

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JAQUELINE DE OLIVEIRA ROSA

PROTEÍNAS ACTINA EM *Trypanosoma cruzi*: EXPRESSÃO, LOCALIZAÇÃO
E POSSÍVEL FUNÇÃO CELULAR DA ACTINA 4

Curitiba
2015

JAQUELINE DE OLIVEIRA ROSA

PROTEÍNAS ACTINA EM *Trypanosoma cruzi*: EXPRESSÃO, LOCALIZAÇÃO
E POSSÍVEL FUNÇÃO CELULAR DA ACTINA 4

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: Dra. Lia Carolina Soares Medeiros

Co-orientador: Dr. Wanderson Duarte da Rocha

Curitiba
2015

“ A parte que ignoramos é muito maior que tudo o que sabemos. ”

Platão

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meus pais Ricardo Rosa e Maristela de Oliveira Rosa pelo cuidado, carinho e dedicação.

À minha orientadora Lia Carolina Soares de Medeiros por ter me acolhido tão bem, ter me orientado nessa empreitada, por, mais do que todos, ter acreditado que eu sou capaz. E por sempre ter uma palavra certa, uma mão amiga, um ombro acolhedor.

Ao meu co-orientador Dr. Wanderson por ter me aceitado como sua aluna, ter se disposto a corrigir meu trabalho e ter contribuído com boas sugestões.

À querida Bia, por ser mais do que uma colega de Laboratório, ser um presente que quero levar para a vida.

À Gi e ao Stênio por serem sempre solícitos e atenciosos a todas as minhas dúvidas.

Ao meu marido Edson e minha filha Ana Paula por serem meu porto seguro, meu lar.

A todos os colegas do LBC por toda a ajuda e pela ótima convivência.

A todos do ICC e da Federal que me apoiaram e me ajudaram.

RESUMO

Trypanosoma cruzi é um protozoário flagelado unicelular, que se desenvolve através de um complexo ciclo de vida, envolvendo um hospedeiro invertebrado e outro vertebrado. Quando infecta humanos, é responsável pelo estabelecimento da doença de Chagas, que afeta cerca de 8 milhões de pessoas no mundo. Embora haja grande interesse no estudo deste parasita, muitas de suas características moleculares e estruturais ainda permanecem pouco compreendidas. Actina, uma proteína altamente conservada e abundante na maioria das células eucarióticas, é um dos exemplos de proteína cuja função e localização celular não estão bem caracterizadas em *T. cruzi*. Embora tenham sido descritas a presença de genes que codificam diferentes isoformas de actina, proteínas do tipo actina e proteínas relacionadas a actina, e sua distribuição por todo o corpo celular através de imunofluorescência indireta, filamentos propriamente ditos nunca foram observados. Além disso, ainda não se sabe exatamente quantos genes e quantas cópias de cada um destes genes que codificam a proteína actina existem em *T. cruzi*, bem como seus níveis de expressão, localização celular e função nas diferentes formas de desenvolvimento do parasita. Para elucidar algumas das questões acima discutidas, este trabalho teve como objetivo produzir ferramentas para determinar a expressão, localização subcelular e possíveis funções do gene anotado como *actina 4* no genoma de *T. cruzi* nas diferentes formas de desenvolvimento do parasita.

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

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 ACTINAS E POTEÍNAS RELACIONADAS	10
2.2 ACTINA EM <i>T. cruzi</i>	14
2.3 <i>T. cruzi</i> E A DOENÇA DE CHAGAS	15
3. OBJETIVOS	18
3.1 OBJETIVOS GERAIS	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS	19
4.2 MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO	21
4.2.1 Cultivo de <i>Trypanosoma cruzi</i> , células Vero	21
4.2.2 Cultivo de mieloma (Ag8.65).....	22
4.2.3 Cultivo de <i>Escherichia coli</i>	22
4.2.4 Antibióticos utilizados	22
4.3 CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES	23
4.4 MANIPULAÇÃO DE DNA.....	24
4.4.1 Mini-preparação de plasmídeos.....	24
4.4.2 Oligonucleotídeos e PCR.....	24
4.4.3 Eletroforese de DNA	26
4.4.4 Digestão de DNA com endonucleases de restrição	26
4.4.5 Ligação de DNA ao vetor	26
4.4.6 Preparo do cassete para recombinação homóloga.....	27
4.4.7 Transfecção de epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	27
4.4.8 Extração de DNA de <i>T. cruzi</i>	28
4.5 MANIPULAÇÃO DE PROTEÍNAS	28
4.5.1 Expressão e purificação da proteína heteróloga actina 4	28
4.5.2 Obtenção do extrato protéico de <i>T. cruzi</i>	29
4.5.3 Western blot.....	30
4.6 OBTENÇÃO DO SORO POLICLONAL E ANTICORPO MONOCLONAL.....	30
4.6.1 Obtenção do soro policlonal contra actina 4	30
4.6.2 Análise de especificidade do soro.....	31

