora com anticorpo secundário (peroxidase anti-camundongo) também diluído em tampão de bloqueio. A membrana foi revelada para detecção de proteínas IgG de camundongo (Termo Scientifics®) de acordo com as recomendações do fabricante.

3.6.1 Análise de expressão de Actina 2 em diferentes formas evolutivas

A análise da expressão da actina 2 foi feita a partir de imagens obtidas por ensaios de *Western Blotting*. A imagem foi analisada pelo programa ImageJ®, que criou gráficos correspondentes as áreas das bandas demarcadas, de acordo com a intensidade de cinza de cada banda. As áreas de cada gráfico foram quantificadas e comparadas entre si com auxílio do programa GraphPad Prism 5®.

3.7 EXPRESSÃO HETERÓLOGA E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNA

Para a expressão da proteína Actina 2, o gene que a codifica foi inserido no vetor de entrada pDONR e posteriormente inserido no vetor de expressão pDEST17 utilizando a plataforma Gateway®. O vetor (pDEST17 contendo a sequência da actina 2) foi transformado (item 3.3.6) na estirpe DH5α de *E. coli* originando os plasmídeos contendo a sequência que codifica para a proteína Actina 2 fusionada a uma cauda de histidinas. Estes plasmídeos foram transformados na estirpe própria para a expressão heteróloga Rosetta-gami™ 2 de *E. coli* que por sua vez foram plaqueadas em placa de Petri contendo meio LB suplementado com os antibióticos específicos de resistência (água 15%, ampicilina, tetraciclina, estreptomicina e cloranfenicol). Essa estirpe foi utilizada devido sua capacidade de leitura de códons raros e a formação de pontes dissulfeto no citoplasma quando as proteínas são expressas de forma heteróloga, além de expressar a RNA polimerase do fago T7. A placa foi incubada a 37 °C por 16 horas.

Dentre as colônias que cresceram, uma delas foi coletada, inoculada em 300 mL de meio LB líquido e incubada a 37 °C até atingir uma densidade ótica (lida em 600 nm) de 0,5 nm. A partir disso, IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside a 300 µmol/L) foi adicionado à cultura para a indução da expressão da proteína. Um mL da cultura sem indução foi guardado, centrifugado a 5.000 g por 5 minutos a 4 °C e ressuspenso em 110 µL de tampão PBS. Após 3 horas de indução, o restante da cultura foi centrifugado a 4 °C, 5.000 g por 10 minutos, lavado por 3 vezes com PBS e o *pellet* de células ressuspenso em 8 mL de Tampão de Lise (NaH₂PO₄ 100mM, NaCl 500 mM, Triton x-100 2%). As amostras foram sonicadas (Cole Parmer™) em 5 ciclos de 15 segundos alternados por 15 segundos de repouso em gelo, e então centrifugadas a 4 °C, a 12.000 g por 10 minutos para a separação das frações solúvel e insolúvel. A fração insolúvel foi ressuspendida em 8 mL de PBS. Foram adicionados os inibidores de protease PMSF 1 mM e E64 1 mM em todas as frações.

As amostras de actina 2 não induzidas e induzidas foram analisadas por gel SDS-PAGE com poliacrilamida 12%. Após análise das frações solúvel e

insolúvel, a fração insolúvel (que continha a proteína de interesse) foi aplicada em gel preparativo de poliácridamida 12%. A banda correspondente ao tamanho da proteína foi cortada e eluída por três vezes em 2 mL de TBE a 4 °C durante 16 horas. As frações não induzida, induzida e eluída foram analisadas por gel SDS-PAGE com poliácridamida 12% (LAEMMLI, 1970).

3.8 PEPTÍDEO PARA INÓCULO DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DE SORO POLICLONAL

Uma vez que as isoformas da proteína actina possuem alto grau de semelhança e que o objetivo deste trabalho inclui a obtenção de ferramentas capazes de discernir estas isoformas, para a imunização dos camundongos neste trabalho foi utilizado um peptídeo específico para a isoforma 2 da proteína actina.

Após uma análise *in silico* levando em conta hidrofobicidade, carga, estrutura, acidez e imunogenicidade, foi selecionada a seguinte sequência de aminoácidos: CEEDGINEDVKGKEP, que é específica para a actina 2 (Figura 7). Os peptídeos foram comercialmente obtidos pela empresa GeneScript® já fusionados à proteína KLH (Keyhole limpet hemocyanin) para aumentar a resposta imune dos animais.

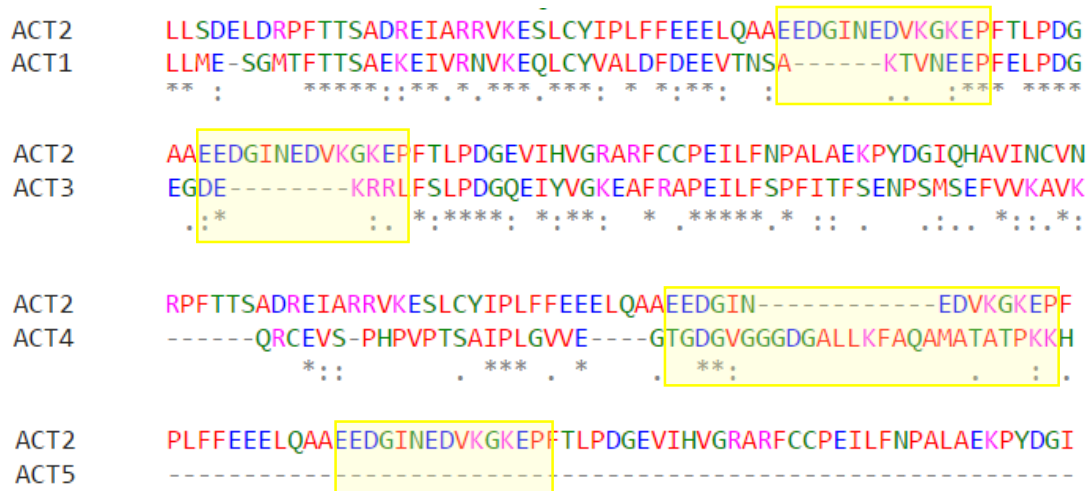


Figura 7. Alinhamento das sequências das isoformas de actina. Em amarelo a sequência escolhida da actina 2, mostrando que não há alinhamento nos aminoácidos utilizados para sintetizar o peptídeo a ser inoculado.

3.8.1 Obtenção de soro policlonal

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com a recomendação do Guia para Uso Animal do Comitê de experimentação animal da FIOCRUZ (Número do protocolo: P-0434/07). Para esse estudo foram utilizados três camundongos albinos BALB/c (30 a 45 dias de vida), que foram imunizados com quatro inóculos intraperitoneais, cada um contendo 50 µg do peptídeo contendo a sequência específica da actina 2 fusionada a proteína KLH (como descrito no item 3.5) juntamente com 77 µL de adjuvante de hidróxido de alumínio gel. Os inóculos intraperitoneais tiveram intervalos de duas semanas. O último inóculo realizado foi via intravenosa sem a presença do adjuvante. Antes do início das imunizações foi retirado o soro pré-imune via veia caudal.

Uma semana após o último inóculo, o sangue dos três camundongos foi coletado por punção cardíaca, centrifugado por 5 minutos a 2.000 g, e assim obtido o soro policlonal contra a actina 2.

3.8.2 Dot Blotting

Para verificar a especificidade do soro policlonal obtido através das imunizações dos camundongos, foi realizado o ensaio de *Dot Blotting*. Para isso, foram aplicados 500 ng da proteína actina 2 (produzida de forma heteróloga) em membrana de nitrocelulose com o auxílio de equipamento para *Dot Blotting* (Major Science®). Também foram aplicadas as proteínas actina 1 e actina 4 para avaliação da especificidade do soro produzido. As membranas foram bloqueadas em tampão contendo 5% de leite desnatado diluído em PBS/Tween 0,05% por uma hora. Após esse tempo, as membranas foram incubadas com o soro policlonal nas seguintes diluições: 1:1000, 1:2000 e 1:3000 por uma hora. As membranas foram lavadas e incubadas com anticorpo

secundário Alexa 680 nm por 45 minutos, lavadas com PBS e reveladas por imunoexcitação em *scanner* de fluorescência Odyssey (Li cor®).

3.8.3 Cultivo de células de Mieloma (Ag8.65)

As células de mieloma (Ag8.65) foram cultivadas em meio RPMI com 20% de soro fetal bovino em garrafas de cultura até uma confluência de aproximadamente $7,5 \times 10^7$ células, mantidas em estufa de 5% CO₂ a 37 °C.

3.8.4 Esplenectomia

Três dias após o último inóculo, os camundongos foram anestesiados via intraperitoneal, tiveram seu sangue recolhido por punção cardíaca (de onde obteve-se o soro policlonal) e foram eutanasiados através de deslocamento cervical. Os baços dos camundongos foram retirados e macerados, e mergulhados em meio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) sem a adição de soro fetal bovino, e filtrados em pipeta com filtro de nylon. Após a filtração, o volume foi completado com RPMI para 50 mL e centrifugado por 10 minutos a 500 g. O sobrenadante foi descartado e ressuspensão em RPMI com solução de lise (cloreto de amônia gelado) e incubado por 5 minutos no gelo. A solução foi centrifugada a 500 g por 10 minutos, assim como as células de mieloma. As células foram lavadas em meio RPMI sem soro e, posteriormente a mais uma centrifugação, foram ressuspensas em 10 mL de RPMI. As células foram contadas e a viabilidade foi analisada pelo método de azul de tripan (PHILLIPS, 1973).

3.8.5 Produção dos hibridomas

As células de mieloma e os esplenócitos foram colocados em um mesmo tubo em uma proporção de 1:5 respectivamente, e centrifugados por 10 minutos a 500 g. O sobrenadante foi descartado, e ao *pellet* de células foi

adicionado lentamente 1 mL de PEG 50% diluído em meio RPMI por 2 minutos em banho-maria a 37 °C. À esta solução também foram adicionados mais 9 mL de RPMI. A solução foi centrifugada novamente e o *pellet* foi ressuspensão em meio RPMI suplementado com 10% de SFB, em uma concentração final de $2,5 \times 10^6$ células/mL. A suspensão celular foi distribuída em placas de 96 poços (100 µL por poço). Após 24 horas da fusão, foram adicionados 100 µL de meio HAT (Hipoxantina, Aminopterin e Timidina) por poço. Após, o meio de cultura foi trocado a cada 48 horas. Após 15 dias o meio HAT foi substituído pelo meio HT e após 19 dias pelo meio RPMI com SFB.

3.8.6 Triagem dos hibridomas de interesse

Uma vez que as células atingiram uma confluência de dois terços do fundo do poço, foi realizada a identificação dos anticorpos de interesse pelo método de ELISA (MAZZAROTTO, 2009).

A proteína Actina 2 recombinante (obtida conforme descrito no item 3.4) foi ressuspensa e teve sua concentração (4 / 2 / 1 / 0,5 / 0,25 / 0,125 / 0,612 µg por poço) ajustada no tampão de sensibilização (NaCO₃ 0,16 %, NaHCO 0,28 % pH 9,6). Foram colocados 100 µL de suspensão proteica em cada poço (placa de 96 poços) e incubados a 4 °C por 16 horas. Após esse período, as placas foram lavadas 5 vezes com tampão PBS/Tween 20 0,01% e congeladas a - 20 °C. No dia do uso, as placas foram retiradas do *freezer* e, a cada poço foram adicionados 100 µL de tampão de bloqueio (PBS + 5% de leite em pó desnatado) e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. As placas foram lavadas 5 vezes com 200 µL por poço de PBS/Tween 20 0,01%.

O soro policlonal foi utilizado nas diluições de 1:200 e 1:500, diluído em tampão de bloqueio em um volume final de 100 µL por poço e incubados a 37 °C por 45 minutos. As placas foram lavadas novamente com PBS/Tween 20 0,01% e foi adicionado 100 µL de anticorpo secundário anti-camundongo (fusionado à peroxidase) a uma diluição de 1:1200 em tampão de bloqueio. As placas foram incubadas por 45 minutos a 37 °C. Após esse tempo foram

lavadas e adicionados 100 µL por poço do substrato (orto-fenileno-diamina 0,1%, peróxido de hidrogênio 30%, tampão citrato) e incubados por 10 minutos a temperatura ambiente. Após esse tempo foram adicionados 100 µL de solução de interrupção da reação (Ácido sulfúrico 1M), e as placas foram lidas em leitor de ELISA Biotek® EL800 a 450 nm.

Os hibridomas serão submetidos a ensaios de criopreservação (MAZZAROTTO, 2009) e os mais estáveis serão selecionados para clonagem em diluição limitante. O sistema *SBA Clonotyping-HRP* (Southern Biotech™) baseado em captura de ELISA será utilizado para identificar o isotipo do clone para anticorpo monoclonal, de acordo com as indicações do fabricante. Os hibridomas positivos serão criopreservados em nitrogênio líquido.

3.9 IMUNOLocalização por Imunofluorescência

Para os ensaios de imunofluorescência, foram utilizadas formas epimastigotas (tipo selvagem ou geneticamente modificadas), tripomastigotas e amastigotas (ambas provenientes de parasitas tipo selvagem), obtidas conforme descrito no item 3.2. As células foram submetidas a centrifugação, e o volume foi ajustado para uma concentração final de 5×10^6 células/mL em PBS.

As células foram depositadas em lamínulas tratadas com poli-L-lisina para adesão. O material foi fixado em formaldeído nascente 4% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,2 por 30 minutos. Após esse tempo, as lamínulas foram lavadas três vezes por 10 minutos (cada lavagem) com PBS e incubadas com Triton X-100 a 0,1% diluído em PBS por 3 minutos à temperatura ambiente. As lamínulas foram novamente lavadas com PBS, incubadas em solução de bloqueio (PBS pH 8,0 + BSA 3%) por 3 vezes de 10 minutos cada.

As amostras foram em seguida incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com o anticorpo primário específico para cada experimento, diluídos em solução PBS/BSA 1,5%. Em formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas selvagens foi utilizado o soro policlonal produzido contra a actina 2

em uma diluição de 1:100. Nas formas epimastigotas contendo a actina 2 fusionada a etiqueta FLAG (C ou N-terminal) foi utilizado o anticorpo comercial monoclonal anti-FLAG (Sigma®) diluído 1:1500 em solução de bloqueio. Em formas epimastigotas contendo a actina 2 fusionada a etiqueta GFP foi utilizado anticorpo policlonal em uma diluição de 1:500.

Posteriormente, as lamínulas foram lavadas com solução de bloqueio por 3 vezes de 10 minutos cada, e incubadas por 30 minutos com o anticorpo secundário Alexa-Fluor 488 ou 594 (Sigma®), diluído 1:600 em solução de bloqueio. Após este tempo, as lamínulas foram lavadas com solução de bloqueio por mais 3 vezes de 10 minutos cada, depois com PBS puro por 3 vezes de 10 minutos cada. Após esse processo, as amostras das lamínulas foram incubadas com corante de DNA (Hoechst 33258) por 5 minutos, lavadas em água e montadas com o reagente *Prolong® Gold antifade* sobre uma lâmina de microscopia ótica, para posterior análise em microscópio de epifluorescência com sistema de deconvolução.

