

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BEATRIZ SANTANA BORGES

IMUNOLOCALIZAÇÃO DA ACTINA 1 FUSIONADA A ETIQUETA HA EM FORMAS
EPIMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi*

CURITIBA

2013

BEATRIZ SANTANA BORGES

IMUNOLOCALIZAÇÃO DA ACTINA 1 FUSIONADA A ETIQUETA HA EM FORMAS
EPIMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi*

Trabalho apresentado como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Processos Celulares no curso de graduação em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dra. Célia Regina Cavichiolo Franco

Co-orientadora: Dra. Lia Carolina Soares Medeiros

CURITIBA

2013

*Aos meus pais, por serem meus
exemplos de pessoas, profissionais e
por sempre me apoiarem.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Eudes e Ana Paula, por desde criança me estimularem aos estudos e me apoiarem em todas as decisões. Por serem meus exemplos de pessoas e profissionais maravilhosos, que espero ser ao menos metade do que são hoje. Ao Ale e a Patrícia, por também desempenharem este papel em minha vida.

A minha orientadora, Lia, que em tão pouco tempo me acolheu com tamanha boa vontade, sempre esteve muito disponível para todas as minhas incessantes dúvidas e diante de muitas dificuldades, nunca estremeceu seu apoio e por acreditar na minha capacidade de realizar esse trabalho.

Ao Dr. Stênio, que esteve sempre disponível para minhas dúvidas e impasses quanto ao projeto e por todo o tempo que dedicou a isso.

Ao Dr. Maurílio e meus colegas de laboratório que me aceitaram e me acolheram, fazendo o ambiente de laboratório ser um ótimo local de trabalho.

A Dra. Célia e meus antigos colegas de laboratório e professores, que foram peças fundamentais para o início dessa caminhada.

Ao Bruno (menino), que além de todas as horas de discussão sobre a ciência, também fez com que este momento ficasse muito mais leve e mais feliz.

Aos meus amigos Gustavo, Je, Raquel, Diogo, Helisa, Lai, Marcela, Mariana e Fe, que foram meus ombros nos grandes momentos de crise.

A todos do ICC e da UFPR que sempre estiveram muito dispostos e solícitos em qualquer momento de necessidade.

RESUMO

Trypanosoma cruzi é o agente etiológico da doença de Chagas, responsável pela infecção de milhões de pessoas no mundo, principalmente na América Latina. Uma vez que esse parasita se desenvolve através de um ciclo de vida complexo envolvendo o trato digestivo de insetos vetores e o interior das células hospedeiras de mamíferos, está sujeito a estresses ambientais que exigem drásticas mudanças morfológicas e fisiológicas. No entanto, algumas proteínas classicamente relacionadas ao citoesqueleto, tais como a actina, permanecem ainda pouco investigadas em *T. cruzi*. Aspectos únicos na organização genômica deste protozoário parecem dificultar a completa caracterização da actina e diversas outras proteínas. A actina é a proteína mais abundante na maioria das células e desempenha um papel essencial na estrutura e dinâmica celular, participando de processos como mobilidade e manutenção da forma. Dentro deste contexto, o presente estudo visa identificar os genes que codificam a proteína actina 1 no genoma do *T. cruzi* e produzir parasitas geneticamente modificados expressando a actina recombinante fusionada a uma etiqueta para posterior imunolocalização. Para isso, foi realizada uma análise *in silico* das sequências das actinas encontradas nos bancos de dados disponíveis para consulta. Genes que codificam cinco isoformas de actina foram identificados. As análises mostraram que a actina 1 quando comparada as actinas de outros organismos possui mais de 50% de homologia, se mostrando uma proteína altamente conservada, inclusive em *T. cruzi*. A sequência da actina 1 foi então inserida em um cassete contendo uma etiqueta conhecida para imunolocalização no parasita. Após a transfecção e seleção dos parasitas, os mesmos foram observados pelo método de imunofluorescência indireta. Os resultados obtidos mostraram que a actina 1 encontra-se predominantemente na região posterior do parasita, diferindo do que foi observado em estudos anteriores utilizando soro policlonal, que descreveram um padrão de marcação disperso pelo corpo do parasita. Juntos, os resultados deste trabalho mostraram que a combinação de métodos clássicos e modernos de clonagem para a obtenção de parasitas expressando proteínas fusionadas à etiquetas comerciais permite uma avaliação mais específica da localização de diferentes isoformas de uma mesma proteína em *T. cruzi*. Este trabalho abre um leque de possibilidades no estudo da localização e do papel de cada uma das isoformas da actina em *T. cruzi*.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. Actina. Organismos geneticamente modificados.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is the etiologic agent of Chagas disease, responsible for the infection of millions of people worldwide, especially in Latin America. Since this parasite develops via a complex life cycle involving the digestive tract of the insect vectors and inside mammalian host cells, it is subject to environmental stresses that requires drastic morphological and physiological changes. However, some proteins classically related to cytoskeletal, such as actin, are poorly investigated in *T. cruzi*. Unique aspects of the genome organization of this protozoan seem to hinder full characterization of actin and several other proteins. Actin is the most abundant protein in most cells and plays an essential role in cell structure and dynamics, participating in processes such as mobility and shape retention. In this context, this study aims to identify the genes encoding the protein actin 1 in the genome of *T. cruzi* parasites and produce genetically modified recombinant actin fused to a label for subsequent immunolocalization. For this, an *in silico* analysis of the sequences of actin found in the databases available for consultation was held. Genes encoding five isoforms of actin have been identified. The analysis showed that the actin 1 compared with the actin of other organisms has more than 50 % of homology, showing a protein highly conserved, including in *T. cruzi*. The sequence of the actin 1 was inserted into a cassette containing a known tag for immunolocalization in the parasite. After transfection and selection of parasites, they were observed by the method of indirect immunofluorescence. The results showed that the actin 1 is found predominantly in the posterior region of the parasite, unlike what was observed in previous studies using polyclonal serum, which described a marking with scattered pattern by the body of the parasite. Together, the results of this study showed that the combination of classical and modern methods of cloning to obtain parasites expressing proteins fused to the commercial labels allows a more specific evaluation of the location of the different isoforms of the same protein in *T. cruzi*. This work opens up a range of possibilities to study the localization and role of each of the isoforms of actin in *T. cruzi*.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Actin. Genetically modified organisms.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> E A DOENÇA DE CHAGAS.....	9
1.2 ACTINA EM <i>T. cruzi</i>	12
2. OBJETIVO	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> E SELEÇÃO DO GENE DA ACTINA 1	16
3.2 CULTIVO DE <i>T. cruzi</i>	16
3.3 OBTENÇÃO DE PARASITAS EXPRESSANDO CONSTITUTIVAMENTE ACTINA 1 RECOMBINANTE FUSIONADA A UMA ETIQUETA HA	17
3.3.1 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>)	17
3.3.2 Amplificação e clonagem do gene da actina 1 pela plataforma <i>Gateway</i> ®18	
3.3.3 Purificação por fenol/clorofórmio	18
3.3.4 Montagem do vetor de entrada (pDONR™221)	19
3.3.5 Transformação de bactérias	19
3.3.6 Minipreparação de plasmídeos.....	20
3.3.7 Montagem do vetor de expressão (pDEST™17)	21
3.3.8 Amplificação e clonagem da região a jusante (<i>downstream</i>).....	21
3.3.9 Amplificação, digestão e purificação do cassete “ACT1/ HA/HIGRO/DOWNSTREAM” para transfecção em <i>T. cruzi</i>	22
3.3.10 Transfecção das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	23
3.4 IMUNOLOCALIZAÇÃO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1 ANÁLISE <i>IN SILICO</i>	25
4.2 OBTENÇÃO DE PARASITAS RECOMBINANTES.....	29
5. CONCLUSÕES	39
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Trypanosoma cruzi* E A DOENÇA DE CHAGAS

Tripanossomatídeos são protozoários flagelados que pertencem à família Trypanosomatidae (ordem Kinetoplastida). 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 Kinetoplastida 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).

Trypanosoma cruzi é o agente causador da doença de Chagas (ou tripanossomíase americana), uma doença que afeta 5 milhões de pessoas no mundo, principalmente na América Latina. A partir de uma perspectiva mundial, a doença de Chagas 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).