4.6.3 Obtenção de anticorpos monoclonais	31
4.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE ACTINA 4	33
4.8 IMUNOLOCALIZAÇÃO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA	33
5. RESULTADOS	34
5.1 CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO PARA A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA actina 4	34
5.2 CONSTRUÇÃO DO CASSETE PARA MUTAGÊNESE	37
5.2.1 Construção do cassete pNFact4RH_Cter+Down	37
5.3 CONSTRUÇÃO DOS VETORES EPISSOMAIS	41
5.3.1 Construção dos vetores pNFact4Epi_Cter e pNFact4Epi_Nter	42
5.3.2 Construção do vetor pNGFPact4Epi_Cter	47
5.4 OBTENÇÃO DO SORO POLICLONAL E TESTE DE ESPECIFICIDADE	49
5.5 IMUNOLOCALIZAÇÃO	52
6. DISCUSSÃO	59
7. CONCLUSÕES	63
8. PERSPECTIVAS	64
9. REFERÊNCIAS	65

1. INTRODUÇÃO

Trypanosoma cruzi é o agente etiológico da doença de Chagas, uma doença que afeta cerca de 8 milhões de pessoas no mundo todo. Apesar do grande interesse neste protozoário, a compreensão de algumas de suas características moleculares e estruturais ainda permanece incompleta. Uma das principais características do genoma do *T. cruzi* é a presença de uma grande quantidade de conjuntos de famílias multigênicas. Comparado com *T. brucei* e *L. major*, o *T. cruzi* possui o maior conjunto de famílias multigênicas (TEIXEIRA et al., 2012). O gene que codifica a proteína actina, por exemplo, pertence à uma família multigênica. A actina é a proteína mais abundante na maioria das células eucarióticas e se manteve altamente conservada ao longo da evolução. Ela desempenha um papel essencial na estrutura e dinâmica celular, participando de processos como mobilidade e manutenção da forma e polaridade da célula, podendo interagir com diversas outras proteínas e moléculas. O papel da actina em tripanosomatídeos, no entanto, ainda permanece pouco explorado (KOHL & GULL, 1998). Isso se deve em parte à composição bastante peculiar do citoesqueleto destes tripanosomatídeos, com estrutura baseada em uma rede de microtúbulos subpeliculares bastante estáveis.

Genes que codificam actina em tripanosomatídeos foram mais bem caracterizados em *T. brucei* e em *L. major* (BEM AMAR et al., 1988; DE ARRUDA & MATSUDAIRA, 1994), onde a presença de actina distribuída pelo corpo celular foi demonstrada por imunofluorescência indireta (GARCIA SALCEDO et al., 2004; SAHASRABUDDHE et al., 2004). Embora filamentos de actina nunca tenham sido diretamente observados por microscopia eletrônica de transmissão em tripanosomatídeos, a imunolocalização de actina utilizando anticorpos primários contra actina de *L. major* e anticorpos secundários conjugados a ouro coloidal mostrou que esta proteína apresenta uma distribuição dispersa por todo o corpo celular (bolsa flagelar, flagelo, cinetoplasto, núcleo, citoplasma) e em membranas (nuclear, citoplasmática e do vacúolo parasitóforo). Cevallos e colaboradores (2011) descreveram a presença de genes que codificam quatro isoformas de actina em *T. cruzi*, bem como a presença de vários genes para proteínas do tipo actina e proteínas relacionadas a actina. Neste trabalho, os autores nomearam as isoformas de actina como actina 1, actina 2, actina 3 e

actina 4. 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 do gene da actina 1 de *T. cruzi*.

Ainda, análises filogenéticas dos genes das quatro isoformas de actina anotadas no genoma de *CLBrener* mostram que alguns destes genes estão filogeneticamente mais próximos a genes que codificam proteínas relacionadas a actina (ARPs) ou proteínas do tipo actina (AcLs) do que ao gene da proteína actina propriamente dita. Assim, considerando que a anotação dos genes das quatro isoformas de actina de *T. cruzi* foi feita com base em análises *in silico* apenas, ainda não se sabe exatamente quantos genes e quantas cópias de cada um destes genes de fato codificam a proteína actina em *T. cruzi*, tampouco seus níveis de expressão, localização celular e função nas diferentes formas de desenvolvimento do parasita.

Dentro deste contexto, o presente projeto propõe-se a compreender as questões acima discutidas no que se refere ao gene anotado como actina 4 no genoma de *T. cruzi*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ACTINAS E PROTEÍNAS RELACIONADAS

A actina é uma proteína altamente conservada e possui papel importante na maioria das células eucarióticas. Os filamentos de actina fornecem suporte mecânico interno, força e direção para os movimentos celulares, além de participar no transporte moléculas e vesículas. Embora as sequências de aminoácidos de actina de diferentes espécies apresentem cerca de 90% de similaridade, as variações na sequência de aminoácidos geram diferenças funcionais significativas, como por exemplo contração em células musculares e não musculares, formação de anel contrátil durante o final da divisão celular, movimentos ameboides e preservação das microvilosidades intestinais. Uma possível explicação para esta proteína ser altamente conservada, é que a estrutura da superfície de um filamento de actina interage com muitas outras proteínas, de forma que uma mutação no gene da actina levaria a mudanças na interação com outras diversas proteínas, o que poderia resultar em mudanças celulares indesejáveis (ALBERTS et al., 2004).