3.10 IMUNOLocalização POR MICROSCOPIA ELETRONICA DE TRANSMISSÃO

Para o ensaio de imunolocalização ultraestrutural, formas epimastigotas de *T. cruzi* cultivadas por 3 dias foram coletadas e centrifugadas por 5 minutos a 2000 g e lavadas duas vezes com tampão fosfato pH 7,2. Os parasitas foram fixados em solução contendo 4% de formaldeído nascente, 0,1% de glutaraldeído em tampão fosfato 0,1 M pH 7,2 por 1 hora. Após fixação, o *pellet* de parasitas foi lavado com tampão fosfato, desidratado em concentrações crescentes de etanol, e posteriormente embebidos em resina Lowicryl K4M. As amostras foram polimerizadas a - 20 °C sob luz ultravioleta por 72h.

Os blocos polimerizados contendo as amostras foram cortados em ultramicrótomo (Leica®). Os cortes ultrafinos (70 nm) foram coletados em grades de Níquel de 300 mesh (EMS®), que foram posteriormente incubadas por 30 minutos com cloreto de amônio 50 mM diluído em tampão PBS e 30

minutos em solução de bloqueio (PBS pH 8, BSA 3%). Após isso, foram incubadas com soro policlonal diluído em solução de bloqueio em uma proporção 1:20, por 1 hora. As amostras foram lavadas com solução de bloqueio e posteriormente incubadas com o anticorpo secundário anti-camundongo conjugado a ouro coloidal de 15 nm diluído em solução de bloqueio em uma proporção de 1:40 por 1 hora. As grades foram lavadas em tampão de bloqueio e água 2 vezes por 15 minutos.

As amostras foram contrastadas com acetado de uranila e citrato de chumbo, e analisadas em microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1400Plus.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE *IN SILICO*

Cevallos e colaboradores publicaram em 2011 um trabalho, o mais completo trabalho sobre actinas de *T. cruzi* realizado até o momento, mostrando que existem ao menos 4 genes anotados como actina no genoma do CL-Brener. As isoformas de actina que estes genes codificam foram didaticamente nomeadas como actina 1, actina 2, actina 3 e actina 4. No entanto, vale ressaltar que este resultado foi obtido através de análises *in silico*, enquanto que os dados experimentais do trabalho foram realizados apenas com a actina 1, de forma que todas as outras isoformas de actina permanecem sem nenhuma caracterização.

Trabalhos anteriores ao de Cevallos e colaboradores (2011) já haviam mostrado que, em *T. cruzi*, a actina era observada em estruturas citoplasmáticas, presentes em todos os estágios de desenvolvimento. Embora essa proteína tenha uma estrutura similar às encontradas em eucariotos superiores, modelos de homologia revelaram diferenças predominantemente em estruturas responsáveis pela oligomerização e interação com proteínas que se ligam a actina. Hipotetiza-se que esta seja uma das explicações para o fato que filamentos de actina propriamente ditos nunca tenham sido observados em *T. cruzi* (DE SOUZA, 2009).

Estudos anteriores mostraram que, em *T. cruzi*, a maioria das modificações dos aminoácidos, quando comparadas a outras células eucarióticas, está concentrada na superfície dos monômeros, o que pode explicar a peculiaridade da espécie na formação de filamentos no citoesqueleto (CEVALLOS, 2003 e DE MELO, 2008). Esses estudos também mostraram a caracterização da sequência de uma isoforma de actina (actina 1) de 42 kDa, que se mostrou distribuída por todo o corpo do parasita, quando submetida a imunofluorescência utilizando soro policlonal proveniente da imunização de animais com a actina 1, que é a isoforma mais conservada (DE MELO, 2008). Conforme já mencionado, a actina 1 é, até o momento, a única isoforma a ter qualquer tipo de caracterização publicada.

Para a análise *in silico* foi utilizada a palavra “actina” na busca nos bancos de dados TriTrypDB (Kinetoplastid Genomic Resource) e BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). A partir dos resultados dessa pesquisa, foram selecionados apenas genes anotados com “actina” ou “actina, putativa”, sem considerar proteínas associadas ou relacionadas a actina. Foram então encontradas sequências que codificam 5 isoformas da proteína, sendo uma delas, de aproximadamente 43,6 kDa, correspondente à que Cevallos e colaboradores, em 2011, denominaram como actina 2, e que parece ser exclusiva de *T. cruzi*.

O clone de *T. cruzi* usado como referência para a anotação do genoma foi o CL-Brener. No entanto, o clone utilizado neste projeto foi o Dm28c (GeneBank: TCDM_06657, submetido em 30-JAN-2014, por Grisard e colaboradores). Para ter certeza que esta diferença entre o clone utilizado para obtenção de sequências (CL-Brener) e o clone utilizado para a obtenção do DNA genômico para amplificação das sequências da actina 2 por PCR e para a transfecção (Dm28c) não seria um problema, uma busca por sequência para actina no clone Dm28C também foi realizada. Uma anotação de sequência de 376 aminoácidos para “Actin 2” foi encontrada (GenBank: U20234.1, submetido em 24-JAN-1995, por Edson Rondinelli, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica, UFRJ, RJ, Brasil).

Para determinar se esta sequência corresponde à sequência da “Actina 2” do clone CL-Brener (clone de referência), foi feito um alinhamento entre estas sequências, a partir do qual foi possível concluir que estas apresentam identidade de 99%, confirmando que a utilização das sequências do clone CL-Brener em nada interfere nos resultados obtidos utilizando o clone Dm28c (Figura 8).

Actina2_CLBrenner Actina2_Dm28c	ATGGAGGCAACGCTGTGGGATGAAGAGCCGGCGTGGTTCTTGACAATGGTAGCGGAAAC ATGGAGGCAACGCTGTGGGATGAAGAGCCGGCGTGGTTCTTGACAATGGTAGCGGAAAC *****	Actina2_CLBrenner Actina2_Dm28c	CGTCCATTCACTACATCTGCCGATCGGAGATTGCACGGCGGTGAAGGAGAGCCTCTGC CGTCCATTCACTACATCTGCCGATCGGAGATTGCACGGCGGTGAAGGAGAGCCTCTGC *****
Actina2_CLBrenner Actina2_Dm28c	ATTAAGTGCGGTTTTGCTGGTGAAGAGATTCCTCGATGCGTATTCGCCGAGTGTACAGGA ATTAAGTGCGGTTTTGCTGGTGAAGAGATTCCTCGATGCGTATTCGCCGAGTGTACAGGA *****	Actina2_CLBrenner Actina2_Dm28c	TATATACCGTTGTTTTTGAAGAACTACAGCGGGGAAAGGATGCGATTAACGAG TATATACCGTTGTTTTTGAAGAACTACAGCGGGGAAAGGATGCGATTAACGAG *****
Actina2_CLBrenner Actina2_Dm28c	GTCTCAATGAATGCCAGGAGCAGCGGACAGCAGCAGTCAAGCGTGTATGTGGGAGAC GTCTCAATGAATGCCAGGAGCAGCGGACAGCAGCAGTCAAGCGTGTATGTGGGAGAC *****	Actina2_CLBrenner Actina2_Dm28c	GACGTGAAAGGAAAAAACCCCTTCACTGCGGATGGTGAAGGTATTACGTTGGGCGC GACGTGAAAGGAAAAAACCCCTTCACTGCGGATGGTGAAGGTATTACGTTGGGCGC ***
Actina2_CLBrenner Actina2_Dm28c	GAAAGCCCTGCAGGAGAAGGGTCTGCGTACTTCTATCCAAATGGAAACGGCATTTGTTTT GAAAGCCCTGCAGGAGAAGGGTCTGCGTACTTCTATCCAAATGGAAACGGCATTTGTTTT *****	Actina2_CLBrenner Actina2_Dm28c	GCGCGTTCTGCTGCCCTGAGATTCTTTTCAACCCGGATTGGCTGAAGCCGTACGAC GCGCGTTCTGCTGCCCTGAGATTCTTTTCAACCCGGATTGGCTGAAGCCGTACGAC *****
Actina2_CLBrenner Actina2_Dm28c	GACTGGATCAAAATGGAGCGTGTGGCGCATGCGATGAGCAGTACGTGTGCCGCT GACTGGATCAAAATGGAGCGTGTGGCGCATGCGATGAGCAGTACGTGTGCCGCT *****	Actina2_CLBrenner Actina2_Dm28c	GGCATTCAACACGCTGTAATTAATTTGTGTGAACCTCTGCCCTATCGATCTTCCGGGAG GGCATTCAACACGCTGTAATTAATTTGTGTGAACCTCTGCCCTATCGATCTTCCGGGAG *****
Actina2_CLBrenner Actina2_Dm28c	GAGCGCCAGGCTGTGCTTTTGAACGAGGCACTCAATGAAACCGATTAGCAACCGTGAAG GAGCGCCAGGCTGTGCTTTTGAACGAGGCACTCAATGAAACCGATTAGCAACCGTGAAG *****	Actina2_CLBrenner Actina2_Dm28c	CTACTTGGCAGTATTGTCTTGTCCGGCGCAACAGATGTTCAAGGGAATGACAGCGT CTACTTGGCAGTATTGTCTTGTCCGGCGCAACAGATGTTCAAGGGAATGACAGCGT *****
Actina2_CLBrenner Actina2_Dm28c	ATGGCGAGACTCTTTTGAAGTCTTTGGCGTGCACGCGCTTACGTGCAAAATTCAGGCC ATGGCGAGACTCTTTTGAAGTCTTTGGCGTGCACGCGCTTACGTGCAAAATTCAGGCC *****	Actina2_CLBrenner Actina2_Dm28c	CTGCAGTCGGAGTAGCAGCCCTAGCAAAATAGCGTGCCTGAAAGCGTCCGCGTGGT CTGCAGTCGGAGTAGCAGCCCTAGCAAAATAGCGTGCCTGAAAGCGTCCGCGTGGT *****
Actina2_CLBrenner Actina2_Dm28c	GTGCTCACACTTTATTCTTCTGCGCGACCCGACGGGCTTGTGTGGACAGCGGTGACGGT GTGCTCACACTTTATTCTTCTGCGCGACCCGACGGGCTTGTGTGGACAGCGGTGACGGT *****	Actina2_CLBrenner Actina2_Dm28c	GCTGCGAGTGAACGGAGTTTGTGTGTGGATAGGTGACGCCATTCTTCCAGCTTGACA GCTGCGAGTGAACGGAGTTTGTGTGTGGATAGGTGACGCCATTCTTCCAGCTTGACA *****
Actina2_CLBrenner Actina2_Dm28c	GTAACGCATCTTGTCCCGTATTTGAAGGGCAGAGATGCGCAATCAGTGCAGCGGCTG GTAACGCATCTTGTCCCGTATTTGAAGGGCAGAGATGCGCAATCAGTGCAGCGGCTG *****	Actina2_CLBrenner Actina2_Dm28c	TCCTTCGCTCGGAGTGGATCAAGGACGGAGTACGACAGAGGGAGCTGCTGTCTCT TCCTTCGCTCGGAGTGGATCAAGGACGGAGTACGACAGAGGGAGCTGCTGTCTCT *****
Actina2_CLBrenner Actina2_Dm28c	GAGCTTGTGCGCGTATTGACGGAGTGGATGAGGAGCTGCTCAGCGATGAGCTTGAC GAGCTTGTGCGCGTATTGACGGAGTGGATGAGGAGCTGCTCAGCGATGAGCTTGAC *****	Actina2_CLBrenner Actina2_Dm28c	CACAAGCGGTGCGACTCCCTCAGTTTTGTCTCCAAGTAG CATAAGCGGTGCGACTCCCTCAGTTTTGTCTCCAAGTAG **

Figura 8. Alinhamento filogenético da actina 2 entre as cepas CL Brenner e Dm28c. “*” representam aminoácidos idênticos e “.” representam mutações conservativas (aminoácidos diferentes, porém correspondentes). Alinhamento realizado através do programa Clustal Omega.

Utilizando o programa Clustal Omega, a sequência de aminoácidos da actina 2 de *T. cruzi* foi alinhada com sequências de outros organismos, e também com as outras sequências de actina de *T. cruzi*. A partir destes alinhamentos foram obtidas as árvores filogenéticas (Figura 9 e Figura 10, respectivamente). A análise destas árvores mostrou que a actina 2 de *T. cruzi* é bastante divergente das actinas de outros organismos, sendo filogeneticamente mais próxima das actinas de outros tripanosomatídeos. Estes resultados corroboram os resultados descritos por De Melo e colaboradores (2008), que mostram que a sequência da actina 1 teria 95%, 99% e 86% de homologia com as sequências de *L. major*, *T. brucei* e *H. sapiens*. As actinas apresentam 99% de cobertura das sequências, tendo um número aproximado de 375 aminoácidos, mesmo em espécies muito distantes filogeneticamente.



Figura 9. Árvore filogenética das actinas de diferentes espécies. Alinhamento filogenético realizado através do método *neighbour-joining*, pelo programa Clustal Omega. As distâncias entre as espécies foram de *T. brucei*: 0.029837, *T. cruzi*: 0.22354, *L. major*: 0.17956, *H. sapiens*: 0.08212, *M. musculus*: 0.06933 e *S. cerevisiae*: 0.19855.

Partindo para um outro viés, a análise filogenética das 5 sequências de actina encontradas em *T. cruzi* (Figura 10), mostrou que a actina 2 está filogeneticamente mais próxima da actina 1 (isoforma mais conservada) do que das outras isoformas, principalmente das actinas 4 e 5, que formam um clado separadamente, indicando uma maior distância filogenética. Ainda, os genes das actinas 2 e 3 não apresentaram sintenia nos demais tripanosomatídeos, apesar de terem 63% e 56% de homologia com a actina 1, respectivamente. Isso poderia sugerir que, apesar da semelhança entre elas, é possível que cada uma destas actinas desempenhe uma função diferente na biologia deste parasita.

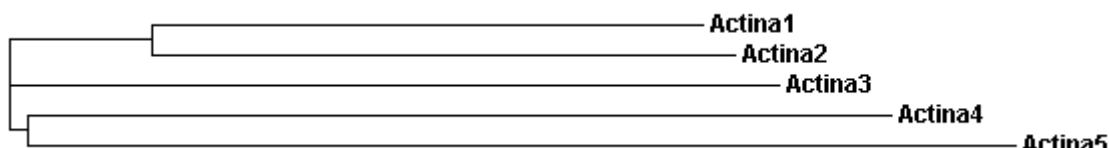


Figura 10. Árvore filogenética das actinas de *T. cruzi*. Alinhamento filogenético realizado através do método *Neighbour-joining*, pelo programa Clustal Omega.