Os triatomíneos dos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* são os vetores mais comuns desta doença, e são mais popularmente conhecidos como “barbeiro”. A contaminação do barbeiro (Figura 1, etapa 1), ocorre quando este pica um mamífero infectado e ingere formas tripomastigotas sanguíneas (etapa 2) que são conduzidas à porção anterior do estômago, onde se diferenciam em epimastigotas e algumas formas esferomastigotas (etapa 3). As formas epimastigotas sobreviventes, quando alcançam o intestino, começam a se multiplicar sucessivamente por divisão binária (etapa 4). Posteriormente, os epimastigotas se soltam e movem-se para o intestino posterior,

onde iniciam o processo de diferenciação em tripomastigotas metacíclicos (etapa 5). A contaminação de um hospedeiro vertebrado ocorre quando o barbeiro infectado pica o mamífero. Neste processo, o inseto geralmente defeca e urina (etapa 6), depositando, assim, sobre a pele ou mucosa do mamífero a forma tripomastigota metacíclica (etapa 7). A invasão do parasito ocorre quando o hospedeiro se coça, fazendo com que o parasita consiga alcançar os vasos sanguíneos do hospedeiro, invadindo uma gama de células nucleadas como, por exemplo, macrófagos (etapa 8), células musculares e epiteliais. Inicialmente, a forma tripomastigota é fagocitada pelo macrófago, seguindo-se a formação do vacúolo parasitóforo (etapa 9) do qual ele escapa e se diferencia em formas amastigotas (etapa 10). No citoplasma, esta forma se multiplica por fissões binárias sucessivas (etapa 11). Após isso, os amastigotas iniciam sua diferenciação para a forma tripomastigota (etapa 12) rompendo a célula hospedeira (etapa 13). No meio extracelular (etapa 14), os tripomastigotas (etapa 15a) e amastigotas (etapa 15b) podem infectar novas células que ali estejam presentes. O parasita pode ainda infectar o homem por outras vias, como transfusão sanguínea e transplante de órgãos (atualmente quase eliminados no Brasil), durante a gravidez e até mesmo pela ingestão do inseto acidentalmente triturado junto a alimentos (contaminação por via oral) (revisado por YOSHIDA, 2008).

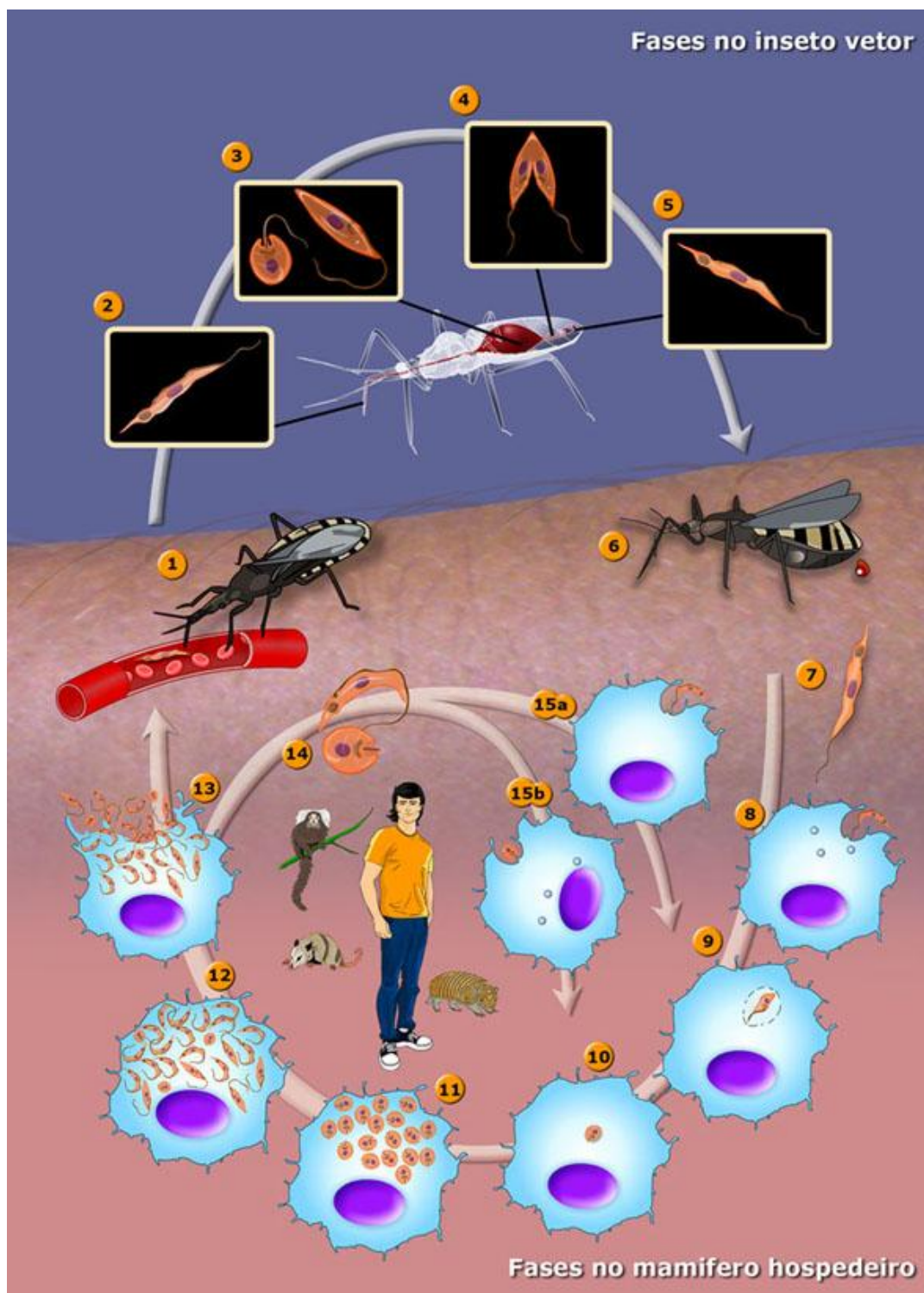


FIGURA 1. Ciclo de vida do *T. cruzi*. Fonte: Atlas Didático - O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* (TEIXEIRA, 2011)

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 ACTINA EM *T. cruzi*

T. cruzi, bem como outros tripanosomatídeos, possui um citoesqueleto com composição bastante peculiar em comparação com outros modelos de células eucarióticas. É um citoesqueleto atípico, com estrutura baseada em microtúbulos (polímeros formados pela proteína tubulina). Por microscopia eletrônica de transmissão foi possível observar a presença destes microtúbulos sub-peliculares distribuídos por todo o corpo celular, com uma distância constante um do outro (aproximadamente 44 nm) e da membrana plasmática (cerca de 12 nm). Em contrapartida, outras proteínas relacionadas ao citoesqueleto, tais como microfilamentos (ou filamentos de actina) e filamentos intermediários permanecem pouco investigadas em *T. cruzi* (SOUZA, 2009).

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 eucarióticas e, como tal, poderia ser assumido que desempenha um papel central semelhante em tripanosomatídeos. Embora a caracterização da actina nos tripanosomatídeos seja bastante completa, especificamente em *T. cruzi*, esta caracterização ainda é relativamente inconclusiva. Em *T. brucei*, por exemplo, constatou-se que a actina não participa no processo da locomoção, como aconteceria na maioria das células eucarióticas, já que esta é desenvolvida exclusivamente por microtúbulos (BERRIMAN, 2005). Em contrapartida, nada se sabe sobre a função da actina no processo de locomoção em *T. cruzi*.

Sabe-se que a actina de *T. cruzi* tem uma estrutura semelhante à encontrada em eucariotos superiores (SOUZA, 2009). No entanto, os genes que codificam a actina foram mais bem caracterizados em *T. brucei* e *L. major*. Por imunofluorescência, um padrão de distribuição difusa foi detectada no corpo celular de *T. brucei* e *T. cruzi*. (KOHL & GULL, 1998). Ainda assim, filamentos de actina propriamente ditos nunca foram observados por microscopia eletrônica em nenhum tripanossomatídeo.