A actina foi primeiramente descrita por Straub (1942), que observou que esta proteína tem capacidade de contração quando associada à miosina e actinmiosina. Muitos organismos possuem múltiplos genes que codificam para isoformas distintas de actina: em mamíferos por exemplo, existem pelo menos 6 isoformas de actina, entre actinas musculares e não musculares, sendo três isoformas de actina α , duas de actina γ e uma actina β (VANDEKERCKHOVE & WEBER, 1978)

A actina pertence à superfamília estrutural das açúcar-quinases e hexoquinases e apresenta-se sob duas formas, a forma monomérica ou globular (actina G) e a forma filamentosa (actina F). A actina G foi descrita em 1993 por Herman, possui 2 domínios *alfa* e *beta*, ou domínios interior e exterior, referentes à sua posição no filamento, e quatro subdomínios (1, 2, 3 e 4). O contato entre os dois principais domínios é pequeno, conseqüentemente, formam-se duas fendas entre os domínios, a fenda superior, que se liga a nucleotídeos (ATP/ADP) e a associados de cátions divalentes, e a fenda inferior, que é revestida por resíduos predominantemente hidrofóbicos, e constitui o principal local de ligação para a maioria das proteínas de ligação à actina (Figura 1)

(OTTERBEIN et al., 2001).

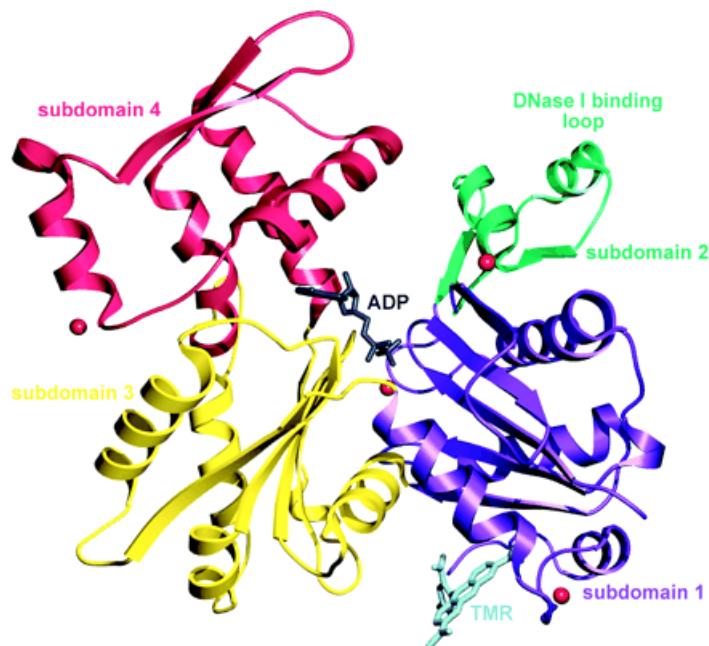


Figura 1: Estrutura cristalina da actina.

FONTE: OTTERBEIN et al., 2001.

A montagem do filamento de actina é um evento dinâmico e complexo, que envolve uma grande quantidade de proteínas, sinais moleculares internos e externos e uma quantidade mínima de actina G, chamada de concentração crítica. Para iniciar a montagem de filamentos de actina, também denominados de microfilamentos, extremidades "farpadas" são formadas por eventos de descapeamento ou corte de filamentos existentes ou por nucleação, que é iniciada com a ligação entre duas moléculas de actina seguida pela ligação a uma terceira molécula, que estabiliza o grupo e oferece condições para o crescimento do filamento. Após a formação das extremidades, ocorre a fase de alongamento, onde novos monômeros são adicionados à cadeia principal, seguida pela fase de equilíbrio ou *treadmilling*, na qual o filamento de actina torna-se polarizado, ou seja, em uma das extremidades ocorre a adição de novos monômeros (extremidade +) e na outra ocorre saída de monômeros (extremidade -). Isto ocorre devido a diferenças nas taxas de polimerização nas duas extremidades, na extremidade + ocorre crescimento rápido e na extremidade - ocorre crescimento lento com maior taxa de dissociação de subunidades (ALBERTS et al., 2004).

A diferença nas taxas de crescimento das extremidades é causada por

alterações na conformação dos monômeros ao entrar no polímero. Cada monômero de actina é ligado a uma molécula de ATP, que é hidrolisado a ADP ao ser adicionado no filamento. Em nucleotídeos hidrolisados, a afinidade entre as subunidades vizinhas é reduzida e torna-se mais provável a dissociação a partir de ambas as extremidades. Com isto, a velocidade de dissociação é independente da concentração dos monômeros, já a velocidade de polimerização é dependente da concentração dos monômeros livres, dado pela fórmula $C \times K_{on}$ (C = concentração de monômeros livres), resultando em um equilíbrio na concentração crítica de monômeros (C_c) onde $K_{of} = C_c \times K_{on}$ (ALBERTS et al., 2004).

A nucleação da actina é um evento cineticamente desfavorável, e para que este evento ocorra diversos fatores estão envolvidos na nucleação de actina, dentre eles as ARPs (actin-related protein) (POLLARD & BORISY, 2003; CAMPELLONE & WELCH, 2010). As proteínas relacionadas à actina, ou ARPs, são proteínas cuja sequência primária apresenta semelhança com a da actina, porém não identidade. A semelhança entre as ARPs e as actinas convencionais varia entre 17 a 60% (SCHAFER & SCHROER, 1999). As famílias mais bem caracterizadas de proteínas relacionadas à actina são as Arp1, Arp2 e Arp3.