Os tripanosomatídeos também possuem peculiaridades associadas a proteínas relacionadas a actina. Proteínas como as da família da CapZ, só foram encontradas em *T. cruzi*, o que pode sugerir que, apesar dos filamentos de actina propriamente ditos não terem sido observados, existem proteínas que possam auxiliar na maquinaria da polimerização/despolimerização (DE MELO, 2008). Esse fato corrobora com o resultado apresentado por Cevallos (2011), que demonstra que as actinas 3 e 4 são mais próximas, evolutivamente, de proteínas relacionadas a actina do que à actina propriamente dita. Essa

proximidade poderia sugerir que talvez essas actinas tenham uma função de proteínas acessórias, apesar de sua anotação no genoma como “actina, putativa”.

Além dos alinhamentos com a sequência da actina 2, também foi realizada uma análise estrutural dessa proteína a partir do programa Phyre2® (como descrito no item 3.1). A análise pelo *software* revelou que a sequência analisada possui 95% de cobertura com a proteína relacionada a actina 8 (Arp8) de humanos, e áreas da sequência que possui domínios de ligação a nucleotídeos (semelhantes aos presentes na Arp8). Desta forma, o programa determinou (não experimentalmente) a estrutura tridimensional da Actina 2 de *T. cruzi* baseada na estrutura 3D da Arp8 (Figura 11).

De acordo com o trabalho publicado por Gerhold (2012), a Arp8 é uma variação de ARP (*Actin Related Protein*) que é capaz de se ligar ao ATP (Adenosina Tri-Fosfato) e que, há frações da sequência de longos *loops* que se dobram entre si, podendo causar uma forte estabilidade ao se ligar ao ATP, impossibilitando a polimerização dessa proteína, já que a polimerização dos filamentos é guiada pela hidrólise do ATP. Esta característica estrutural poderia explicar o porquê de filamentos propriamente ditos nunca terem sido observados em *T. cruzi*.

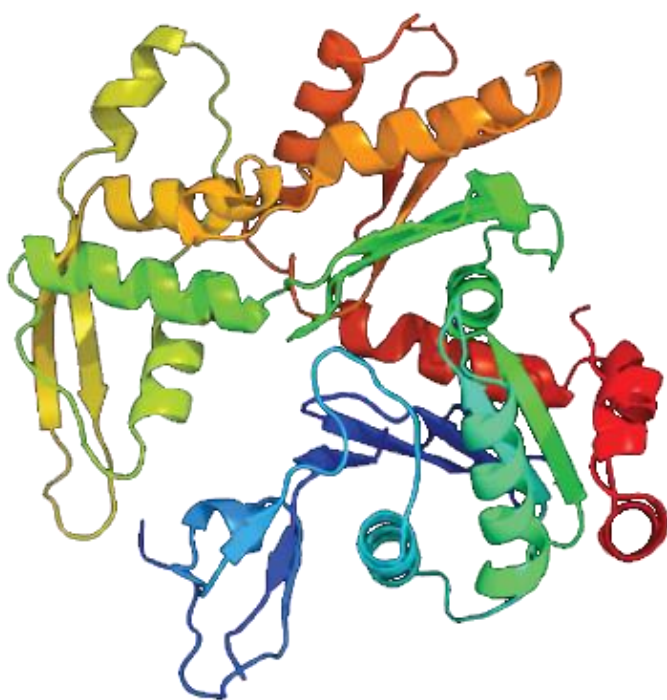


Figura 11. Esquema da estrutura tridimensional da Actina 2. Em vermelho a porção amino terminal e em violeta a porção carboxi terminal da proteína (Imagem obtida através do programa Phyre2®).

Ainda neste trabalho, Gerhold indica que a Arp8 possui, além de similaridades (como a presença de sítios ativos de ligação estável com ATP), importantes diferenças com a actina, pois parece ter uma atividade regulada alostéricamente pela enzima ATPase. Como mencionado anteriormente, os *loops* podem enrijecer a estrutura da actina e transmitir as alterações de conformação devido a interações que podem haver com nucleotídeos de proteínas parceiras (GERHOLD, 2012).

Mesmo levando em consideração que a melhor forma de determinar a estrutura 3D de uma proteína é a forma experimental (através de cristalografia e ressonância magnética nuclear – RMN), os resultados obtidos através da análise *in silico* (não experimentais) do Phyre2 ao menos trazem alguma luz à possíveis características funcionais que poderiam ser esperadas da actina 2, como por exemplo a presença dos *loops* de ligação estável a nucleotídeos, e sua possível relação com a função e comportamento da proteína (capacidade de formação de polímeros de actina, por exemplo).

4.2 ANTICORPO POLICLONAL

Para a produção do soro policlonal e posteriormente anticorpo monoclonal que reconheça especificamente a actina 2, foram utilizados peptídeos que correspondem à uma região específica da actina 2, não conservada nas outras isoformas (como elucidado no item 3.8) para a imunização dos camundongos.

O peptídeo utilizado foi obtido comercialmente através da empresa GeneScrip®. No processo da produção desse peptídeo, as sequências foram fusionadas a proteína KLH para aumentar a resposta imune dos camundongos a serem inoculados. Por outro lado, essa fusão poderia interferir no processo de seleção dos hibridomas, já que utilizaríamos o ensaio de ELISA para tria-los

e nesse caso, não seria possível distinguir hibridomas que fossem positivos para o peptídeo ou para a KLH. A solução para este problema foi utilizar a proteína (e não o peptídeo) para a sensibilização das placas de ELISA. Desta forma, a actina 2 deveria ser obtida através de expressão heteróloga (item 3.7).

Para isso, a sequência da actina 2 foi inserida em vetor pDEST 17 (plataforma Gateway®) que foi utilizado para transformar a estirpe Rosetta-gami™ 2 de *E. coli*. Inicialmente foi feito um teste de indução, utilizando 300 µM de IPTG (colônias induzidas), e como controle, colônias não induzidas (crescidas na ausência de IPTG). Extratos brutos das culturas crescidas na presença ou na ausência de IPTG (induzido e não-induzido) foram obtidos e aplicados em gel de poliácridamida, onde pode-se observar a presença de uma banda no tamanho esperado nas frações induzidas dos extratos (Figura 12).

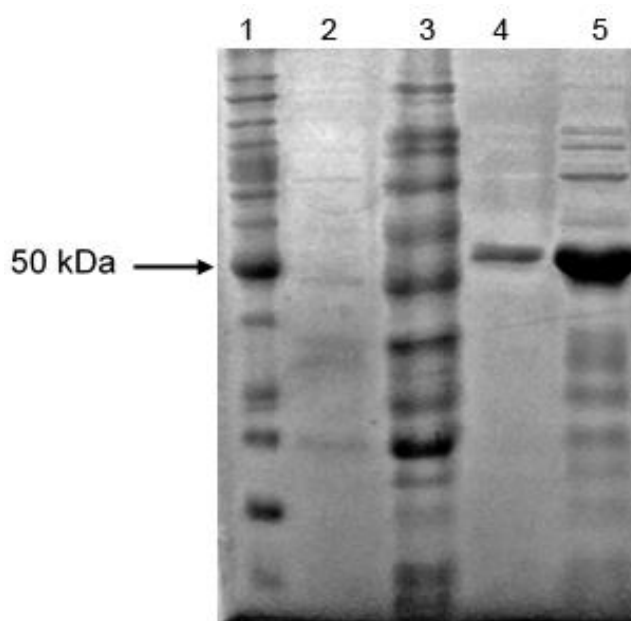


Figura 12. Teste de indução de colônias transformadas com actina 2 em pDEST17 com 300 µM de IPTG por 3 horas. 1) Marcador. 2) Extrato bruto de colônias não induzidas. 3) *Pellet* de colônias não induzidas. 4) Extrato bruto de colônias induzidas. 5) *Pellet* de colônias induzidas.

Após confirmação de que a actina 2 estava sendo expressa corretamente de forma heteróloga sob indução do IPTG, partiu-se para a tentativa de obter a proteína em fração solúvel. Para isso foram testados

diversos tempos e temperaturas de indução, conforme item 3.7. No entanto, em todas as condições testadas, a proteína apresentou-se na fração insolúvel. A figura 13 mostra o gel de um dos testes de indução onde a presença da proteína após indução é observada apenas na fração insolúvel.

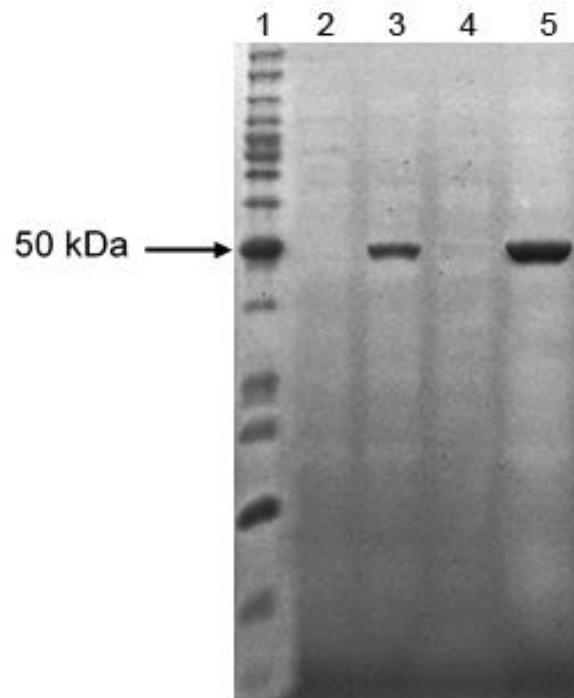


Figura 13. Teste de solubilidade da actina 2 expressa de forma heteróloga. 1) Marcador. 2) Extrato bruto da cultura não induzida. 3) Extrato bruto da cultura induzida. 4) Fração solúvel da cultura induzida. 5) Fração insolúvel da cultura induzida.

Já que não foi possível a obtenção da proteína na fração solúvel, optou-se pela eluição dessa proteína pelo método do gel preparativo. Após 3 dias de eluição, os extratos foram analisados por gel de poliacrilamida, e verificada a presença de uma banda no tamanho esperado nas frações eluídas (Figura 14).

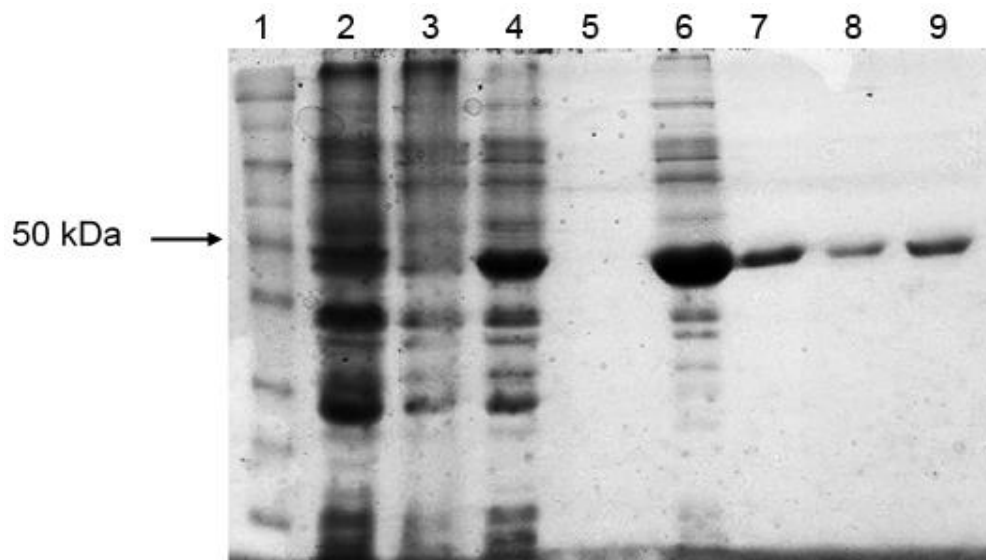


Figura 14. Eluição da proteína recombinante. 1) Marcador. 2) Extrato bruto de cultura selvagem de Rosetta-gami 2 (não transfectada com vetor). 3) Extrato bruto de cultura transformante não induzida. 4) Extrato bruto de cultura transformante induzida. 5) Fração solúvel de cultura transformante induzida. 6) Fração insolúvel de cultura transformante induzida. 7) Eluído 1. 8) Eluído 2. 9) Eluído 3.

Além da sensibilização das placas de ELISA (conforme elucidado acima), a proteína purificada (eluída do gel preparativo) também foi utilizada para testar a reatividade do soro policlonal obtido após a imunização dos animais com o peptídeo. Foi então realizado um ensaio de *Dot Blotting* (item 3.8.2), a partir do qual observou-se reatividade positiva do soro, de acordo com cada diluição realizada (Figura 15). Este resultado confirma não somente que a imunização dos animais foi realizada com sucesso, mas também que o soro policlonal obtido pela imunização com o peptídeo era capaz de reagir contra a proteína recombinante.

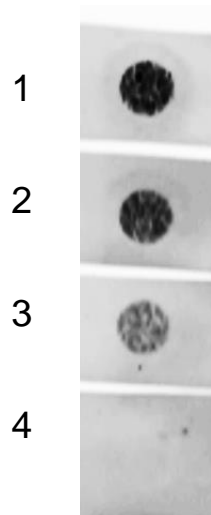


Figura 15. Dot Blotting mostrando reação do soro policlonal (obtido após imunização dos animais com o peptídeo sintético) contra a proteína recombinante (500 ng). 1) Soro policlonal diluído 1:1000. 2) Soro policlonal diluído 1:2000. 3) Soro policlonal diluído 1:3000. 4) Soro pré-imune.

Para confirmar o tamanho da proteína reconhecida pelo soro policlonal no *Dot Blotting* foi realizado ensaio de *Western Blotting*, onde 100 ng da proteína recombinante foram aplicados em gel de poliacrilamida e, como controle negativo (para descartar a existência de reação cruzada) foi utilizado extrato de *E. coli* Rosetta-gami 2 (onde a proteína havia sido produzida). Nesse ensaio foram testadas diferentes diluições do soro policlonal. Na figura 16 é possível observar bandas do tamanho esperado para a proteína recombinante (43,6 kDa mais 1 kDa do tag de 6XHis) apenas nos poços onde havia sido aplicada a proteína recombinante, descartando a hipótese de reação cruzada com proteínas de *E. coli*.