A presença de 4 genes que codificam actina e diversos outros genes que codificam proteínas relacionadas a actina ou proteínas do tipo actina no genoma de *T. cruzi* já foram descritas (CEVALLOS *et al.*, 2003, 2011). Um destes genes, identificados pelos autores como codificando a “Actina 1”, possui pelo menos duas cópias, e apresenta um pico na quantidade de mRNA no período que precede a fase estacionária de crescimento de formas epimastigotas (CEVALLOS *et al.*, 2003). Também foram observadas diferenças no padrão de expressão da “actina 1” nos diferentes estágios de desenvolvimento do parasita, através de imunolocalização utilizando soro policlonal obtido a partir da imunização de camundongos com a sequência completa da “actina 1” de *T. cruzi*. A presença de actina nas várias formas de *T. cruzi* já havia sido demonstrada por outros autores através de ensaios de imunofluorescência, utilizando tanto anticorpos heterólogos (DE SOUZA *et al.*, 1983; MORTARA 1989) quanto anticorpos produzidos contra a sequência da actina de *T. cruzi* (DE MELO *et al.*, 2008).

Considerando a prévia utilização de ferramentas de localização pouco específicas como, por exemplo, soro policlonal produzido a partir da sequência completa da proteína, e a existência de diferentes genes codificando a proteína actina em *T. cruzi*, cujas sequências apresentam similaridade variando entre 70 e 50%, é possível que o padrão de distribuição da “actina 1” em *T. cruzi* seja, na verdade, resultado de reações cruzadas com as outras actinas, não sendo possível até o momento, determinar exatamente qual a localização e possível função específica de cada uma destas actinas em *T. cruzi*.

Assim, torna-se necessário o desenvolvimento e aplicação de novas metodologias que possibilitem a identificação específica de cada uma destas actinas,

para melhor compreender o papel das mesmas na biologia do *T. cruzi*. Dentro deste contexto, este projeto visou a aplicação de diferentes ferramentas de biologia molecular, incluindo tanto a clonagem clássica quanto a plataforma Gateway®, para a obtenção de parasitas recombinantes expressando a actina fusionada a uma etiqueta para posterior imunolocalização.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar os genes que codificam a proteína actina 1 no genoma do *T. cruzi* e produzir parasitas geneticamente modificados expressando a actina recombinante fusionada a uma etiqueta para posterior imunolocalização.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Procurar genes que codificam a proteína actina 1 no genoma do *T. cruzi* através de pesquisa em bancos de dados e analisa-las e compará-las com outras sequencias 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 1 fusionada a uma etiqueta e um gene de resistência a Higromicina contendo a região a jusante do gene para recombinação homóloga
- Determinar a localização sub-celular da actina 1 em formas epimastigotas de *T. cruzi* transfectado com o cassete de interesse, através de imunolocalização indireta com anticorpos específicos contra a etiqueta HA, presente no cassete transfectado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANÁLISE *IN SILICO* E SELEÇÃO DO GENE DA ACTINA 1

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), Clustal Omega (no site do Instituto Europeu de Bioinformática) (LARKIN et al., 2007), DNASTAR e MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). A validação das sequências como sendo sequências que pertencem à família das actinas foi realizada utilizando o banco de dados de domínios conservados do “The Nation Center for Biotechnology Information” (MARCHLER-BAUER et al., 2009). A inferência filogenética dos grupos de sequências de aminoácidos foi realizada usando os mesmos softwares descritos acima.

3.2 CULTIVO DE *T. cruzi*

Os clones de *T. cruzi* utilizados foram provenientes da clone Dm28c (CONTRERAS et al., 1985, CONTRERAS et al., 1988). Neste trabalho foram utilizadas as formas epimastigotas de *T. cruzi*, cultivadas em meio LIT (CAMARGO, 1964) a 28 °C com passagens a cada três dias e inóculo de 1×10^6 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 1×10^7 células/mL.

3.3 OBTENÇÃO DE PARASITAS EXPRESSANDO CONSTITUTIVAMENTE ACTINA 1 RECOMBINANTE FUSIONADA A UMA ETIQUETA HA

3.3.1 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*)

Para o desenho dos *primers* foi utilizada apenas a porção final da sequência da actina 1 (114 pb), já que, para realizar a recombinação homóloga no parasita não é necessário utilizar toda a sequência. Isso se dá pelo fato de que esse tipo de recombinação 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 HA). Porém, para que essa recombinação seja possível, é necessária que haja uma sequência codificadora *a jusante* do gene (*downstream*). A clonagem dessa porção da sequência da actina 1 foi realizada pela plataforma Gateway® (Tabela 1).

A clonagem da região *downstream* foi realizada via clonagem clássica, já que a plataforma Gateway® permite apenas a clonagem de uma sequência no vetor de entrada. Então, pelo programa NEBcutter® foi feita uma busca por sítios de clivagem de enzimas de restrição da região *downstream* e assim, foram adicionados aos oligonucleotídeos iniciadores as sequências de clivagem para *Bgl*II e *Hind*III. As sequências para estas enzimas também foram adicionadas previamente no pDEST utilizado na plataforma Gateway®, gentilmente cedido pelo Dr. Stênio Perdigão Fragoço (ICC – Instituto Carlos Chagas).

ACT 1 GW F'	5'- GGGACAAGTTTGTACAA AAAAGCAGGCTTCGATGACGTTCACTAC GTCTGCCGAG – 3'
ACT 1 GW R'	5'- GGGACCACTTTGTACAA GAAAGCTGGGTCAAAGCATTGTGTTGTG CACAATGCTTGGGCC -3'
ACT 1 <i>Bgl</i> II F'	5'- GCTTTTAGTA AGATCT GCATAAAGGTGAATAGTTTTCTATCACCGGA-3'
ACT 1 <i>Hind</i> III R'	5'- GCCAACAAA AAGCTT CCTTGCTGGCGCTTCCCATCATCG -3'
INT 2 F'	5'- GGAACTCGAGGGGTCAAGAAGTGAATATTAG -3'

Tabela 1. Esquema dos oligonucleotídeos iniciadores. Em vermelho as sequências necessárias para utilizar o vetor da plataforma Gateway®. Em verde, os sítios de clivagem para as enzimas de restrição específicas.

3.3.2 Amplificação e clonagem do gene da actina 1 pela plataforma Gateway®

A clonagem do gene da actina 1 (Tc00.1047053510571.30) no vetor HIGROMICINA-HA (HH) foi realizada utilizando a plataforma Gateway®. Para a obtenção do inserto foi feita amplificação por PCR de uma ORF de 1131pb da actina 1 com os primers *forward* ACT 1 GW F': 5' – GGGGACA AGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGATGACGTTCACTACG TCTGCCGAG -3' e *reverse* ACT 1 GW R' : 5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAAA GCATTTGTTGTGCACAATGCTTGGGCC -3'. A solução de PCR foi preparada com os seguintes reagentes: 0,2 µL de Platinum Taq DNA polimerase de alta fidelidade (Invitrogen®), 1 µL de cada primer (*forward* e *reverse*), 1 µL de DNA (100 µg/mL) genômico de *T. cruzi* (formas epimastigotas de 3 dias, cultivadas conforme descrito no item 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 ultra pura para 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 68 °C por 50 segundos para a etapa da extensão. Essas três etapas foram repetidas 35 vezes. Após esses ciclos, foi adicionada uma etapa de 7 minutos a 68 °C para finalizar a extensão das fitas.

3.3.3 Purificação por fenol/clorofórmio

O produto da amplificação pela reação de PCR foi purificado pelo método do fenol/clorofórmio. Para isso, foi adicionado na solução a ser purificada, a mesma proporção de fenol/clorofórmio (Fenol saturado 24 partes, colorofórmio 24 partes, álcool isoamílico 1 parte, Tris-HCL 100 mM, pH 8,0, 10 partes). A solução foi centrifugada a 13.000 rpm por 2 minutos em temperatura ambiente. Após a centrifugação, formaram-se duas fases na solução, das quais apenas a fase superior foi pipetada para um novo tubo, onde foi adicionado Acetato de sódio, pH 6,0, numa concentração final de 0,3 M.

Foram adicionadas 3 partes de etanol 100% e colocados em gelo seco por 20 minutos. A solução foi centrifugada a 14.000 rpm por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspense em 1 mL de etanol 70% e a solução foi novamente centrifugada a 14.000 rpm 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 ultra pura.

3.3.4 Montagem do vetor de entrada (pDONRTM221)

O produto da purificação (sequências da actina 1) foi utilizado para gerar um vetor. A inserção desse produto no vetor pDONRTM221, denominada reação de BP, foi realizada da seguinte forma: 1 µL (150 ng) do inserto (sequência amplificada da actina 1), 1,5 µL do pDONRTM221, 1 µL da enzima BP *ClonaseTM 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.