Outras proteínas também participam na regulação da polimerização/despolimerização da actina. Em geral, a concentração citoplasmática de actina G é muitas vezes superior à concentração crítica, o que em tese poderia levar à polimerização total da actina. Entretanto, monômeros de actina por vezes encontram-se ligados à timosina, uma proteína que impede a hidrólise do ATP e a ligação do monômero ao filamento. A profilina por sua vez, estimula a ligação dos monômeros à extremidade *plus* do filamento e, conseqüentemente, o crescimento de um filamento. Esta proteína compete com a timosina pela ligação à actina G e responde a diversos estímulos como picos na concentração de AMPc. O balanço entre as moléculas de actina G ligadas a timosina ou a profilina resulta na instabilidade dinâmica dos filamentos (Figura 2) (POLLARD & BORISY, 2003; CAMPELLONE & WELCH, 2010).

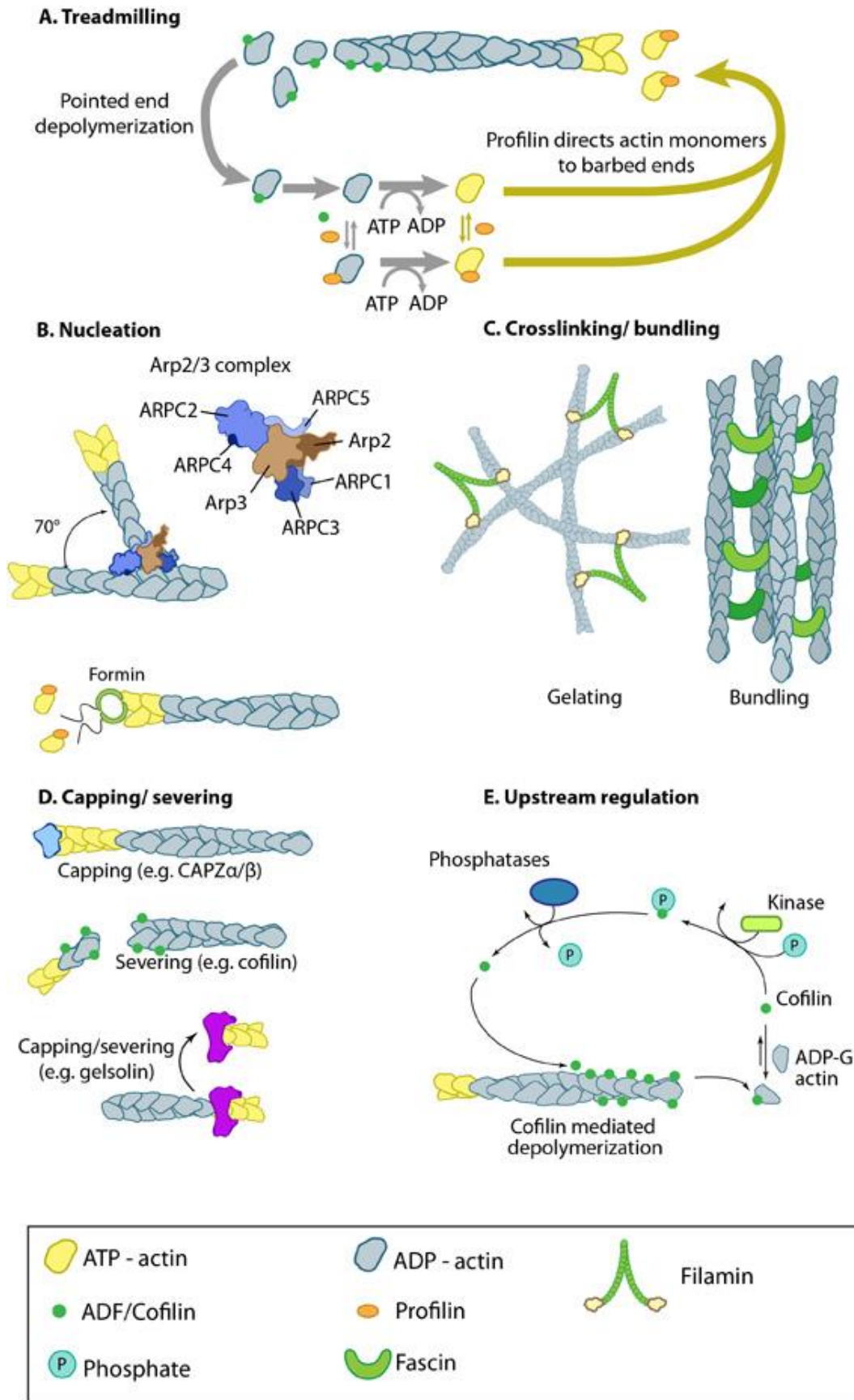


Figura 2: Proteínas de ligação à actina influenciam a dinâmica de actina.