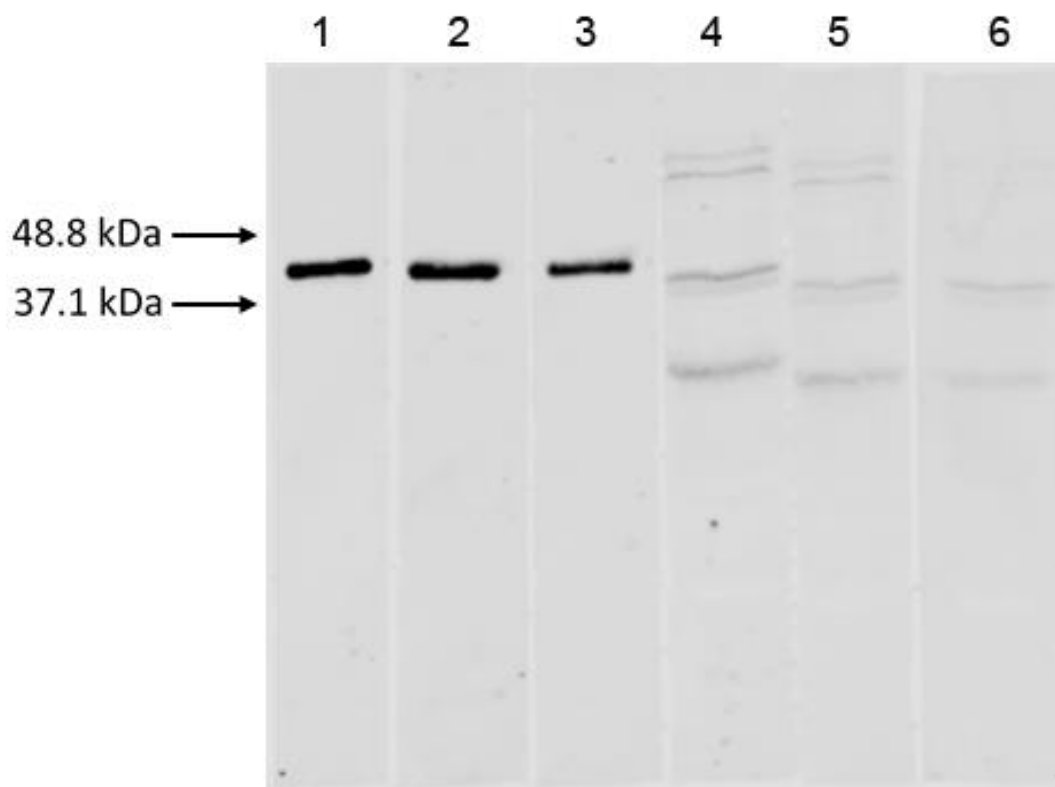


Figura 16. Western Blotting contra proteína recombinante e extrato de *E. coli* utilizando diferentes diluições do soro policlonal obtido de camundongos imunizados com o peptídeo da actina 2. 1) Proteína recombinante, diluição do soro 1:1000. 2) Proteína recombinante, diluição do soro 1:2000. 3) Proteína recombinante, diluição do soro 1:3000. 4) Extrato de *E. coli*, diluição do soro 1:1000. 5) Extrato de *E. coli*, diluição do soro 1:2000. 6) Extrato de *E. coli*, diluição do soro 1:3000.

Também foi realizado ensaio de *Western Blotting* com extrato de proteínas (15 ng) de formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*, utilizando o soro policlonal em uma diluição de 1:500, onde pode-se observar uma única banda, do tamanho esperado da actina 2, indicando que o soro é específico e capaz de reconhecer a expressão da actina 2 em todas as formas de desenvolvimento utilizadas neste trabalho (Figura 17).

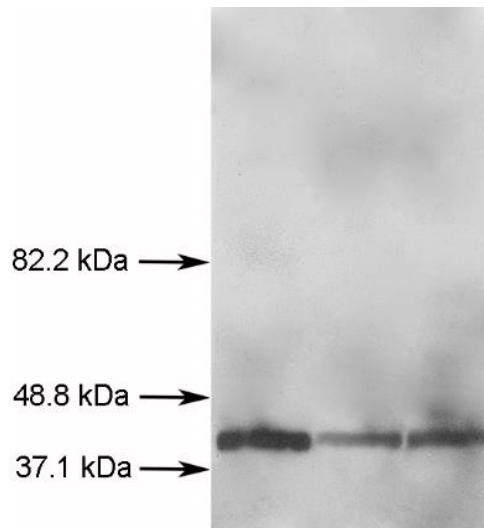


Figura 17. Western Blotting contra extratos de formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas. Foram aplicados 15 ng de proteína de cada extrato. Soro policlonal em diluição de 1:500.

A imagem obtida a partir do *Western Blotting* (Figura 17) foi utilizada para quantificar as bandas de cada extrato, com base na intensidade de cinza de cada banda da imagem, utilizando o programa ImageJ® (item 3.6.1). Resumidamente, a quantificação da intensidade da cor de cada forma deu origem a um gráfico cuja área foi calculada, e correlacionada com o nível de expressão da proteína nas diferentes formas de desenvolvimento (Gráfico 1). A forma epimastigota foi a que apresentou maior nível de expressão da actina 2. Quando comparadas à forma epimastigota, a forma amastigota teve uma tendência de diminuição de 41,8%, enquanto que a forma tripomastigota teve diminuição de 19,8%. Quando comparadas entre si, a forma tripomastigota teve menor expressão, tendo uma tendência de diminuição de 65,2% em relação à forma amastigota.

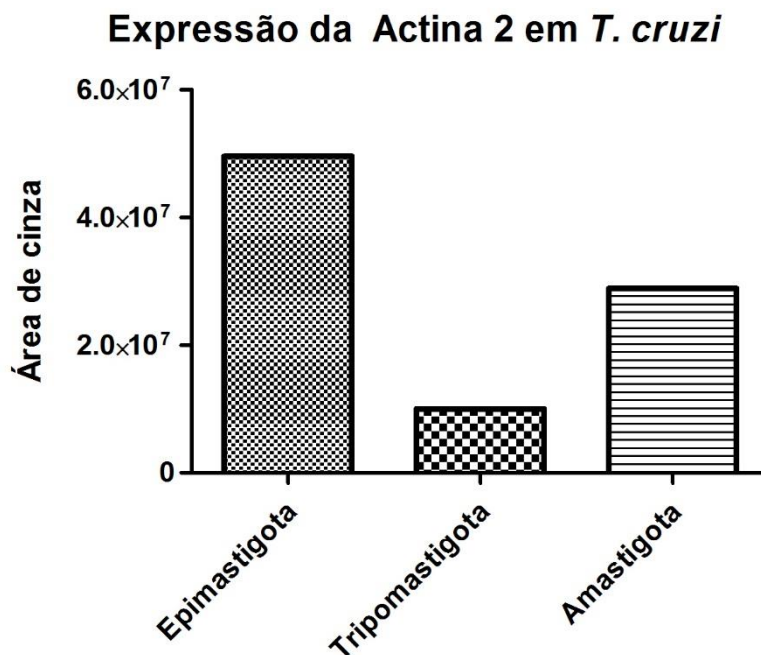


Gráfico 1. Análise de expressão da actina 2 em epimastigota, tripomastigota e amastigota de *T. cruzi*. A forma epimastigota teve tendência de maior expressão de actina 2 quando comparada as formas tripomastigotas (79,8% menor) e amastigotas (41,8% menor).

Uma hipótese que poderia explicar esta tendência de expressão aumentada da actina 2 em formas epimastigotas e (não tão intensamente) amastigotas seria um possível papel desta proteína no processo de endocitose via complexo citóstoma/citofaringe. Primeiramente porque, por ser exclusiva de *T. cruzi*, especulamos que poderia estar relacionada com alguma função celular também exclusiva desta espécie. Sabe-se que, diferentemente de outros tripanosomatídeos como *T. brucei* e *Leishmania*, o principal portal de endocitose em formas epimastigotas de *T. cruzi* encontra-se no complexo citóstoma/citofaringe. Além disso, a participação de actina no processo de brotamento de vesículas oriundas da via endocítica já foi descrita em eucariotos superiores (GALLETA, 2009). Ainda, a expressão menos pronunciada em formas amastigotas quando comparada à epimastigotas, mas ainda assim, maior que em tripomastigotas, pode ser explicada de acordo com os dados obtidos por Batista e colaboradores (2015). Neste trabalho, os autores demonstraram que formas amastigotas intracelulares isoladas de *T.*

cruzi desempenham alguma atividade endocítica, apesar de apresentarem níveis mais baixos do que epimastigotas, enquanto que em formas tripomastigotas ainda não foi relatado nenhum tipo de endocitose. Outro fato que suporta essa teoria é a presença do complexo citóstoma-citofaringe apenas nas formas epimastigotas e amastigotas (VATARUNAKAMURA, 2005). Futuramente, uma forma de comprovar esta hipótese, seria a obtenção de parasitas knockout (KO) para actina 2, ou, caso não seja viável, a obtenção de parasitas com níveis de expressão diminuídos de actina 2, para a realização de ensaios de endocitose.

O soro policlonal foi então utilizado para a imunolocalização da actina 2 nas diferentes formas de desenvolvimento de *T. cruzi*. A imunofluorescência indireta de formas epimastigotas demonstrou uma marcação dispersa pelo corpo do parasita, com uma maior concentração na região perinuclear (Figura 18).

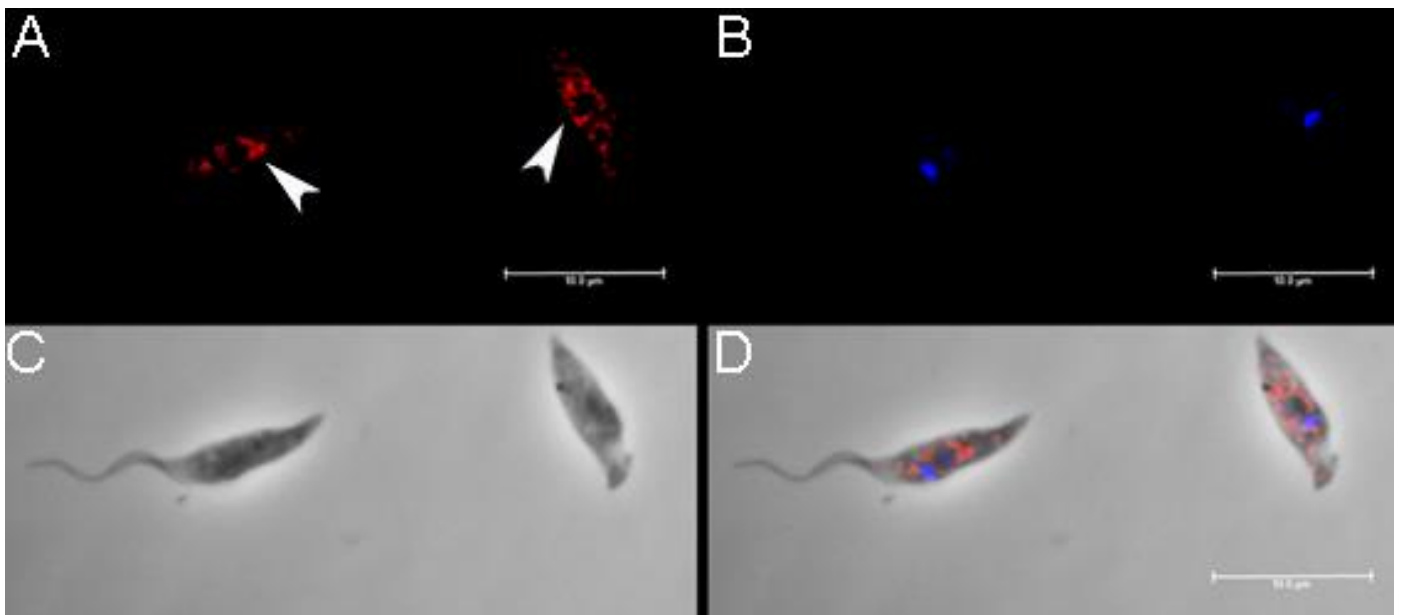


Figura 18. Imunofluorescência da actina 2 em formas epimastigota de *T. cruzi*. A) Alexa 594 nm. B) Hoescht. C) Contraste de fase. D) Merge. Cabeças de seta apontam marcação concentrada na região perinuclear do parasita.

Essa marcação obtida em formas epimastigotas parece estar mais concentrada ao redor do núcleo, podendo corresponder a regiões de importantes organelas celulares, tais como retículo endoplasmático, vesículas citoplasmáticas (incluindo vesículas oriundas da via endocítica), e/ou complexo citóstoma-citofaringe. A marcação pode ser melhor observada na figura 19.

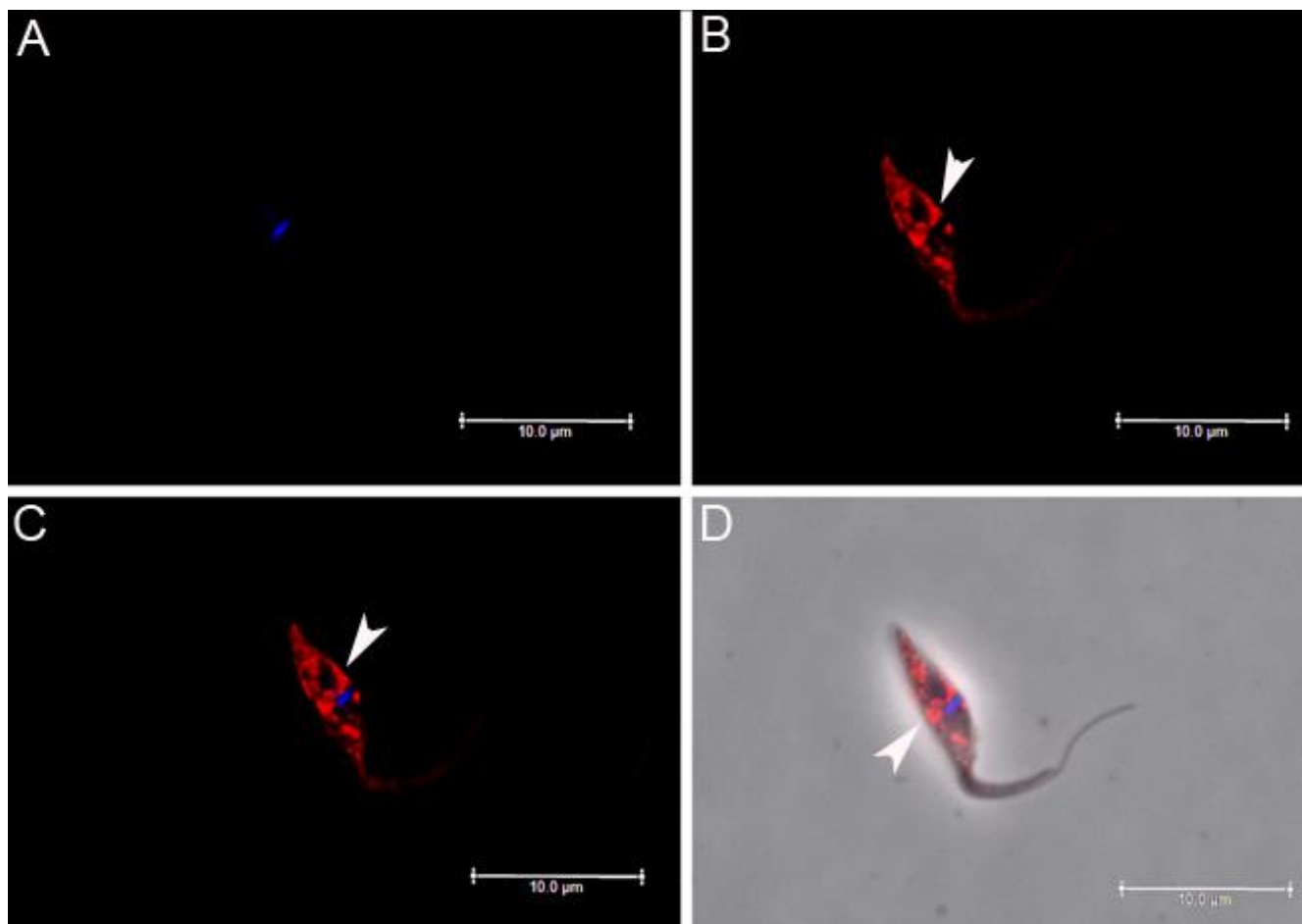


Figura 19. Imunofluorescência da actina 2 em formas epimastigota de *T. cruzi*. A) Hoescht. B) Alexa 594 nm. C) Merge. D) Merge com contraste de fase. Cabeças de seta apontam a marcação concentrada na região perinuclear do parasita.