3.3.5 Transformação de bactérias

Após a realização da reação para inserção da sequência no vetor de entrada, foram adicionados 50 µL de solução de bactérias da cepa 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 °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 °C. Em placas de Petri com meio de cultura seletivo (LB - Luria-Bertani, agar 15% e canamicina), foram plaqueados 100 µL da solução de bactérias e colocadas em estufa a 37 °C, durante a noite.

Nas placas de Petri, cresceram colônias de bactérias que deveriam conter o plasmídeo clonado. Para confirmar, amostras dessas colônias foram analisadas por

eletroforese em gel de agarose 1%, usando o plasmídeo original como controle de tamanho. A corrida foi feita em gel de agarose 1% em tampão TBE (Tris-Borato 89 mM, EDTA 2 mM), 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 em luz ultravioleta. O gel foi fotografado no sistema de foto-documentação UVP (Bio-rad®).

3.3.6 Minipreparação de plasmídeos

As colônias positivas foram expandidas em 5 mL de meio LB líquido com 10% de canamicina em agitador de 200 rpm por 16 horas. Após esse tempo, foram purificadas pelo método da lise alcalina usando o kit de minipreparação de plasmídeos (Qiagen®). Em tubos de 1,5 mL, foi adicionado o meio inoculado com as bactérias competentes e centrifugado por 2 minutos a 11.000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e mais meio inoculado foi adicionado e novamente centrifugado. Este processo foi repetido até que todo o meio tivesse sido centrifugado. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” ressuspense em 250 µL de tampão P1. Foram adicionados 250 µL de tampão P2, e os tubos foram vertidos para misturar a solução. Foram adicionados 350 µL de tampão N3 e novamente os tubos foram homogeneizados. A solução foi centrifugada a 13.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para a coluna do Kit. A coluna foi centrifugada por 1 minuto a 13.000 rpm e foi descartado o que passou para o tubo. Tampão PB (500 µL) foi adicionado na coluna que foi novamente centrifugada. O que passou para o tubo foi descartado e 750 µL de tampão PE foram adicionados, e novamente centrifugado. A coluna foi transferida para um novo tubo, onde 50 µL do tampão de lise EB foi adicionado e centrifugado novamente por 1 minuto. A solução que restou no tubo foi a de minipreparação dos plasmídeos de interesse.

3.3.7 Montagem do vetor de expressão (pDESTTM17)

Após a obtenção da minipreparação das colônias contendo o vetor de entrada, a sequência de interesse foi transferida para um vetor de expressão, chamado pDEST17 (Gateway®), já contendo os sítios de resistência ao antibiótico de seleção (higromicina) e a etiqueta HA (aqui chamado HH). Para esta reação de transferência, chamada de reação LR, foi feita a seguinte solução: 1 µL (150 ng) do pDONRTM221 da minipreparação contendo o pDONR com a sequência da actina 1, 1,5 µL do pDESTTM17 HH, 1 µL 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 pDESTTM17 HH, para a realização da minipreparação de plasmídeos (item 3.3.6).

3.3.8 Amplificação e clonagem da região a jusante (*downstream*)

Após a obtenção do vetor de entrada, também foi clonada junto à este cassete uma região *a jusante* (ou *downstream*) do gene da actina 1, a fim de produzir uma recombinação homóloga do gene no parasita recombinante. Para isso, foram utilizados os primers, *forward* ACT 1 *Bgl*II F' (com sítio para enzima de restrição *Bgl*II): 5' – GCTTTTAGTAAGATCTGCATAAAGGTGAATAGTTTCCTATCACCGGA-3' e *reverse* ACT 1 *Hind*III R' (com sítio para enzima de restrição *Hind*III): 5' – GCCAACAAAAAGCTTCTTGCTGGCGCTTCCCATCATCG -3'. Após essa 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 HH com a sequência da actina 1) foram digeridos com a enzima de restrição *Bgl*II (Neb®), em solução contendo o tampão 3 (Neb®, NaCl 100mM, Tris-HCl 50mM, MgCl₂ 10mM, DTT 1mM, pH 7), por 16 horas em estufa a 37 °C. Após a verificação da digestão, por eletroforese em gel de

agarose 1%, a reação foi purificada por fenol/clorofórmio. Insetos e vetores foram então digeridos com a enzima de restrição *HindIII* (Neb®) em tampão 2 (Neb®, Na Cl 50mM, Tris HCl 10mM, MgCl₂ 10mM, DTT 1mM, pH 7), em estufa a 37 °C por 16 horas.

As reações de digestão dos vetores e dos insetos 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 HH). A solução foi feita da seguinte maneira: 1 µL do vetor, 1 µL do inserto (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, *overnight*.

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, utilizando os primers R' (*HindIII*) e INT2 F' de *T. cruzi*. O *primer* INT2 flanqueia a região intergênica 2 do genoma de *T. cruzi*, o que permite verificar se o cassete está corretamente montado.

3.3.9 Amplificação, digestão e purificação do cassete "ACT1/HA/HIGRO/DOWNSTREAM" para transfecção em *T. cruzi*

Os clones contendo plasmídeos recombinantes (previamente selecionados mediante PCR de colônia) 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: 31 µL (20 µg) de mini-preparação, 3 µL da enzima *XbaI* (Promega ®), 3 µL da enzima *HindIII* (Biolabs ®), 5 µL de tampão 2 (Biolabs®) 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 1%), a solução foi purificada por fenol/clorofórmio e quantificada em nanodrop.

3.3.10 Transfecção das formas epimastigotas de *T. cruzi*

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) até a densidade de $1,8 \times 10^7$ células/mL. Os parasitas foram coletados por centrifugação a $6.000 \times g$ por 10 minutos a 4°C . O sedimento celular foi lavado com PBS estéril e ressuspenso (4×10^8 células) em 1 mL de solução de eletroporação. Foram transferidos 0,4 mL da suspensão de células 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 1, a etiqueta HA, a região de resistência a higromicina e a região *downstream* do gene). Foi utilizada uma cubeta contendo apenas a suspensão de parasitas para o controle e posterior seleção dos parasitas transfectados.

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 higromicina na concentração de 500 µg/mL. As culturas foram mantidas por sucessivas passagens (diluição de 1:10) em meio LIT suplementado com higromicina a cada 8-10 dias, até a ausência de proliferação celular na cultura controle (eletroporadas na ausência do cassete).

3.4 IMUNOLocalização POR IMUNOFLORESCÊNCIA

Para os ensaios de imunofluorescência, as formas epimastigotas de *T. cruzi* transfectadas expressando a actina 1 fusionada a uma etiqueta HA foram obtidas a partir de meio de cultura por centrifugação, e o volume foi ajustado para uma

concentração final de 5×10^6 células/mL. 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. Em seguida foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com o anticorpo comercial monoclonal anti-HA (Sigma®) diluído 1:5000 em solução de bloqueio (PBS pH 8,0 + BSA 1,5%). Posteriormente, as lamínulas foram lavadas com solução de bloqueio (PBS pH 8,0 + BSA 3%) por 3 vezes de 10 minutos cada, e incubadas por 30 minutos com o anticorpo secundário AlexaFluor 488 (Sigma®), diluído 1:600 em tampão de bloqueio (PBS pH 8,0 + BSA 1,5%). Após este tempo, as lamínulas foram lavadas com solução de bloqueio (PBS pH 8,0 + BSA 3%) 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 N-propil-galato sobre uma lâmina de microscopia ótica, para posterior análise em microscópio de epifluorescência com sistema de deconvolução.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE *IN SILICO*

A actina é uma proteína altamente conservada e encontrada em todas as células eucarióticas. Os monômeros de actina se oligomerizam em actina filamentososa (F-actina), que participa em muitos importantes processos celulares como mobilidade e transporte celular, contração muscular e na formação de microfilamentos que ajudam na estrutura e suporte das células (THOMASSON, DOHERTY, 2013, 2008).

Em *T. cruzi*, a actina foi previamente observada em estruturas citoplasmáticas, presentes em todos os estágios de desenvolvimento. Embora essa proteína tenha um 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. Supõe-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). Outra possível explicação para isso seria a diferença na atuação de proteínas acessórias para a polimerização e despolimerização dos filamentos (como as cofilinas e profilinas). Esses estudos também mostraram a caracterização de uma sequência de actina de 42 kDa, que se mostrou distribuída por todo o corpo do parasita, quando submetidas a imunofluorescência utilizando soro policlonal heterólogo (DE SOUZA, 1983; MORTARA, 1989).