FONTE: Mechanobiology Institute, National University of Singapore
 Usado com permissão de MBInfo: www.mechanobio.info

Para estudar a dinâmica normal de polimerização-despolimerização da actina, drogas que interferem neste processo são amplamente empregadas. As principais drogas que interferem na dinâmica da actina são a faloidina e a citocalasina. A faloidina é uma droga extraída do cogumelo *Amanita phalloides*. Este composto forma ligações laterais com microfilamentos, estabilizando-os, impedindo a sua despolimerização. Uma variação da faloidina é a falacidina, um derivado fluorescente que permite a visualização dos filamentos por microscopia de fluorescência. A citocalasina por sua vez, liga-se especificamente aos monômeros impedindo a sua adição ao filamento. Com isto, devido à dinâmica de polimerização-despolimerização, os microfilamentos acabam sendo todos despolimerizados, levando a célula a perder sua forma característica e arredondar-se, e desprender-se do substrato.

2.2 ACTINA EM *T. cruzi*

O papel da actina em *T. cruzi* permanece pouco explorado, embora genes que codificam para proteínas actina já tenham sido descritos. Cevalos e colaboradores (2003; 2011) identificaram 4 genes que codificam para isoformas de actina e diversos outros genes que codificam para proteínas relacionadas a actina e proteínas do tipo actina no genoma de *T. cruzi*.

Ainda que a actina seja uma proteína altamente conservada, actinas de protistas são bem menos conservadas, não só comparadas às actinas convencionais de organismos multicelulares, mas também às variantes de um mesmo organismo (SEHRING et al., 2007). Apesar da estrutura global da actina ser conservada em *T. cruzi* (DE MELO et al., 2008) a similaridade entre as sequências de aminoácidos de genes anotados como actina em *T. cruzi* é, na grande maioria, inferior a 70% (CEVALOS et al., 2011). De Melo (2008) observou que a maioria das trocas de aminoácidos de actina de *T. cruzi* comparadas a outras sequências de actina de eucariotos, estão na superfície do monômero, grande parte nos *loops* responsáveis pela interação monômero-monômero durante a formação do filamento. Em protistas, têm sido relatados exemplos de diferenças na localização subcelular das variantes de actinas devido à utilização em compartimentos celulares específicos. Em *T. brucei*, por exemplo, uma actina

atípica (TryARP), que é expressa apenas no flagelo, foi caracterizada (ERSFELD & GULL, 2001). Alterações no padrão de expressão de actina durante o desenvolvimento, também têm sido relatados. Embora filamentos de actina nunca tenham sido observados em *T. cruzi*, Cevalos e colaboradores (2011) detectaram, por *immunoblotting*, diferenças na distribuição subcelular da actina entre os estágios de desenvolvimento e a presença de 5 variantes de actina nos diferentes estágios, com padrões de expressão distintos.

Estudos anteriores utilizando anticorpos heterólogos demonstraram a expressão de actina em formas epimastigota de *T. cruzi* por todo o corpo celular (DE SOUZA et al., 1983; MORTARA, 1989), embora de Souza e colaboradores (1983) tenham observado estruturas localizadas ao longo do flagelo. Mais recentemente, De Melo e colaboradores (2008), utilizando um anticorpo policlonal específico contra actina 1 de *T. cruzi*, revelaram estruturas puntiformes que eram visíveis ao longo do corpo do parasita nas diferentes formas de desenvolvimento.

A prospecção do genoma de *T. cruzi* revelou que as principais proteínas que participam dos processos de nucleação e de *treadmilling* em eucariotos superiores estão conservadas, indicando que a maquinaria básica necessária para a formação do filamento está presente no genoma de *T. cruzi*. O fato da actina na forma filamentosa não ter sido observada pode ser devido à instabilidade do filamento ou montagem ineficiente, eventos que não estão claramente compreendidos (DE MELO et. al, 2008).

Pouco se sabe sobre o papel da actina durante o ciclo de vida do *T. cruzi*, bem como a função específica de cada uma das isoformas desta proteína.

2.3 *T. cruzi* E A DOENÇA DE CHAGAS

A família Trypanosomatidae, a qual pertence o *T. cruzi*, pertence à ordem Kinetoplastida (Euglenozoa, Kinetoplastea) (CAVALIER-SMITH, 2010), a qual abrange protozoários flagelados que possuem 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 outras características peculiares, tais como:

trans-splicing de todo o mRNA transcrito, organização dos genes em *clusters*, compartimentalização da glicólise e a habilidade de migrar dos vacúolos parasitóforos evitando assim a sua degradação (SIMPSON, 2006)

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

A Doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é uma antroponose causada pelo *Trypanosoma cruzi*. Esta doença apresenta duas fases clínicas, a fase aguda, que pode ser sintomática ou não, podendo evoluir para a fase crônica. Segundo o Ministério da Saúde estima-se que no Brasil existem dois a três milhões de pessoas infectadas.