Análises proteômicas de *T. cruzi* indicaram a presença de actina nos reservossomos, organela presente na via endocítica do parasita (SANT'ANNA, 2009). Porém, até hoje, a única função fisiológica da proteína demonstrada neste parasita tem sido relacionada a endocitose (BOGITSH, 1995 e GARCÍA-

SALCEDO, 2004). Ainda, a possível localização da actina na região do complexo citóstoma-citofarínge de formas epimastigotas de *T. cruzi* implicaria na presença de um citoesqueleto contráctil nessa região (SOUZA, 2013).

Nas formas tripomastigotas a marcação não é tão forte e frequente como em epimastigotas, e, apesar de não ser identificada em todos os parasitas, se mostra concentrada principalmente na região perinuclear (Figura 20).

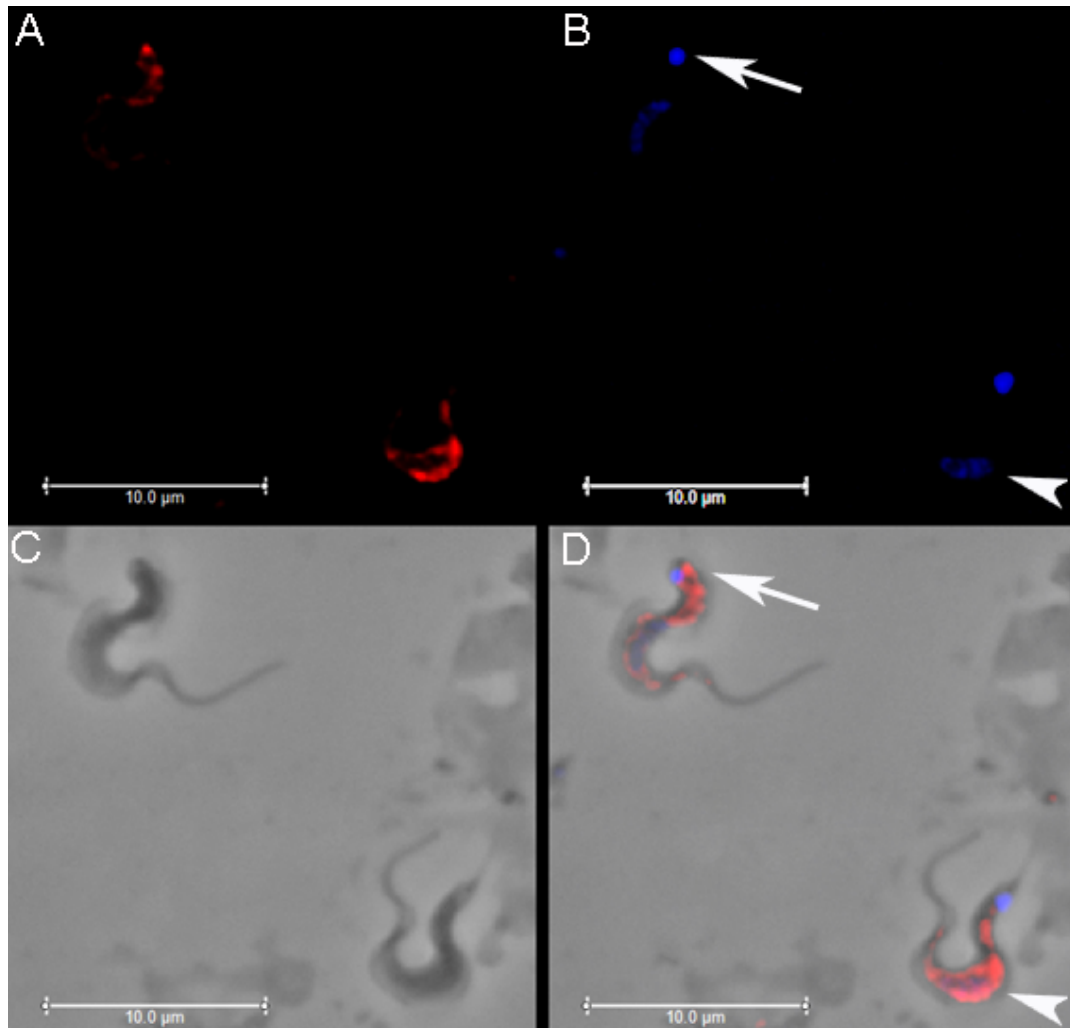


Figura 20. Imunofluorescência da actina 2 em formas tripomastigota de *T. cruzi*. A) Alexa 594 nm. B) Hoescht. C) Contraste de fase. D) Merge. Cabeças de seta apontam o núcleo; Setas apontam o cinetoplasto.

A observação de uma marcação pouco frequente e fraca (principalmente quando comparada com a marcação em formas epimastigotas) está de acordo

com o resultado obtido pela análise da expressão da actina 2 nas três formas de desenvolvimento (Gráfico 1), onde as formas tripomastigotas foram as que apresentaram menor nível de expressão.

Complementarmente, a imunofluorescência das formas amastigotas mostrou marcação dispersa por todo o corpo do parasita, sendo mais frequente e mais intensa que nas formas tripomastigotas (Figura 21). Novamente, estes dados também corroboram os dados do gráfico 1.

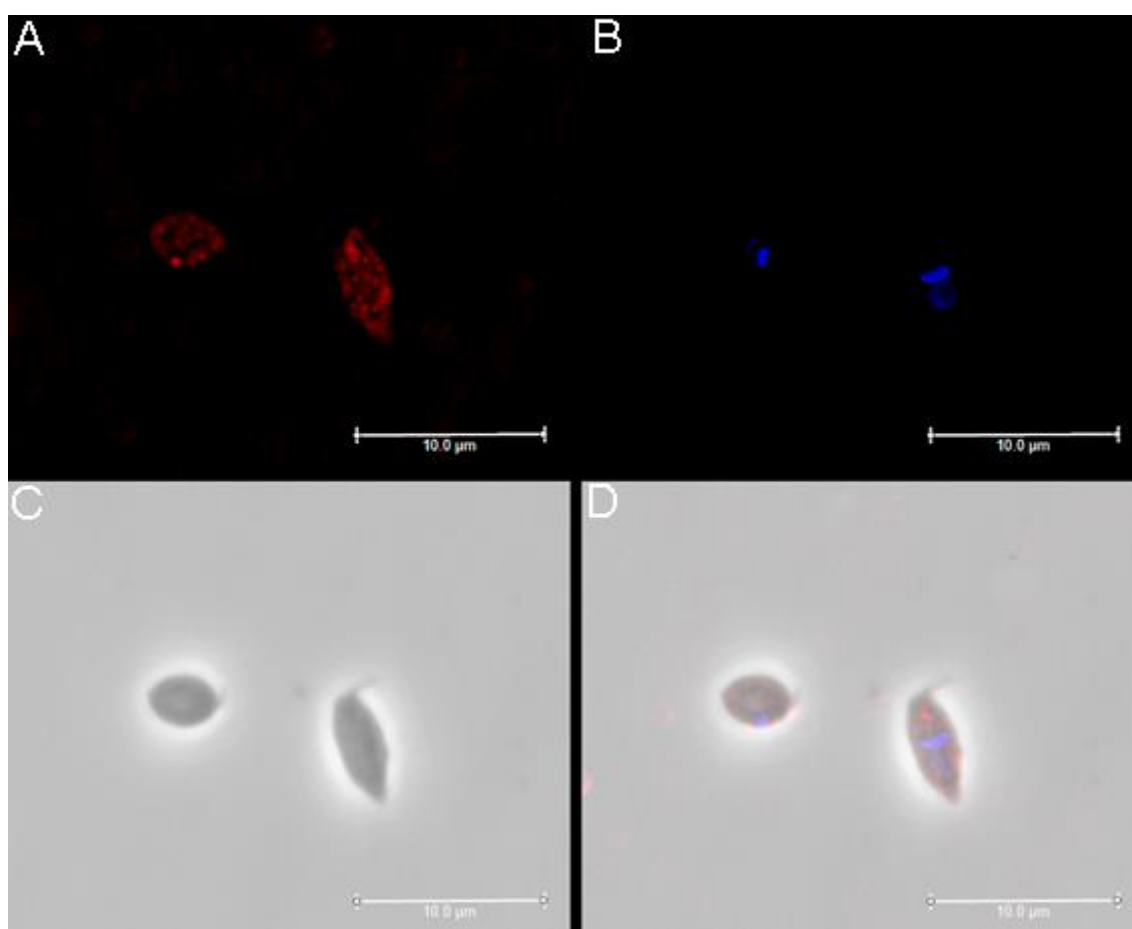


Figura 21. Imunofluorescência da actina 2 em formas amastigotas de *T. cruzi*. A) Alexa 594 nm. B) Hoescht. C) Contraste de fase. D) Merge.

Após realizados estes ensaios, foi iniciada a etapa de fusão dos hibridomas com os esplenócitos retirados dos camundongos imunizados, para

posterior seleção e obtenção dos hibridomas positivos para actina 2. Após chegar à etapa de triagem dos hibridomas (item 3.8.6), foi observada contaminação das culturas, de forma que as mesmas tiveram de ser descartadas. No momento, outros animais estão sendo imunizados para repetição do experimento.

A obtenção de anticorpo monoclonal é importante principalmente por duas razões: primeiramente, ele pode se tornar uma ferramenta de obtenção infinita; e a segunda é que, após a triagem dos hibridomas, obtém-se um anticorpo que é mais específico, e que neste caso reconheceria apenas a isoforma em estudo. No entanto, nosso principal objetivo na obtenção de anticorpo monoclonal é a primeira razão, uma vez que, tendo os animais sido imunizados com um pequeno peptídeo específico da Actina 2, supomos que o soro policlonal obtido tenha uma especificidade muito grande. A intenção não é possuir apenas um clone, mas sim, nos certificarmos que, mesmo policlonal, o reconhecimento seja exclusivo para a isoforma 2. Assim, nosso objetivo de obtenção de uma ferramenta específica para estudar a actina 2 já teria sido alcançado com este soro policlonal. Para demonstrar esta especificidade, foi realizado um ensaio de *Dot Blotting*, onde as membranas que foram incubadas com este soro supostamente específico, continham, além da isoforma de interesse deste trabalho (actina 2), outras isoformas de actina de *T. cruzi* (actina 1 e actina 4) que são muito semelhantes. Na Figura 22 é possível observar que em nenhuma das diluições utilizadas o soro, ainda que policlonal, houve reconhecimento de outra isoforma de actina (actina 1, A; actina 4, C) do *T. cruzi*, que não tenha sido a própria actina 2 (B).

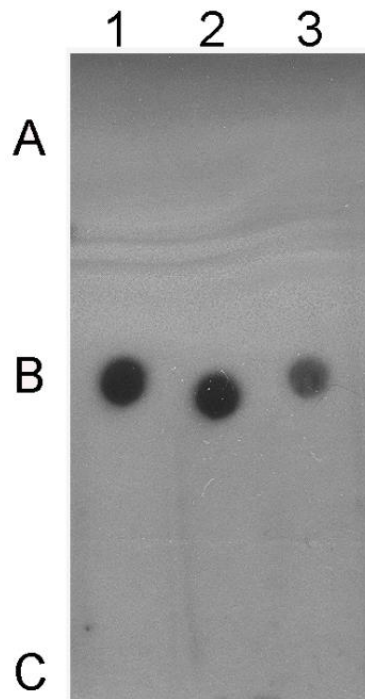


Figura 22. Dot Blotting das actinas 1, 2 e 4 contra soro policlonal que reconhece especificamente a actina 2. 1) Soro policlonal na diluição de 1:1000. 2) Soro policlonal na diluição de 1:2000. 3) Soro policlonal na diluição de 1:3000. A) Proteína Actina 1. B) Proteína actina 2. C) Proteína actina 4.

O soro policlonal também foi utilizado para realizar ensaios de imunocitoquímica em formas epimastigotas de *T. cruzi*. Foi observada uma marcação dispersa por todo o corpo do parasita, corroborando com os resultados obtidos pelos ensaios de imunofluorescência (Figura 23 B-D). Porém, não foram vistas aglomerações de marcação em regiões perinucleares nem em organelas específicas como retículo endoplasmático ou complexo citóstoma-citofaringe. Ainda são necessários mais experimentos para confirmar sua localização no parasita, não só em formas epimastigotas, mas também em tripomastigotas e amastigotas.