Para a análise *in silico* foi utilizada a palavra “actin” na busca nos bancos de dados *TriTrypDB (Kinoplastid 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 5 sequências codificadoras da proteína, sendo que uma delas, de aproximadamente 42 kDa, Cevallos e colaboradores, em 2011, denominaram como actina 1, que é a única sequência estudada em *T. cruzi*.

O clone de *T. cruzi* usado como referência para a anotação do genoma deste parasita foi o CL-Brener. No entanto, o clone utilizado neste projeto foi o Dm28c (CONTRERAS et al., 1985, CONTRERAS et al., 1988). 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 da sequência da actina 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 duas sequências de 376 aminoácidos para “Actina” denominadas “actina 1” e “actina 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 estas sequências corresponderiam a sequências codificadoras de diferentes isoformas de actina ou se seriam apenas cópias de uma mesma proteína, foi feito o alinhamento destas duas sequências de aminoácidos (Figura 2 A). A partir deste alinhamento foi possível concluir que as duas sequências são idênticas, constituindo portanto, cópias de uma mesma proteína. Além disso, para determinar se esta sequência seria homóloga à sequência da “Actina 1” do clone CL-Brener (clone de referência), foi feito um alinhamento de uma das sequências do clone Dm28c com a sequência da “Actina 1” do clone de referência (Figura 2 B). A partir deste alinhamento, foi possível concluir que as sequências apresentam identidade de cerca de 99%, confirmando que a utilização das sequências do clone CL-Brener poderia não interferir nos resultados obtidos utilizando o clone Dm28c.

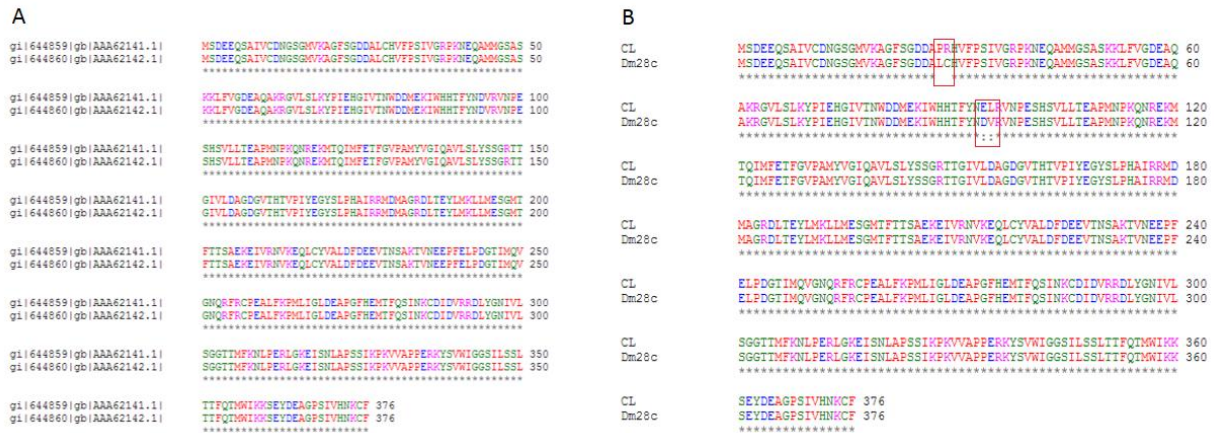


Figura 2. Alinhamento filogenético das actinas os diferentes clones de *T. cruzi*. A) Alinhamento das actinas 1 e 2 encontradas na anotação do clone Dm28c. B) Alinhamento das actinas 1 entre os clones CL-Brener e Dm28C. Destacado em vermelho os aminoácidos diferentes entre as sequências (4/376 aminoácidos, aproximadamente 1%). Alinhamento realizado através do programa Clustal Omega.

Através do programa Clustal Omega foi feito o alinhamento das sequências de aminoácidos das actinas de diferentes espécies (Figura 3) e das actinas de *T. cruzi* (Figura 4). Assim, foi possível plotar uma árvore filogenética com as sequências das 5 actinas encontradas nos bancos de dados.



Figura 3. Árvore filogenética das actinas de diferentes espécies. Filogenia realizada através do método *neighbour-joining*, pelo programa Clustal Omega. As distâncias entre as espécies foram de *T. brucei*: 0.03923, *T. cruzi*: 0.03258, *L. major*: 0.06151, *H. sapiens*: 0.03030, *M. musculus*: 0.03637 e *S. cerevisiae*: 0.05440.

Além da árvore filogenética, o alinhamento das actinas entre as diferentes espécies (Figura 4) está de acordo com 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.

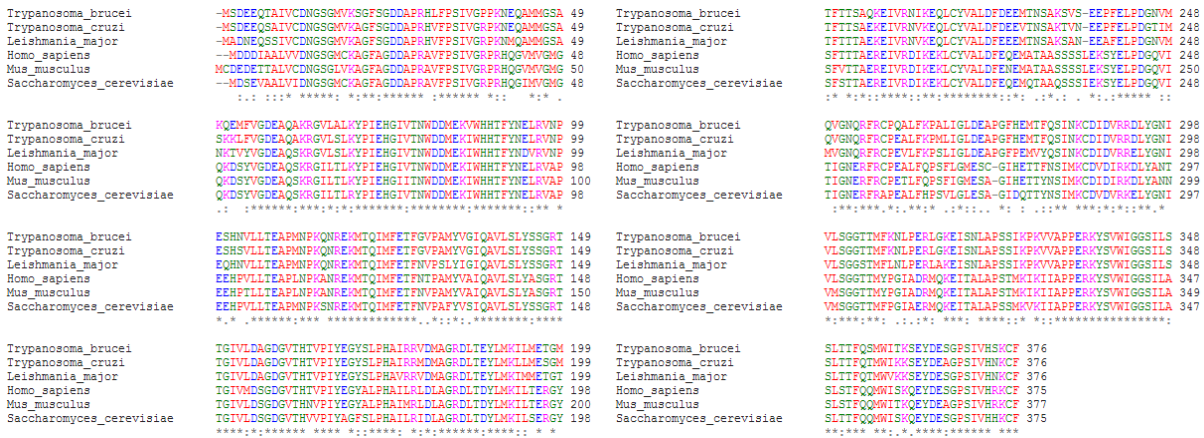


Figura 4. Alinhamento filogenético das actinas entre diferentes espécies. “*” representam regiões idênticas e “.” aminoácidos diferentes, porém com substituição conservativa, ou seja, aminoácidos correspondentes. Alinhamento realizado através do programa Clustal Omega.

Partindo para um outro viés, a análise filogenética das 5 sequências de actina encontradas em *T. cruzi* (Figura 5), mostrou que a actina 2 é a isoforma mais próxima da actina 1, e as actinas 4 e 5 formam um clado separadamente, indicando uma maior distância filogenética entre as outras isoformas analisadas. Ainda, as actinas 2 e 3 não apresentaram sintenia com os demais tripanossomatídeos, 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.

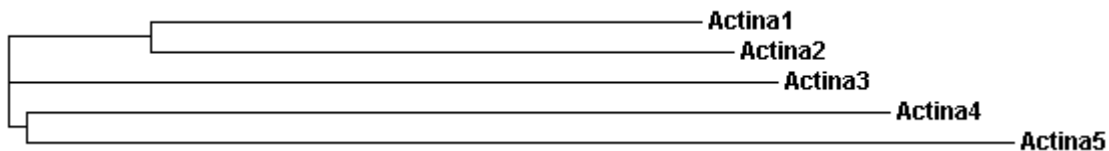


Figura 5. Árvore filogenética das actinas de *T. cruzi*. Alinhamento filogenético realizado através do método *Neighbour-joining*, pelo programa Clustal Omega. As distâncias entre as actinas foram: Actina 1: 0.22005, Actina 2: 0.25180, Actina 3: 0.33635, Actina 4: 0.34968, Actina 5: 0.40365.

Os tripanossomatídeos 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”.

Em *T. cruzi*, apesar de não terem sido observados filamentos de actina propriamente ditos, as principais proteínas responsáveis pela polimerização e despolimerização foram encontradas, tais como: ADF, cofilina, profilina, AIP, CAP/Srv2, CapZa e CapZb. Outro grupo de proteínas relacionadas a actina encontrado em *T. cruzi* foi a família das forminas. Dentro dessa família, a formina A e B são bastante conservadas nos três tripanosomatídeos, enquanto a formina C é exclusiva de *T. cruzi* (DE MELO, 2008).