O ciclo de vida do *T. cruzi* inclui um hospedeiro invertebrado e um hospedeiro vertebrado, que por vezes pode ser o homem. Os principais hospedeiros invertebrados são triatomíneos dos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*, popularmente conhecidos como “barbeiros”. Estes insetos são também os principais vetores da Doença de Chagas. As fêmeas são hematófagas e, uma vez contaminadas, liberam as formas infectantes tripomastigotas metacíclicas nas fezes durante o repasto sanguíneo. Os tripomastigotas metacíclicos podem entrar no hospedeiro pelo local da picada ou pelas mucosas. Uma vez no hospedeiro, esta forma evolutiva invade uma célula e diferencia-se para amastigota, forma replicativa. Os amastigotas multiplicam-se por divisão binária, diferenciam-se em tripomastigotas sanguíneos e rompem a célula hospedeira. Os tripomastigotas sanguíneos podem invadir outras células adjacentes ou atingir a corrente sanguínea e infectar diferentes tecidos e tipos celulares, tornando-se amastigotas e repetindo o ciclo replicativo. É neste ciclo infectivo que aparecem as manifestações clínicas da fase aguda. O triatomíneo é infectado quando se alimenta do sangue de um mamífero contaminado pelo parasita. No intestino do hospedeiro invertebrado, ocorre a diferenciação para a forma replicativa epimastigota, que se multiplica por divisão binária e migra para

a porção posterior do intestino onde diferencia-se para tripomastigota metacíclico, reiniciando o ciclo (Figura 3) (revisto por TYLER & ENGMAN, 2001).

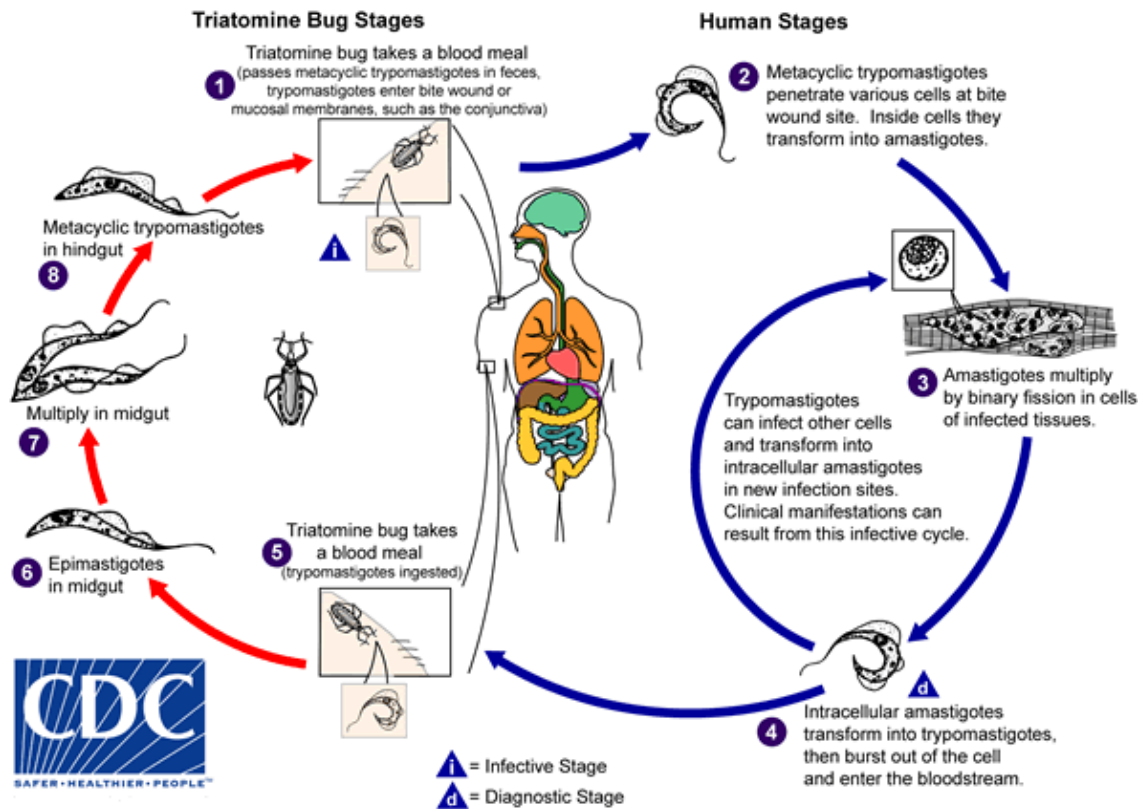


Figura 3: Ciclo de vida do *T. cruzi*.

FONTE: Centers for Disease Control and Prevention

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Este projeto tem como objetivo determinar localização subcelular do gene anotado como proteína actina 4 (TcCLB.503841.40) no genoma de *T. cruzi* em diferentes formas de desenvolvimento deste parasita.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir soro policlonal e anticorpo monoclonal contra a actina 4;
- Obter formas epimastigotas de *T. cruzi* geneticamente modificadas para expressar a actina 4 fusionada à uma etiqueta comercial (Flag ou GFP);
- Determinar a localização subcelular e possível função da actina 4 em diferentes formas de desenvolvimento do parasita através de imunolocalização;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

As bactérias e plasmídeos utilizados neste trabalho estão descritos na tabela 1.