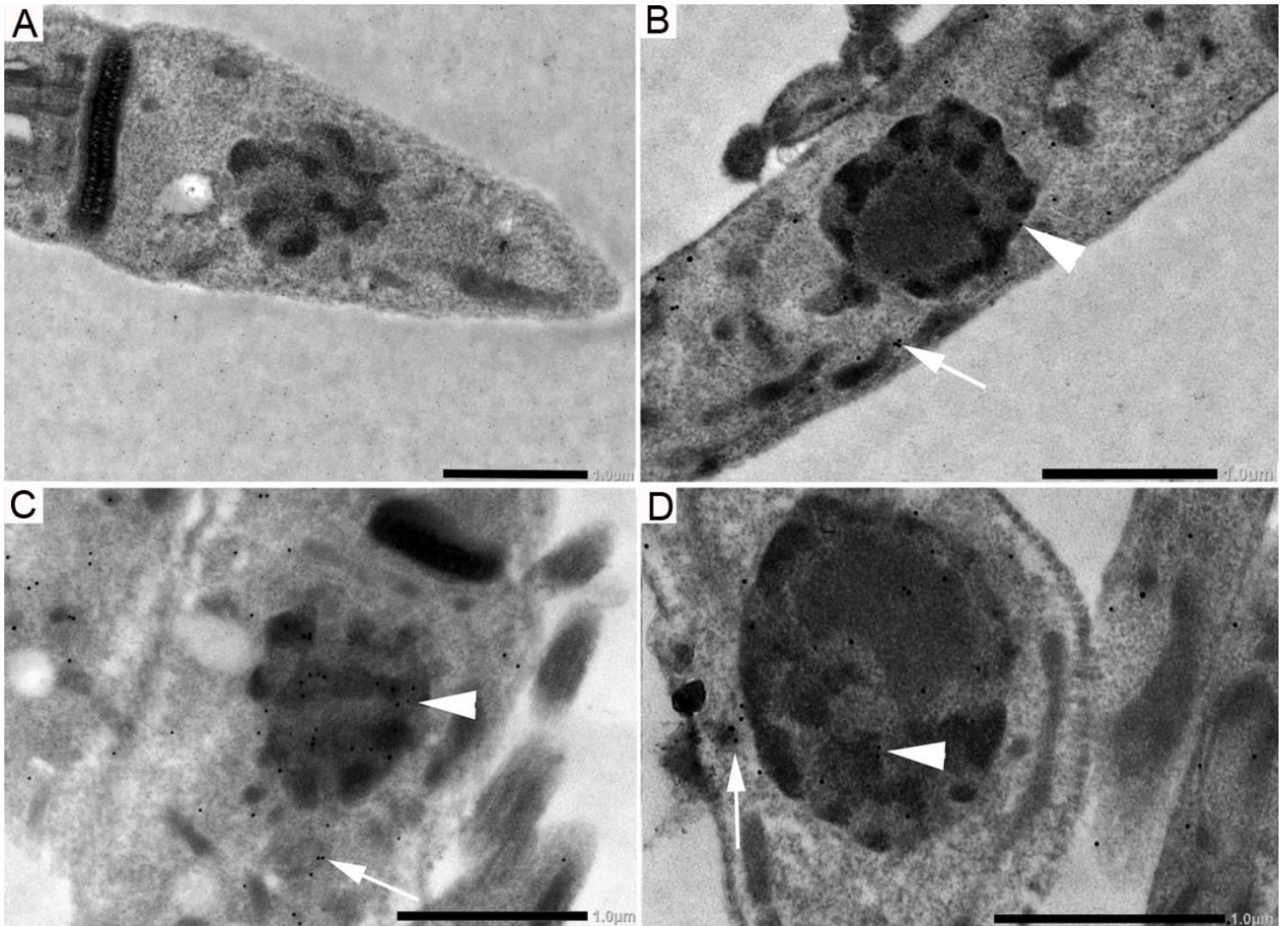


Figura 23. Imunolocalização ultraestrutural de formas epimastigotas de *T. cruzi*. A) Corte ultrafino incubado apenas com anticorpo secundário conjugado a ouro coloidal de 15 nm. B - D) Cortes ultrafinos de formas epimastigotas incubados com soro policlonal contra actina 2, e anticorpo secundário anti-camundongo conjugado a ouro coloidal de 15 nm. Cabeças de seta apontam para marcação nuclear e setas para marcação citoplasmática. Barra 1 µm.

4.3 PARASITAS TRANSFECTANTES

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram transfectadas com vetores contendo a sequência da actina 2 fusionada a etiqueta FLAG, e contendo sítio de resistência a neomicina tanto de forma episomal como por recombinação homóloga. Até o momento, não foi possível obter transfectantes por

recombinação homóloga (com a etiqueta na porção C-terminal da proteína) e paralelamente estão sendo realizados ensaios para a obtenção de parasitas transfectados com a etiqueta na porção N-terminal da proteína.

Das culturas de parasitas transfectados com vetor episomal na posição C-terminal e selecionados com neomicina, foi realizada a extração de DNA e de proteína para confirmar a presença do cassete. Oligonucleotídeos iniciadores que amplificam uma região específica do vetor transfectado (intergênicas) foram utilizados para amplificação do vetor a partir do extrato de DNA dos parasitas transfectados. A imagem do gel contendo o produto da reação de PCR mostrou uma banda do tamanho esperado da amplificação, que incluía a sequência das regiões intergênicas e da actina 2 (figura 24).

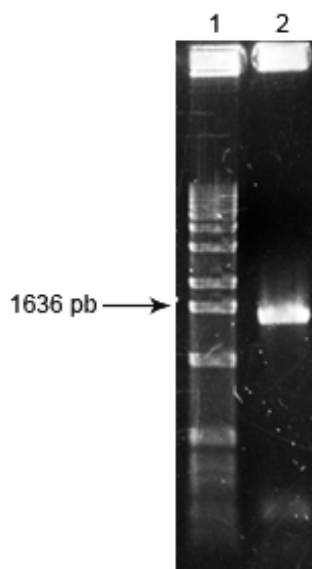


Figura 24. PCR de extrato de DNA de parasitas transfectados com vetor episomal contendo actina 2 fusionada a FLAG. 1) Marcador. 2) Produto de PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores que flanqueiam regiões intergênicas específicas do vetor transfectado, incluindo a sequência da actina 2 (1429 pb).

Foi realizado também ensaio de *Western Blotting*, utilizando como anticorpo primário o anticorpo anti-FLAG (camundongo, Sigma®) diluído 1:1000. Como controle positivo foi utilizado extrato de proteína de parasitas previamente transfectados e confirmados com a presença da actina 1

fusionada a FLAG. Como controle negativo foi utilizado extrato de formas epimastigotas tipo selvagem. Foi possível observar a presença de uma banda no tamanho esperado da proteína nos extratos de parasitas transfectados (Figura 25).

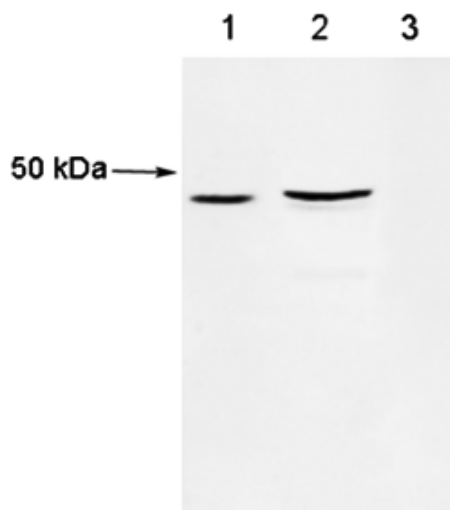


Figura 25. Western Blotting com extratos de epimastigotas transfectados ou selvagens utilizando anticorpo anti-FLAG. 1) Extrato de parasitas expressando actina 1 fusionada a FLAG (42 kDa mais 3 kDa do FLAG). 2) Extrato de parasitas transfectados com actina 2 fusionada a FLAG na construção epissomal (43,6 kDa mais 3 kDa do FLAG). 3) Extrato de parasitas tipo selvagem.

As formas epimastigotas de *T. cruzi* que foram transfectadas de forma epissomal com a etiqueta FLAG foram utilizadas em ensaio de imunofluorescência.

A marcação utilizando o anticorpo anti-FLAG nos parasitas que continham o vetor de epissomal, se mostrou difusa pelo corpo do parasita, porém com uma concentração na região perinuclear, assim como visto na imunofluorescência realizada com o anticorpo policlonal (Figura 26).

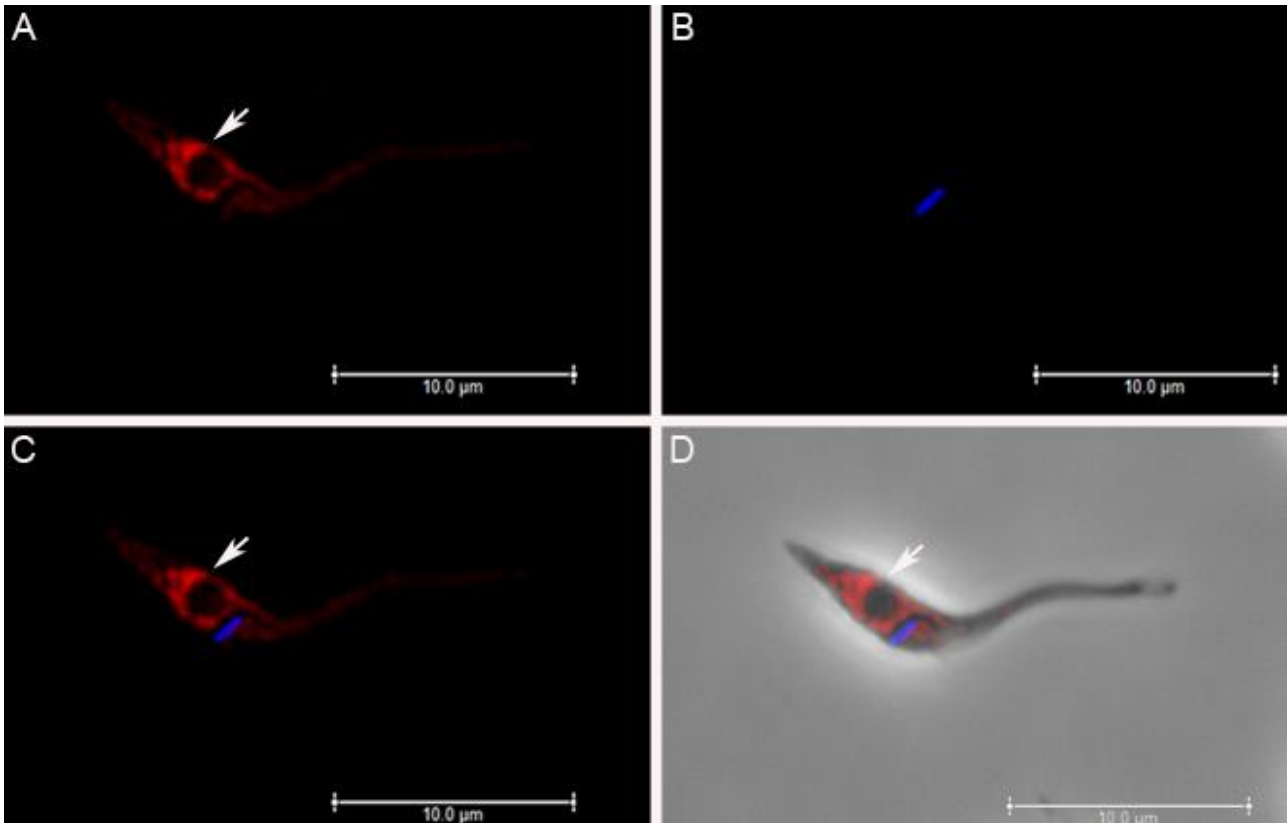


Figura 26. Imunofluorescência de formas epimastigota de *T. cruzi* expressando actina 2 fusionada a FLAG. A) Alexa 594 nm. B) Hoescht. C) Merge. D) Merge com contraste de fase. Setas apontam marcação evidente na região perinuclear, corroborando com resultados obtidos com o soro policlonal.

Para confirmar se a actina 2 fusionada a FLAG apresenta a mesma localização subcelular da actina 2 tipo selvagem (observada pela marcação com o soro), foi realizado um ensaio de co-localização nos parasitas transfectados, utilizando tanto anticorpo anti-FLAG quanto soro policlonal anti-actina 2 (que reconhece tanto a proteína fusionada expressa pelo vetor, quanto a proteína selvagem expressa pelo genoma do parasita), e anticorpos secundários conjugados a diferentes fluoróforos. Na figura 27A, podemos observar a marcação do anticorpo anti-FLAG em parasitas transfectados com a actina 2, na 27B o mesmo parasita transfectante, incubado com o soro policlonal anti-actina 2. Na figura 27D, podemos observar que as duas marcações possuem uma forte co-localização na região perinuclear do

parasita, indicando que provavelmente, a inserção da etiqueta à sequência da proteína não afetou seu endereçamento.

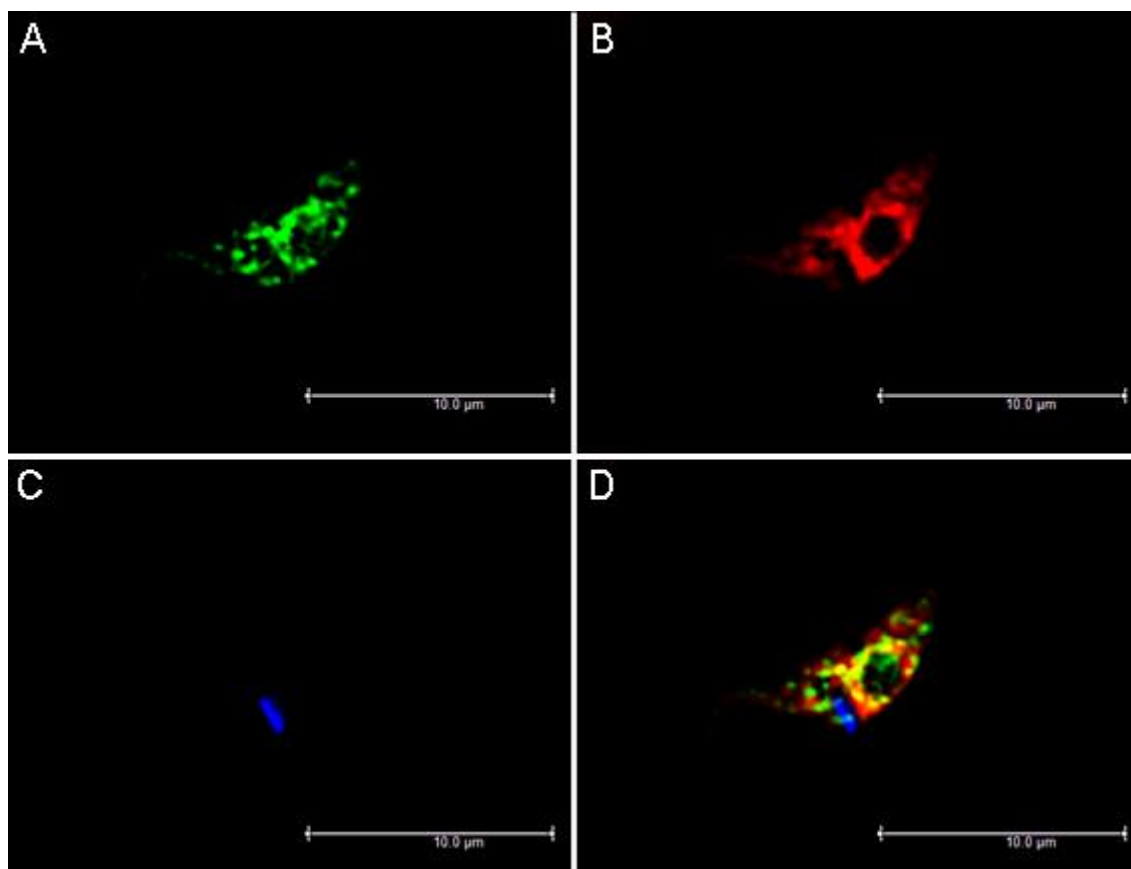


Figura 27. Dupla marcação de imunofluorescência de epimastigotas transfectados com actina 2 fusionada a FLAG. A) Alexa 488 nm / anti-FLAG (coelho). B) Alexa 594 nm / Soro policlonal anti-actina 2. C) Hoesht. D) Merge. Em amarelo, a co-localização das marcações.