Estudos do genoma dos tripanosomatídeos revelaram que, quando comparado a eucariotos superiores, esses parasitas exibem uma gama de proteínas que se ligam a actina, que, apesar de limitadas, são suficientes para, teoricamente, realizar a polimerização e despolimerização dos monômeros. Ainda, as principais proteínas responsáveis por esse processo foram demonstradas por serem total ou parcialmente conservadas (DE MELO, 2008).

4.2 OBTENÇÃO DE PARASITAS RECOMBINANTES

Trabalhos prévios, tendo a actina 1 como objeto de estudo, mostraram que esta proteína está presente em todos os estágios evolutivos do parasita. Nestes trabalhos, a abordagem para imunolocalização da actina 1 foi a de imunofluorescência indireta utilizando soro policlonal obtidos de camundongos imunizados com peptídeos de porções conservadas ou com a sequência completa da actina (DE MELO, CEVALLOS 2008, 2011). Apesar de ser possível observar o padrão geral da actina por esse

método, é possível que, o soro policlonal esteja reconhecendo outras sequências de actina, já que, como demonstrado anteriormente, existe no genoma do *T. cruzi* ao menos outras 4 sequências para actina, com homologia de pelo menos 50%.

Dentro deste contexto, nesse trabalho procuramos aplicar um método de estudo envolvendo diferentes técnicas de biologia molecular e celular para obter parasitas recombinantes que expressariam apenas a actina em estudo (no caso deste trabalho, a actina 1) fusionada à uma etiqueta (HA). Assim, seria possível eliminar alguma reação cruzada de um anticorpo contra actina que poderia marcar inespecificamente qualquer uma das outras isoformas de actina do *T. cruzi*.

Para isso, foram aplicadas diferentes abordagem em biologia molecular, a fim de se obter parasitas recombinantes, como descritos no item 3.3. O primeiro passo foi a amplificação da sequência da actina que seria inserida no pDONRTM221 da plataforma Gateway®. Para verificar se o produto da PCR apresentava o tamanho esperado (aproximadamente 500 pb), foi feita uma eletroforese em gel de agarose (Figura 6).

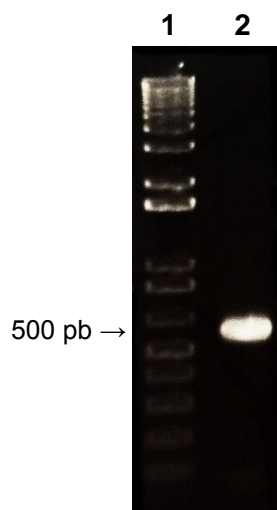


Figura 6. Gel de eletroforese. Produto da PCR da sequência da actina 1. Linha 1 → Padrão de DNA. Linha 2 → PCR do gene da actina 1, com o tamanho esperado (500 pb)

A plataforma Gateway® é um método de clonagem baseado nas propriedades de recombinação sítio-específica do bacteriófago lambda. Isso fornece uma maneira rápida e altamente eficiente de transporte de sequências de DNA para sistemas de vetores para análises funcionais e expressão de proteínas. A recombinação envolve dois principais componentes: a recombinação das sequências de DNA (por sítios *att*) e as proteínas que medeiam o processo da recombinação (*Clonase*TM *enzyme mix*).

A recombinação é conservativa, de modo que não há ganho ou perda de nucleotídeos, e não requer síntese de DNA. Os segmentos do DNA que flanqueiam os sítios de recombinação são chamados *att* (sequências híbridas compostas de sequências doadas por cada vetor parental).

No pDONR as sequências *att* flanqueiam o gene *CcdB*, que permite uma seleção negativa do pDONR e do pDEST. A proteína *CcdB* interfere na DNA girase de *E. coli*, inibindo o crescimento da maioria das cepas desta bactéria (Figura 7).



Figura 7. Esquema da reação de transferência da sequência de interesse para o pDonr. FONTE: Gateway® Technology (Versão E, 2010).

Quando a recombinação ocorre, o gene *CcdB* é substituído pelo gene de interesse. As células que não transformaram os vetores contendo a sequência de interesse, carregam o gene *CcdB*, não conseguindo crescer, permitindo uma alta eficiência no processo da clonagem. Para inserção do produto de PCR purificado no pDONR é feita uma reação com a enzima BP Clonase. Uma vez tendo o vetor do pDONR, é necessária fazer mais uma reação (LR Clonase) para que essa sequência seja transportada para o vetor de entrada (pDEST) (Figura 8).



Figura 8. Esquema da reação de transferência da sequência de interesse do pDONR para o pDest. FONTE: Gateway® Technology (Versão E, 2010).

Após a reação da LR Clonase, a sequência da actina 1 foi transferida para o pDEST HH. As células competentes foram transformadas com esses plasmídeos (pDEST) e destas colônias foram feitas reações de PCR para verificar a entrada do plasmídeo.

Após a obtenção do vetor de entrada, foi necessária a inserção da região a *jusante* do gene para a recombinação homóloga do cassete contendo o gene de interesse. A recombinação homóloga é induzida por meio da eletroporação dos parasitas. Com isso, a sequência de interesse do vetor de entrada é recombinada no genoma do parasita, no mesmo *locus* da sequência nativa, substituindo a sequência original pela sequência contendo o cassete de interesse. Desta forma, foi necessário clonar a sequência *downstream* do gene de interesse no vetor de entrada. Como a plataforma *Gateway*® permite que apenas uma sequência seja recombinada no vetor, a sequência *downstream* foi clonada pelo método da clonagem clássica (digestão com enzimas de restrição). Para isso, foi feita uma PCR utilizando como molde o DNA genômico de *T.cruzi*, com os oligonucleotídeos iniciadores para região *downstream* (Figura 9).

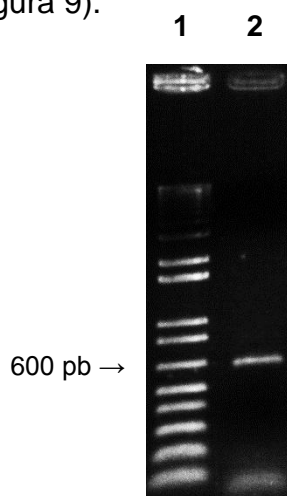


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose. Produto da PCR da sequência da região *downstream* da actina 1. Linha 1 → Padrão de DNA. Linha 2 → Produto da PCR do gene.

Após a obtenção do inserto, tanto os vetores (minipreparação do pDEST HH) quanto os insertos (região *downstream*), foram digeridos com a enzima de restrição *Bgl*II. A figura 10 mostra a completa digestão do vetor (linha 3), que pode ser observada pela comparação com o vetor antes da digestão (linha 2).

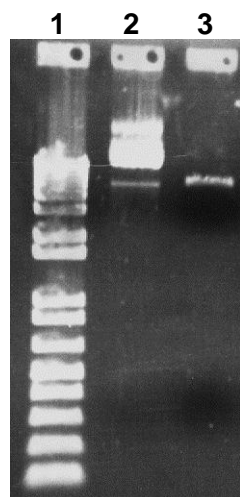


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose. Digestão de vetores a partir de enzimas de restrição. Linha 1 → Padrão de DNA. Linha 2 → Miniprep dos vetor pDEST Higromicina-HA. Linha 3 → Vetor digerido com a enzima *BglII*.

Após a confirmação da eficiência na digestão com a primeira enzima de restrição, foi prosseguida a digestão com a segunda enzima de restrição, *HindIII*, e posterior ligação (via T4 DNA Ligase) dos insertos e vetores. Bactérias (cepa TOP10F') foram transformadas e plaqueadas. A partir desta placa, foi feita uma seleção das colônias, através de PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores para as regiões INT2 F' e para a região *downstream* R' (*HindIII*) (Figura 11).

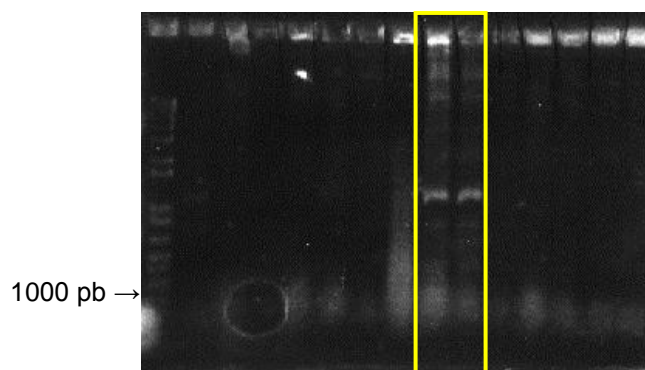


Figura 11. Screening de colônia. PCR de colônias para verificar a colônia que continha a região *downstream* transformada. Destacadas em amarelo as colônias positivas.