TABELA 1 – BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

Estirpes	Características	Referência
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	Sm ^R	INVITROGEN
Roseta gami 2	Expressa RNA polimerase do fago T7. Expressa códons raros. Tetra ^R , Stepto ^R , Clora ^R .	New England Biolabs.
Plasmídeos		
pDONR221	Vetor para clonagem recombinatória de produtos de <i>attB</i> PCR. Km ^R , <i>ccdB</i> , <i>attP</i> , Gateway®.	INVITROGEN
pDONR <i>act4</i>	Vetor para clonagem contendo sequência codificadora completa para o gene da actina 4 de <i>T. cruzi</i> , Km ^R .	Este trabalho
pDONR <i>act4</i> _Cter	Vetor para clonagem contendo sequência final do gene da actina 4 (535pb) de <i>T. cruzi</i> , Km ^R .	Este trabalho
pDONR <i>act4</i> _Nter	Vetor para clonagem contendo sequência inicial do gene da actina 4 (500pb) de <i>T. cruzi</i> , Km ^R .	Este trabalho
pDEST17	Promotor T7, sequência codificadora para a cauda de histidinas, Amp ^R , <i>ccdB</i> , <i>attR</i> , Gateway®.	INVITROGEN
pDEST17 <i>act4</i>	Vetor contendo a sequência completa do gene da actina 4 de <i>T. cruzi</i> , promotor T7, sequência codificadora para a cauda de histidinas, Amp ^R .	Este trabalho
pTcNeo_3xFLAG_C-1	Vetor para clonagem, etiqueta FLAG C-terminal, Amp ^R , Neo ^R , <i>ccdB</i> , <i>attR</i> .	Gonçalves <i>et al.</i> não publicado
pNFact4Epi_Cter	Vetor epissomal contendo a sequência completa do gene da actina 4 de <i>T. cruzi</i>	Este trabalho

	fusionada a etiqueta FLAG na posição carboxi-terminal, Amp ^R , Neo ^R .	
pNFact4RH_Cter	Vetor de clonagem recombinatória contendo a sequência final (535pb) do gene da actina 4 de <i>T. cruzi</i> fusionada a etiqueta FLAG, Amp ^R , Neo ^R .	Este trabalho
pNFact4RH_Cter+Down	Vetor de clonagem recombinatória contendo a sequência final (535pb) e uma região <i>downstream</i> (590pb) do gene da actina 4 de <i>T. cruzi</i> fusionada a etiqueta FLAG, Amp ^R , Neo ^R .	Este trabalho
pTcGW_FLAG_N	Vetor para clonagem, etiqueta FLAG N-terminal, Amp ^R , Neo ^R , <i>ccdB</i> , <i>attR</i> .	Batista et al. não publicado
pNFact4Epi_Nter	Vetor episomal contendo a sequência completa do gene da actina 4 de <i>T. cruzi</i> fusionada a etiqueta FLAG na posição amino-terminal, Amp ^R , Neo ^R .	Este trabalho
pNFact4RH_Nter	Vetor para clonagem recombinatória contendo a sequência inicial (500pb) do gene da actina 4 de <i>T. cruzi</i> fusionada a etiqueta FLAG na posição amino-terminal, Amp ^R , Neo ^R .	Este trabalho
pNFact4RH+ups_Nter	Vetor para clonagem recombinatória contendo a sequência inicial (500pb) e uma região <i>upstream</i> (500pb) do gene da actina 4 de <i>T. cruzi</i> fusionada a etiqueta FLAG na posição amino-terminal, Amp ^R , Neo ^R .	Este trabalho
pTcNeo_GFP	Vetor para clonagem, etiqueta GFP C-terminal, Amp ^R , Neo ^R , <i>ccdB</i> , <i>attR</i> .	Moreira et al. não publicado
pNGFPact4Epi_Cter	Vetor episomal contendo a sequência completa do gene da actina 4 de <i>T. cruzi</i> fusionada a etiqueta GFP na posição carboxi-terminal, Amp ^R , Neo ^R .	Este trabalho

O ID de ambos os locos de actina 4 de *T. cruzi* CL-Brener, bem como as abreviações utilizadas neste trabalho estão descritos na tabela 2.

TABELA 2 – GENES

Gene ID	Anotação	Referência	Abreviação neste trabalho	
			gene	proteína
<i>Trypanosoma cruzi</i>			gene	proteína
Tc00.1047053503841.40	Actina, putativa	CEVALLOS et al. (2011)	<i>act4</i>	Act4
Tc00.1047053511463.4	Actina, putativa	CEVALLOS et al. (2011)	<i>act4</i>	Act4

4.2 MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

4.2.1 Cultivo de *Trypanosoma cruzi*, células Vero.

O clone Dm28c de *T. cruzi* (CONTRERAS et al., 1985, CONTRERAS et al., 1988) foi utilizado nas formas epimastigota, tripomastigota metacíclico, tripomastigota obtido de cultura de células e amastigota obtido de cultura de células.

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT (CAMARGO, 1964) a 28 °C e com passagens a cada três dias com inoculo de 1×10^6 células/mL. As formas epimastigotas foram coletadas por centrifugação no terceiro dia de cultivo (correspondente à fase logarítmica de crescimento), quando a densidade celular se apresentou entre $1 - 3 \times 10^7$ células/mL.

As formas tripomastigotas metacíclicas foram obtidas através do processo de diferenciação *in vitro* em meio TAU (BONALDO et al., 1988).

Para a obtenção de tripomastigotas e amastigotas, células Vero (ATCC® número: CRL-2783™) foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino, penicilina 100 UI/mL, estreptomicina 10 µg/mL e glutamina 2 mM a 37 °C com 5% de CO₂. Células com confluência entre 50% – 70% foram infectadas com formas tripomastigotas metacíclicas na razão de 10 parasitas para 1 célula. Após 4h de contato, os parasitas livres no sobrenadante foram retirados com a troca do meio RPMI 1640. Após 96h do contato inicial ocorre o pico de liberação das formas tripomastigotas. 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 Companytm*).