Para confirmar a especificidade da marcação da etiqueta, foi comparada a fluorescência obtida com o anticorpo anti-FLAG em parasitas expressando a actina 1 fusionada a FLAG (Figura 28A), com a fluorescência do soro policlonal anti-actina 2 (Figura 28B). Pode-se observar que, quando as marcações são sobrepostas (Figura 28D), perde-se em grande parte a co-localização antes vista na figura 27D, confirmando a especificidade da marcação da etiqueta.

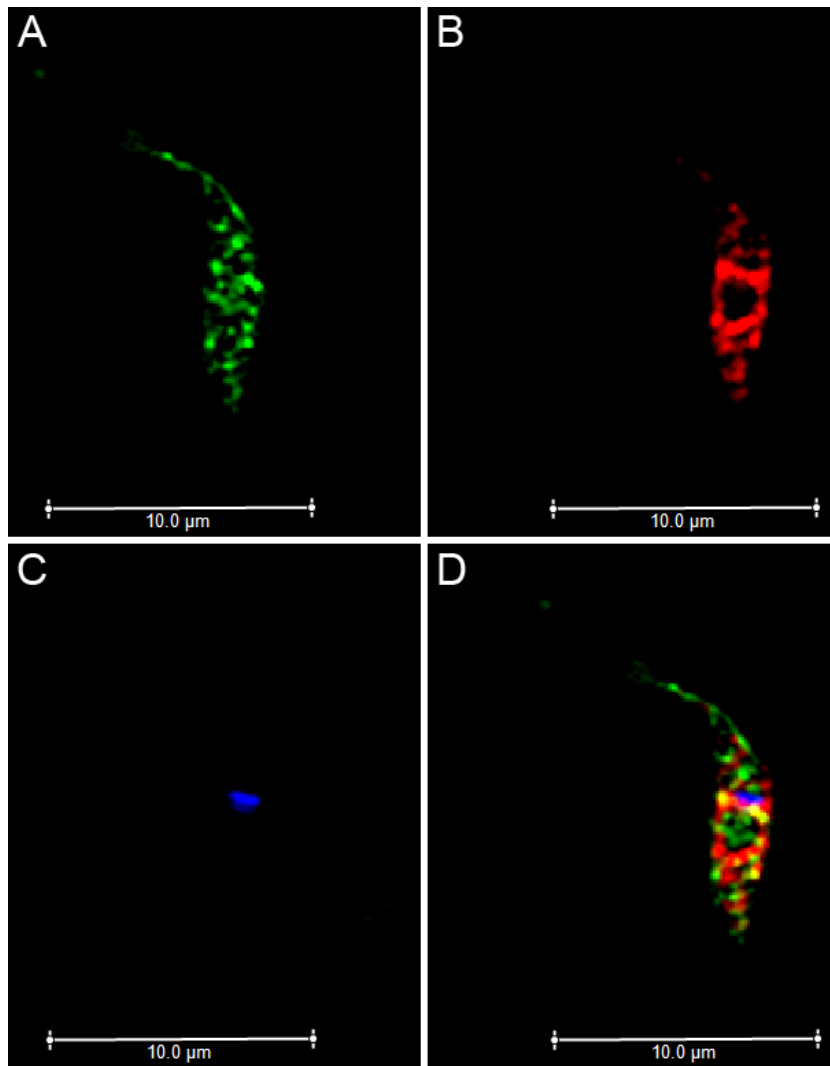


Figura 28. Dupla marcação de imunofluorescência de epimastigotas expressando a actina 1 fusionada a FLAG. A) Alexa 488 nm / anti-FLAG (coelho). B) Alexa 594 nm / Soro policlonal anti-actina 2. C) Hoesht. D) Merge.

Além de fusionar a etiqueta FLAG à porção carboxi-terminal da actina 2, também foram feitas fusões na porção amino-terminal. Após transfectado o cassete e selecionados os parasitas, a expressão da etiqueta foi verificada por *Western Blotting* (Figura 29).

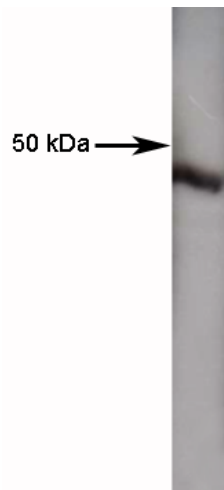


Figura 29. Western Blotting de extrato de epimastigotas expressando a Actina 2 fusionada a FLAG na porção N-terminal. Extrato de epimastigotas transfectados, na presença do anticorpo anti-FLAG em uma diluição de 1:1000. A banda aparece no tamanho esperado (aproximadamente 45 kDa).

A presença da etiqueta foi confirmada também por imunofluorescência utilizando anticorpo anti-FLAG. Na figura 30 pode-se observar que a adição da etiqueta na porção N-terminal levou à uma mudança da marcação (comparada à marcação obtida previamente pela adição da etiqueta na porção C-terminal ou à marcação obtida com soro policlonal), indicando possível alteração no endereçamento da proteína.

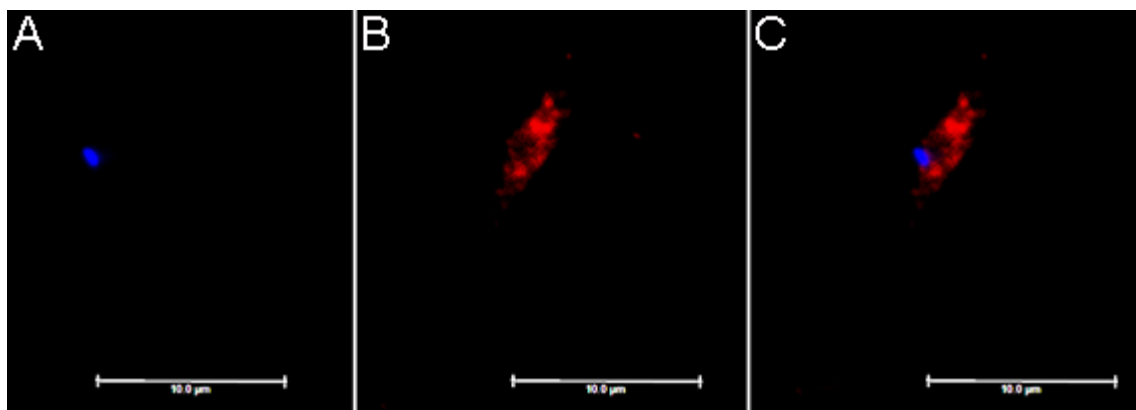


Figura 30. Imunofluorescência de formas epimastigotas expressando actina 2 fusionada à etiqueta FLAG na porção N-terminal. A) Hoersh. B) Alexa 594 / anti-FLAG em diluição de 1:1000. C) Merge.

Outra construção realizada para alternativas de fusão de etiqueta foi a utilização de um vetor contendo a etiqueta GFP na porção C-terminal. Após

transfecção e seleção, a presença do vetor foi confirmada por PCR (Figura 31), utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos do vetor transfectado.

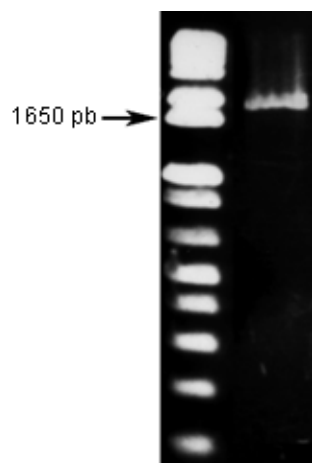


Figura 31. Produto de PCR a partir de extrato de DNA de parasitas transfectados com o vetor contendo a Actina 2 fusionada a GFP. 1) Marcador 2) Produto de PCR contendo banda no tamanho esperado (aproximadamente 1800 pb).

Foi realizado ensaio de *Western Blotting* para verificar a expressão da proteína fusionada à GFP, utilizando o extrato dos parasitas transfectados e anticorpo anti-GFP (Figura 32).



Figura 32. *Western Blotting* de extrato de proteína de parasitas expressando a actina 2 fusionada à GFP. Extrato de epimastigotas transfectados, na presença do anticorpo anti-GFP. A banda aparece no tamanho esperado (aproximadamente 70 kDa).

Após confirmada a transfecção tanto por PCR quanto por *Western Blotting*, foram feitas duas abordagens de ensaio de fluorescência. A primeira delas, verificando a autofluorescência do GFP presente no parasita transfectado, a partir da qual não foi possível observar nenhuma fluorescência

(Figura 33). Apesar de não ter sido possível observar autofluorescência nos parasitas transfectados, seria possível realizar ensaios de citometria de fluxo para selecionar parasitas positivos para a expressão da GFP e a partir disso, cultivar colônias positivas para a expressão da proteína.

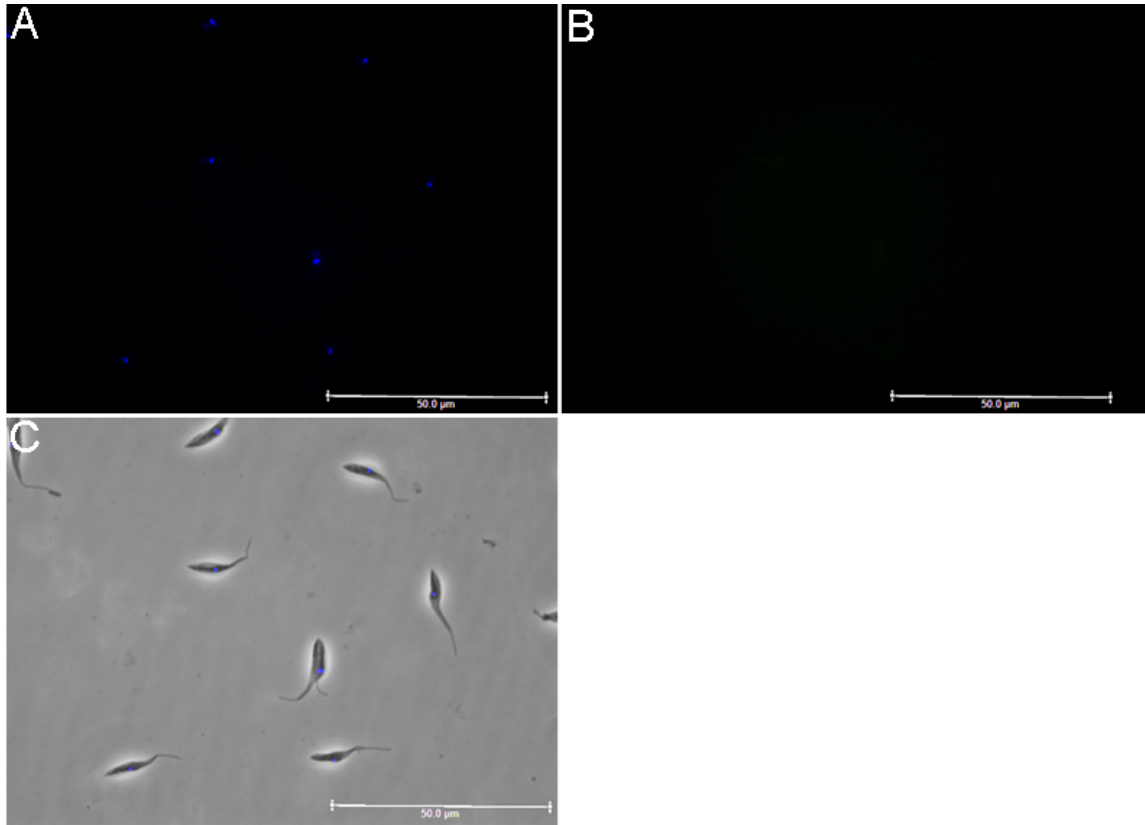


Figura 33. Autofluorescência de parasitas transfectados com actina 2 fusionada a GFP. A) Hoesht. B) Autofluorescência a 488 nm. C) Merge de A e B com contraste de fase.

A outra abordagem utilizada para verificar a fluorescência dos parasitas foi realizar a imunomarcação, utilizando o anticorpo anti-GFP, onde foi possível observar marcação. Porém, quando realizada a dupla marcação com o soro policlonal, não foi possível observar co-localização das marcações, indicando que possivelmente, esta construção também alterou o endereçamento da actina 2, tornando esta ferramenta também pouco útil para a determinação da localização subcelular desta proteína (Figura 34).

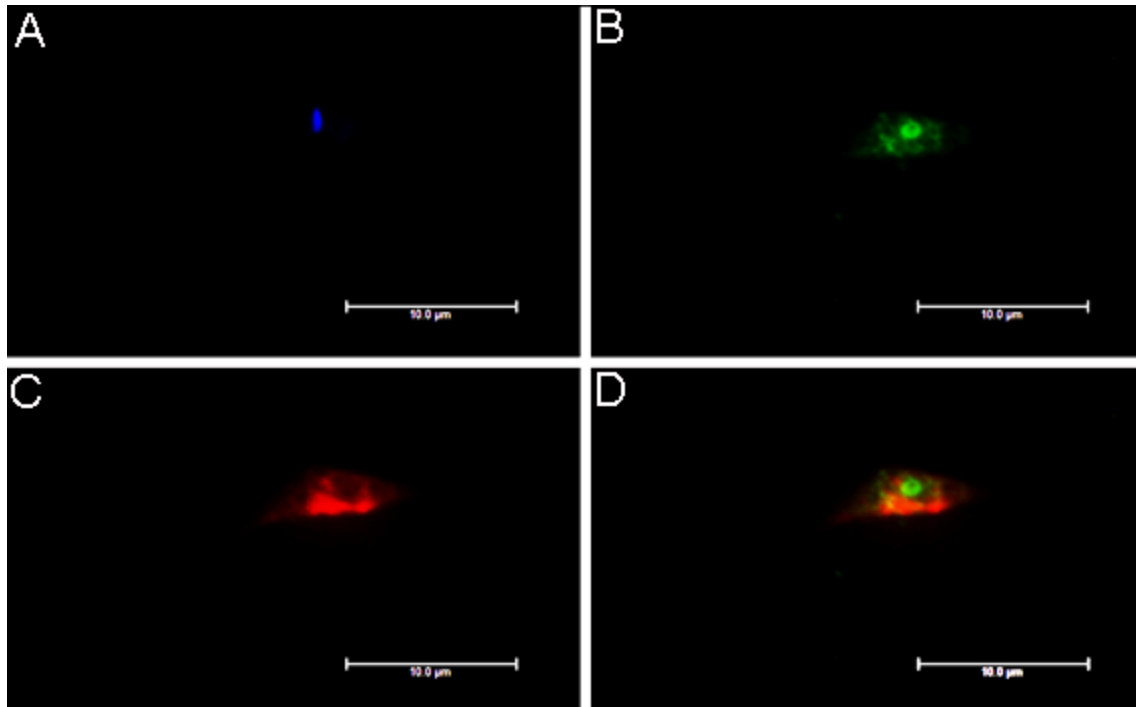


Figura 34. Dupla marcação de imunofluorescência de epimastigotas transfectados com actina 2 fusionada a GFP. A) Hoescht. B) Alexa 488 / anti-GFP (coelho). C) Alexa 594 / Soro policlonal anti-actina 2. D) Merge de B e C.