Uma vez selecionadas as colônias positivas, as mesmas foram expandidas em 20 mL de meio líquido (LB) para a obtenção de uma maior massa de células para purificação do cassete para a transfecção. Para isso, foram feitas minipreparações, a partir das quais, reações de PCR novamente confirmaram a correta montagem do cassete (Figura 12).

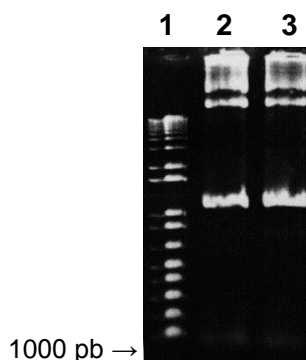


Figura 12. Gel de eletroforese. Produto de PCR das minipreparações das colônias positivas. Linha 1 → Padrão de DNA. Linha 2 e 3 → PCR das minipreparações dos vetores com a região *downstream* utilizando os primers INT2F e *HindIII*.

Para a transfecção dos parasitas foi necessário digerir o vetor (circular) com duas enzimas (*XbaI* e *HindIII*) de restrição para a obtenção dos cassetes linearizados contendo a sequência de interesse (Figura 13).



Figura 13. Esquema ilustrativo das principais sequências do vetor de entrada. A figura mostra o cassete montado, onde a sequência da actina 1 está fusionada ao gene de resistência a higromicina (Higro), a etiqueta HA e a sequência *downstream* (down). 5' 3'

A partir da busca por sítios de restrição, foram encontrados os sítios para as enzimas *XbaI* (Promega®) e *HindIII* (Neb®). Essas enzimas restringiriam o cassete em regiões específicas que aumentariam a eficiência da transfecção (Figura 14).

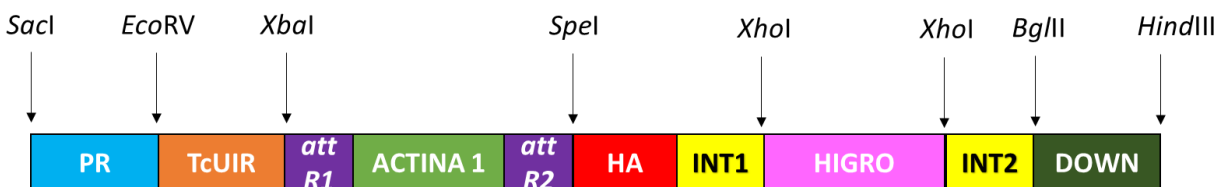


Figura 14. Esquema completo do cassete com os sítios de enzimas de restrição. Os elementos apresentados são o promotor ribossomal (PR), a região intergênica do locus ubiquitina de *T. cruzi* (TcUIR), os sítios de ligação para recombinação pela plataforma Gateway® (*attR1* e *attR2*), o gene de interesse, no caso deste trabalho, o gene da actina 1 (ID: Tc00.1047053510571.30), a etiqueta de fusão (HA), região intergênica 1 (INT1), o gene de resistência à higromicina (HIGRO), região intergênica 2 (INT2) e a região a jusante (*downstream*, DOWN). As setas mostram os sítios para as enzimas de restrição.

Para verificar se as reações poderiam ser realizadas de forma concomitante, foi feito um teste com as enzimas citadas. O teste foi efetuado de forma que foram feitas três reações: uma apenas com a enzima *Xba*I, uma apenas com a *Hind*III e a terceira contendo as duas enzimas (Figura 15).

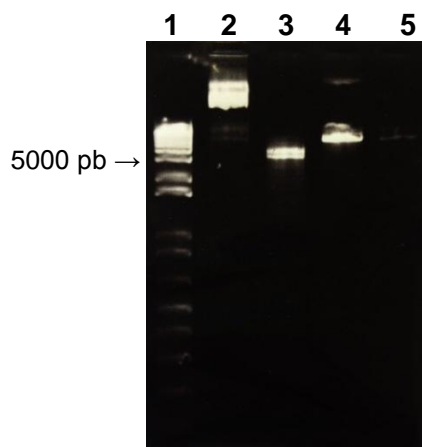


Figura 15. Gel de eletroforese.

Digestão do vetor. Linha 1 → Padrão de DNA. Linha 2 → Minipreparação do vetor contendo a região *downstream*. Linha 3 → Digestão com as enzimas *Xba*I e *Hind*III. Linha 4 → Digestão com a enzima *Xba*I. Linha 5 → Digestão com a enzima *Hind*III.

Uma vez verificada a possibilidade de realizar a digestão com as duas enzimas simultaneamente, a reação a partir da minipreparação foi realizada por duas horas, em banho seco a 37 °C. Após esse tempo, a solução foi quantificada em nanodrop (25 µg de DNA). Dado que, a quantidade de material era suficiente para ser transfectado, foi feita a eletroporação das formas epimastigotas de *T. cruzi* (Item 3.3.9). Após a transfecção por eletroporação, os parasitas foram selecionados pelo antibiótico higromicina e mantidos até que a colônia dos parasitas controle estivesse totalmente morta. Após a seleção, foi feito o processamento dos parasitas para imunofluorescência (Item 3.4).

Para a realização desse processo, foram utilizados parasitas selvagens como organismos de controle, já que o *T. cruzi* não apresenta domínios específicos para o anticorpo utilizado (HA) para a etiqueta da sequência recombinada. Quando submetidos a luz de fluorescência no comprimento de onda específico (488 nm), tais parasitas não apresentaram marcação, como esperado (Figura 16).

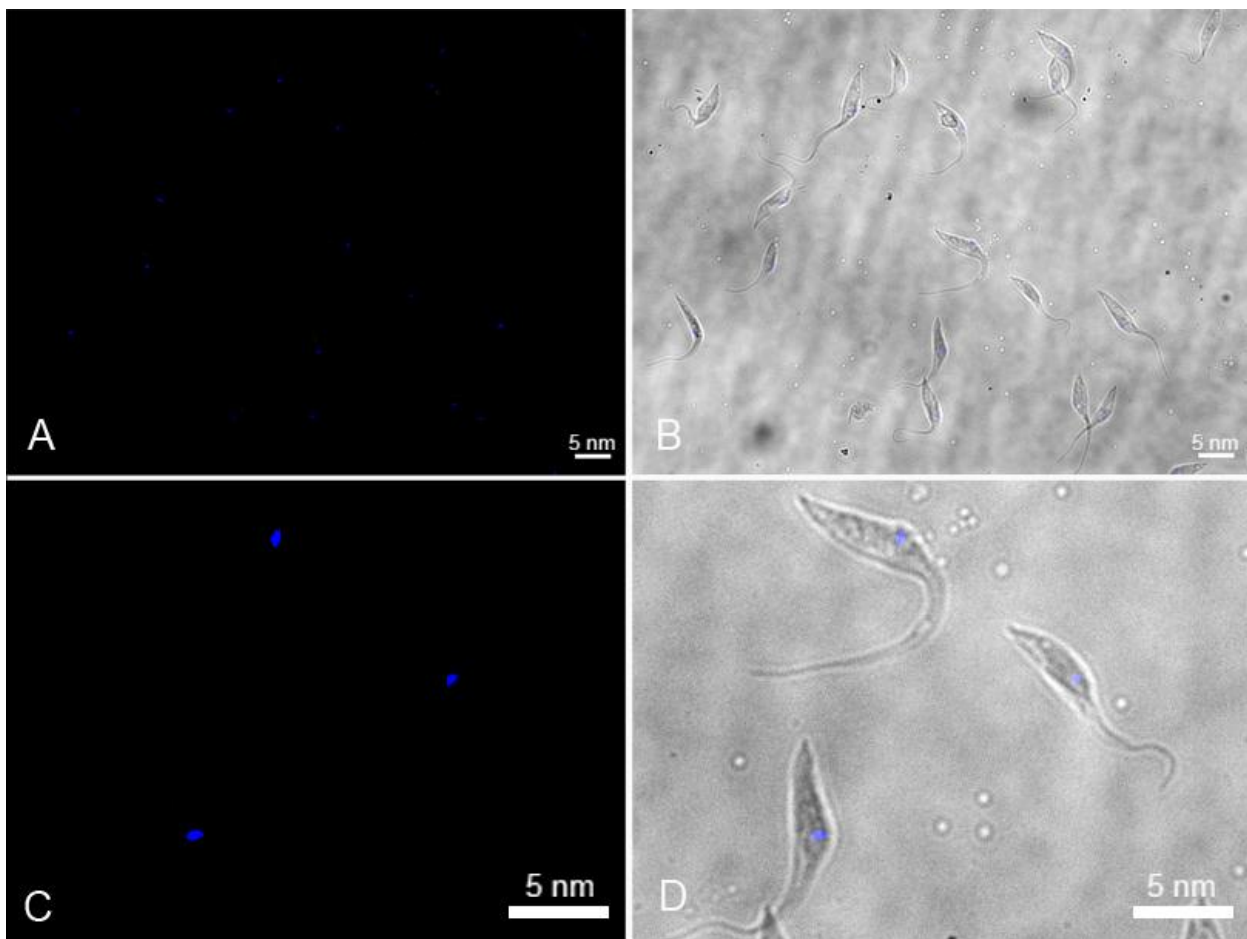


Figura 16. Imunofluorescência de parasitas selvagens. A) Parasitas corados com o intercalante de DNA Dapi (Invitrogen®). B) Contraste de fase. C e D) Idem A e B em maior magnificação.

Quando os parasitas transfectados foram excitados pela luz de fluorescência, foi possível observar uma marcação distribuída predominantemente na região posterior do corpo celular (Figura 17). Este dado pode confirmar a suposição de que os soros policlonais utilizados previamente para a marcação desta proteína em *T. cruzi* (DE MELO, 2008 e CEVALLOS, 2011) poderiam estar reconhecendo outras sequências de actina, já que a marcação vista nesses estudos foi a de um padrão uniformemente distribuído pelo corpo do parasita.

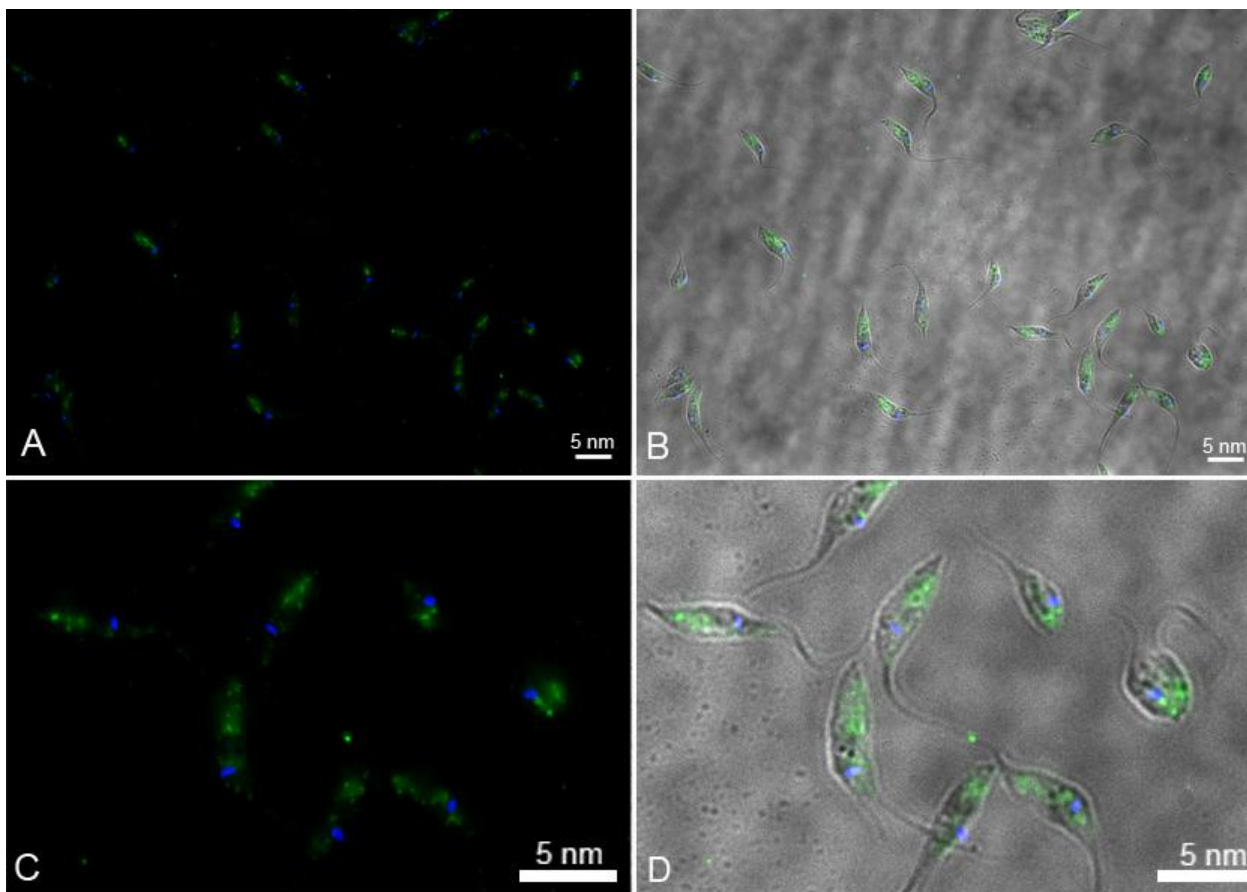


Figura 17. Imunofluorescência de parasitas transfectantes. A) Imunofluorescência de Alexa 488 (Sigma®) e Dapi (Invitrogen®). Marcação da etiqueta HA predominantemente na porção posterior dos parasitas. B) Contraste de fase. C e D) Idem a A e B em maior magnificação.

Uma marcação específica para a actina 1 preferencialmente na região posterior no corpo celular do parasita, pode sugerir que a marcação em outras partes previamente descritas, provavelmente correspondem às outras isoformas de actina, o que também poderia sugerir diferença no papel de cada uma delas na biologia do parasita. No entanto a aplicação desta e outras metodologias para as outras actinas ainda é fundamental para esclarecer estes pontos.

Outros experimentos para confirmar a correta localização do cassete transfectado ainda estão sendo realizados. Uma vez caracterizados, estes parasitas poderão ser utilizados como uma ferramenta no estudo do papel da actina 1 em *T. cruzi*, através de ensaios de incubação com agentes desestabilizadores da dinâmica de polimerização e despolimerização da actina; identificação de proteínas associadas à actina 1 por espectrometria de massas, entre outras tantas possibilidades.

Assim, estes resultados representam um importante ponto de partida para o estudo da localização e do papel de cada uma das isoformas da actina em *T. cruzi*. Além disso, com a aplicação das metodologias aqui descritas, expandem-se as possibilidades de estudo para a comparação desta proteína com as demais actinas do parasita como, por exemplo, a co-localização com suas isoformas, inferências sobre as funções específicas de cada actina, perfil de expressão, quantificação por normalização, etc.

5. CONCLUSÕES

A partir do trabalho realizado, foi possível concluir que:

- O gene que codifica a proteína actina 1 no genoma do *T. cruzi* quando comparado a outros organismos possui mais de 50% de homologia, se mostrando uma proteína altamente conservada, inclusive no organismo de estudo deste trabalho;
- É possível obter um parasita expressando uma sequência específica fusionada a uma etiqueta conhecida, por meio de uma recombinação homóloga a partir da plataforma *Gateway*® e da clonagem clássica;
- A sequência da proteína actina 1 é distribuída principalmente na região posterior do parasita, complementando os resultados existentes na literatura e dando uma nova visão para esta área da pesquisa, abrindo um leque de novas linhas de investigações em *T. cruzi*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

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

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.

DOHERTY, G.J., MCMAHON, H.T. **Mediation, modulation, and consequences of membrane-cytoskeleton interactions.** Annu Rev Biophys. v.37, p 65-95, 2008.

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.

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

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

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

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

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.

THOMASSON, M.S., MACNAUGHTAN, M.A., **Microscopy basics and the study of actin-actin-binding protein interactions.** Anal Biochem. v. 443, p 156-65, 2013.

YOSHIDA, N. ***Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity.** Parasitol Int. v. 57, p. 105-109, 2008.