A partir desses resultados, no quesito produção de ferramentas, foi possível concluir que, para a actina 2, apenas a construção do cassete contendo a proteína fusionada a FLAG na porção C-terminal foi viável e corroborou com os resultados obtidos previamente a partir do soro policlonal. Essa ferramenta no futuro poderá ser utilizada em ensaios de imunoprecipitação e espectrometria de massas para verificação de proteínas parceiras da actina 2.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após análise *in silico* foi possível concluir que a actina 2 é a isoforma mais peculiar das actinas de *T. cruzi*. Ela é exclusiva de *T. cruzi*, assim como a isoforma 3. No entanto, a isoforma 3 parece estar filogeneticamente mais próxima de proteínas tipo actina (ALPs) e proteínas relacionadas à actina (ARPs) do que da isoforma mais conservada (actina 1). A actina 2, apesar de ter 63% homologia com a actina 1, poderia desempenhar uma função diferente na biologia deste parasita.

O soro policlonal produzido em camundongos a partir de uma sequência não conservada da actina 2, mostrou-se altamente específico por ensaios de *Dot Blotting*, *Western Blotting* e imunofluorescência. Esta é a primeira vez que se produz e aplica uma ferramenta que reconheça especificamente apenas uma das diferentes isoformas de actina de *T. cruzi*.

A análise dos níveis de expressão da actina 2 nas diferentes formas de desenvolvimento mostrou que esta proteína é expressa em níveis mais altos em formas epimastigotas, e apresenta tendência de diminuição em formas amastigotas e principalmente em tripomastigotas. Este resultado, juntamente com os resultados da imunolocalização da Actina 2 por imunofluorescência indireta utilizando soro policlonal específico anti-actina 2 nas diferentes formas de desenvolvimento, deram base à formulação de uma hipótese para uma possível função celular para a actina 2: papel na endocitose via complexo citóstoma/citofaringe. Outros experimentos, no entanto, deverão ser realizados para confirmar esta hipótese.

Quanto aos parasitas transfectantes, a melhor abordagem foi obtida a partir de parasitas que continham a etiqueta FLAG na porção C-terminal da proteína, tendo seus resultados corroborados com os obtidos a partir do soro policlonal em formas epimastigotas. Futuramente, estes parasitas poderão ser utilizados em ensaios de co-imunoprecipitação e espectrometria de massas para a determinação das proteínas parceiras da actina 2.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASAKURA S & OOSAWA F. **Dephosphorylation of adenosine triphosphate in actin solutions at low concentrations of magnesium.** Arch Biochem Biophys. 1960 Apr; 87:273-80.

BATISTA, C. M., KESSLER, R. L., EGER, I., SOARES, M.J. **Trypanosoma cruzi Intracellular Amastigotes Isolated by Nitrogen Decompression Are Capable of Endocytosis and Cargo Storage in Reservosomes.** Plos One. 10 (6), 2015.

BEN AMAR, M. F., PAYS, A, TEBABI, P., DERO, B., SEEBECK, T., STEINERT, M., & PAYS, E. **Structure and transcription of the actin gene of Trypanosoma brucei.** Molecular and Cellular Biology, 8(5), 2166–2176, 1988.

BERRIMAN, M., GHEDIN, E., HERTZ-FOWLER, C., BLANDIN, G., RENAULD, H., BARTHOLOMEU, D.C., LENNARD, N.J., CALER, E., HAMLIN, N.E., HAAS, B., BÖHME, U., HANNICK, L., ASLETT, M.A., SHALLOM, J., MARCELLO, L., HOU, L., WICKSTEAD, B., ALSMARK, U.C., ARROWSMITH, C., ATKIN, R.J., BARRON, A.J., BRINGAUD, F., BROOKS, K., CARRINGTON, M., CHEREVACH, I., CHILLINGWORTH, T.J., CHURCHER, C., CLARK, L.N., CORTON, C.H., CRONIN, A., DAVIES, R.M., DOGGETT, J., DJIKENG, A., FELDBLYUM, T., FIELD, M.C., FRASER, A., GOODHEAD, I., HANCE, Z., HARPER, D., HARRIS, B.R., HAUSER, H., HOSTETLER, J., IVENS, A., JAGELS, K., JOHNSON, D., JOHNSON, J., JONES, K., KERHORNOU, A.X., KOO, H., LARKE, N., LANDFEAR, S., LARKIN, C., LEECH, V., LINE, A., LORD, A., MACLEOD, A., MOONEY, P.J., MOULE, S., MARTIN, D.M., MORGAN, G.W., MUNGALL, K., NORBERTCZAK, H., ORMOND, D., PAI, G., PEACOCK, C.S., PETERSON, J., QUAIL, M.A., RABBINOWITSCH, E., RAJANDREAM, M.A., REITTER, C., SALZBERG, S.L., SANDERS, M., SCHOBEL, S., SHARP, S., SIMMONDS, M., SIMPSON, A.J., TALLON, L., TURNER, C.M., TAIT, A., TIVEY, A.R., VAN AKEN, S., WALKER, D., WANLESS, D., WANG, S., WHITE, B., WHITE, O., WHITEHEAD, S., WOODWARD, J., WORTMAN, J., ADAMS, M.D., EMBLEY, T.M., GULL, K., ULLU, E., BARRY, J.D., FAIRLAMB, A.H., OPPERDOES, F., BARRELL, B.G., DONELSON, J.E., HALL, N., FRASER, C.M., MELVILLE, S.E., EL-SAYED, N.M. **The genome of the African trypanosome Trypanosoma brucei.** Science. V. 15;309 (5733), p 416-2, 2005.

BOGITSH, B.J., RIBEIRO-RODRIGUES, R., CARTER, C.E. **In vitro effects of mannan and cytochalasin B on the uptake of horseradish peroxidase and [14C]sucrose by Trypanosoma cruzi epimastigotes.** Journal of Parasitology 81, 144–148, 1995.

BRADFORD, M.M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Anal Biochem. 1976.

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

Centers for Disease Control and Prevention. (2014). Nutrition. Acesso em <http://www.cdc.gov/nutrition/>.

CEVALLOS, A.M., LOPEZ-VILLASEÑOR, I., ESPINOSA, N; HERRERA, J., HERNANDEZ, R. ***Trypanosoma cruzi*: allelic comparisons of the actin genes and analysis of their transcripts.** Experimental Parasitology. v. 103, p 27-34, 2003.

CEVALLOS, A.M., SEGURA-KATO, Y.X., MERCHANT-LARIOS H., MANNING-CELA R., ALBERTO HERNÁNDEZ-OSORIO L., MÁRQUEZ-DUEÑAS C., AMBROSIO J.R., REYNOSO-DUCOING O.,HERNÁNDEZ R. ***Trypanosoma cruzi*: multiple actin isoforms are observed along different developmental stages.** Experimental Parasitology. v. 127, p 249-59, 2011.

CONTRERAS, V.T., SALLES, J.M., THOMAS, N., MOREL, C.M., GOLDENBERG, S., **In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions.** Mol Biochem Parasitol. v. 13, p 315-327, 1985.

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

CORRÊA, J.R., ATELLA, G.C., BATISTA, M.M., SOARES, M. **Transferrin uptake in *Trypanosoma cruzi* is impaired by interference on cytotome-associated cytoskeleton elements and stability of membrane cholesterol, but not by obstruction of clathrin-dependent endocytosis.** Exp Parasitol 119: 58-66, 2008.

CORRÊA, J.R., ATELLA, G.C., MENNA-BARRETO, R.S., SOARES, M. **Clathrin in *Trypanosoma cruzi*: in silico gene identification, isolation and localization of protein expression sites.** J Euk Microbiol 54: 297-302, 2007.

DE ARRUDA, M., MATSUDAIRA, V., MATSUDAIRA, P. **Cloning and sequencing of the *Leishmania major* actin-encoding gene.** Gene;139:123–5. 1994.

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

DE SOUZA, W., MEZA, I., MARTINEZ-PALOMO, A., SABANERO, M., SOUTO-PADRÓN, T., MEIRELLES, M.N., **Trypanosoma cruzi: distribution of fluorescently labeled tubulin and actin in epimastigotes.** Journal of Parasitology. v. 69, p 138-42, 1983.

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

EGELMAN, E.H.. **The structure of F-actin.** Molecular Biology, 151, 129–151, 1985.

ELIAS, M.C., CUNHA, J.P.C, FARIA, F.P., MORTARA, R.A, ILER, E.F., SCHENKMAN, S., **Morphological events during the trypanosoma cruzi cell cycle.** Protist. v. 158, p 147-157, 2007.

GALLETTA, B. J., & COOPER, J. A. **Actin and endocytosis: mechanisms and phylogeny.** Current Opinion in Cell Biology, 21(1), 20–27, 2009.

GERHOLD, C. B., WINKLER, D. D., LAKOMEK, K., SEIFERT, F. U., FENN, S., KESSLER, B., HOPFNER, K. **Structure of Actin-related protein 8 and its contribution to nucleosome binding.** Nuclei Acids Research, 40(21), 11036–11046, 2012.

GRISARD, E.C., TEIXEIRA, S.M., DE ALMEIDA, L.G., STOCO, P.H., GERBER, A.L., TALAVERA-LÓPEZ, C., LIMA, O.C., ANDERSSON, B., DE VASCONCELOS, A.T. **Trypanosoma cruzi Clone Dm28c Draft Genome Sequence.** Genome Announc. 2014.

GUZMAN-BRACHO, C. **Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update.** Trends in Parasitology. v.17, p. 372-376, 2001.

HERMAN, I.M. **Actin isoforms.** Curr Opin Cell Biol, 1993.

HILD, G., BUGYI, B., NYITRAI, M. **Conformational dynamics of actin: Effectors and implications for biological function.** Cytoskeleton 67(10). 2010. Phys. Rev. Lett. 98. 2007.

HOLLINGSWORTH, T. D., ADAMS, E. R., ANDERSON, R. M., ATKINS, K., BARTSCH, S., BASÁÑEZ, M., CONSORTIUM, N. T. D. M. **Quantitative analyses and modelling to support achievement of the 2020 goals for nine neglected tropical diseases.** Parasites & Vectors, 2015.

IKAWA, T., HOSHINO, F., WATANABE, O., LI, Y., PINCUS, P., SAFINYA, C.R. **Molecular Scale Imaging of F-Actin Assemblies Immobilized on a Photopolymer Surface.**

IVENS, A.C., PEACOCK, C.S., WORTHEY, E.A., MURPHY, L., AGGARWAL, G., BERRIMAN, M., SISK, E., RAJANDREAM, M.A., ADLEM, E., AERT, R., ET AL. **The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*.** Science 309:436-442, 2005.

KABSCH, W., MANNHERZ, H. G., SUCK, D., PAI, E. F., & HOLMES, K. C. **Atomic structure of the actin: DNase I complex.** Nature, 347(6288), 37–44, 1990.

KAPOOR, P., KUMAR, A., NAIK, R., GANGULI, M., SIDDIQI, M.I., SAHASRABUDDHE, A.A., GUPTA, C.M. ***Leishmania actin binds and nicks kDNA as well as inhibits decatenation activity of type II topoisomerase.*** Nucleic Acids Res. 38, 3308– 3317, 2010.

KELLEY, L.A. et al. **The Pyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis.** Nature Protocols 10, 845-858, 2015.

KOHL, L. & GULL, K., **Molecular architecture of the trypanosome cytoskeleton.** Molecular and Biochemical Parasitology. v. 93, p. 1–9, 1998.

LAEMMLI, U. K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature 227(5259): 680-685. 1970.

LEE, B.Y., BACON, K.M., CONNOR, D.L., WILLIG, A.M., BAILEY, R.R. **The potential economic value of a *Trypanosoma cruzi* (Chagas Disease) vaccine in Latin America.** PLoS Negl Trop Dis;4(12):e916, 2010.

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

MORTARA, R.A. **Studies on Trypanosomatid Actin I. Immunochemical and Biochemical Identification.** Journal of Protozoology. v. 36, p 8-13, 1989.

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

PORTO-CARREIRO, I., ATTIAS, M., MIRANDA, K., DE SOUZA, W., & CUNHA-E-SILVA, N. ***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, 79(11), 858–869, 2010.

RASSI, J.R.A., RASSI, A., MARIN-NETO, J.A. **Chagas disease.** Lancet. 375:1388–402., 2010.

SIMPSON, A.G., STEVENS, J.R., LUKES, J., **The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates.** Trends in Parasitology. v. 22, p 168-174, 2006.

SAHASRABUDDHE, A. A., BAJPAI, V. K. AND GUPTA, C. M. **A novel form of actin in Leishmania: molecular characterisation, subcellular localisation and association with subpellicular microtubules.** Molecular and Biochemical Parasitology 134, 105–114, 2004.

SAHASRABUDDHE, A. A, GUPTA, C. M., THIYAGARAJAN, S. **Unconventional actins and actin-binding proteins in human protozoan parasites.** International Journal for Parasitology, 45(7), 435–447, 2015.

SANT'ANNA, C., NAKAYASU, E. S., PEREIRA, M. G., LOURENÇO, D., DE SOUZA, W., ALMEIDA, I. C., & CUNHA-E-SILVA, N. L. **Subcellular proteomics of Trypanosoma cruzi reservosomes.** Proteomics, 9(7), 1782–1794, 2009

SHERWIN, T. & GULL, K. **The cell cycle division of Trypanosoma brucei brucei: timing of event markers and cytoskeletal modulations.** Phil Trans R Soc London; B323:573–88, 1989.

SOUTO-PADRÓN, T., DE SOUZA, W., & HEUSER, J. E. **Quick-freeze, deep-etch rotary replication of Trypanosoma cruzi and Herpetomonas megaseliae.** Journal of Cell Science, 69, 167–178., 1984.

SOUZA, L.C.K., ELISA, R., GONÇALVES, G., VANESSA, C., LIMA, D. P., SOARES, M. J. **Actin expression in trypanosomatids (Euglenozoa : Kinetoplastea),** 108(June), 1–6, 2013.

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

TOWBIN, H., STAEGELIN, T., GORDON, J. **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.** Proc Natl Acad Sci U S A, 1979.

TEIXEIRA, D.E., BENCHIMOL, M., CREPALDI, P.H., DE SOUZA, W. **Atlas didático: Ciclo de vida do Trypanosoma cruzi.** Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ, 1ª edição, 2011.

TEIXEIRA, S.M., PAIVA, R.M.C, KANGUSSU-MARCOLINO, M.M., DAROCHA, W.D. **Trypanosomatid comparative genomics: Contributions to the study**

of parasite biology and different parasitic diseases. Genetics and Molecular Biology. v. 35, p.1-17, 2012.

VATARUNAKAMURA, C., UEDA-NAKAMURA, T., & SOUZA, W. **Visualization of the cytostome in Trypanosoma cruzi by high resolution field emission scanning electron microscopy using secondary and backscattered electron imaging.** FEMS Microbiology Letters, 242(2), 227–230, 2005.