Células Vero não lisadas foram removidas por centrifugação 800 g por 10 minutos, e os amastigotas foram recuperados do sobrenadante (BATISTA et al., 2015).

4.2.2 Cultivo 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.

4.2.3 Cultivo de *Escherichia coli*

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

4.2.4 Antibióticos utilizados

Os antibióticos utilizados e suas concentrações para o cultivo de *E. coli* e *T. cruzi* podem ser observados na tabela 3.

TABELA 3 – ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS PARA O CULTIVO DE *E. coli* E *T. cruzi*

ANTIBIÓTICO		<i>E. coli</i>	<i>T. cruzi</i>
Nome comercial	Nome IUPAC	[]	
Neomicina (Neo)	(2R,3S,4R,5R,6R)-5-amino-2-(aminomethyl)-6-[(1R,2R,3S,4R,6S)-4,6-diamino-2-[(2S,3R,4S,5R)-4-[(2R,3R,4R,5S,6S)-3-amino-6-(aminomethyl)-4,5-dihydroxyoxan-2-yl]oxy-3-hydroxy-5-(hydroxymethyl)oxolan-2-	-	500 µg/mL

	yl]oxy-3-hydroxycyclohexyl]oxyoxane-3,4-diol		
Ampicilina (Amp)	(2S,5R,6R)-6-[[[(2R)-2-amino-2-phenylacetyl]amino]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylic acid	25 mg/mL	-
Canamicina (Km)	(2R,3S,4S,5R,6R)-2-(aminomethyl)-6-[[[(1R,2R,3S,4R,6S)-4,6-diamino-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-4-amino-3,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy-2-hydroxycyclohexyl]oxyoxane-3,4,5-triol	25 mg/mL	-
Clorafenicol (Clora)	2,2-dichloro-N-[(1R,2R)-1,3-dihydroxy-1-(4-nitrophenyl)propan-2-yl]acetamide	34 mg/mL	-
Estreptomicina	2-[(1R,2R,3S,4R,5R,6S)-3-(diaminomethylideneamino)-4-[(2S,3S,4S,5R)-3-[(2R,3R,4R,5S,6R)-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-3-(methylamino)oxan-2-yl]oxy-4-formyl-4-hydroxy-5-methyloxolan-2-yl]oxy-2,5,6-trihydroxycyclohexyl]guanidine	50 mg/mL	-
Tetraciclina	(4S,4aS,5aS,6S,12aR)-4-(dimethylamino)-1,6,10,11,12a-pentahydroxy-6-methyl-3,12-dioxo-4,4a,5,5a-tetrahydrotetracene-2-carboxamide	12,5 mg/mL	-

4.3 CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES

Para o preparo de células quimiocompetentes, as estirpes de *E. coli* BL21 e DH5α foram crescidas em meio LB, contendo os antibióticos adequados, a 37 °C sob agitação de 200 rpm até atingir uma D.O._{600nm} de 0,5. A cultura foi mantida por 15 minutos no gelo e alíquotas foram centrifugadas a 4 °C, 10.000 g, durante 10 minutos. As células foram ressuspensas em 200 µL de CaCl₂ 100 mM + HEPES 10 mM e incubadas em gelo por aproximadamente 2 horas. As células foram centrifugadas novamente e o pellet foi ressuspensas em 4 mL de CaCl₂ 100

mM + Hepes 10 mM + glicerol 14%. As células foram aliquotadas e congeladas a - 80 °C.

Para as transformações, 5µL de DNA plasmidial foram adicionados a 50 µL de células quimiocompetentes (aproximadamente 1:10 vetor/bactéria) e incubadas em gelo por 30 minutos. Um choque térmico de 1 minuto e 30 segundos a 42 °C foi feito seguido de resfriamento em gelo por 2 minutos. As células foram recuperadas em meio LB à 37 °C, durante 1 hora. Posteriormente, estas células foram plaqueadas em meio sólido seletivo contendo os antibióticos apropriados.

4.4 MANIPULAÇÃO DE DNA

4.4.1 Mini-preparação de plasmídeos

A extração de plasmídeos foi realizada com kit de lise alcalina de acordo com o fabricante QIAGEN.

4.4.2 Oligonucleotídeos e PCR

Para a construção dos vetores de recombinação homóloga, expressão heteróloga e episomal, oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados contendo sítios *attB* (em vermelho) para a clonagem recombinatória utilizando a plataforma *Gateway*® ou sítios de corte para enzimas de restrição (em verde) conforme descritos abaixo:

TABELA 4 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES

Primer	TM	Sequência
gene actina 4		
<i>act4For</i>	57 °C	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATG CAAAGTACCATCGTGCTG
<i>act4Rev</i>	57 °C	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCGCC CACACGGCGGTTGTGCA

<i>act4RH_CterFor</i>	57 °C	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCTCC GGTACCGACAAGCGCCATCCC
<i>act4RH_NterRev</i>	57 °C	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAACA GCGTACCCCTGCACTGCC
<i>act4DownFor</i> contém sítio BglII	57 °C	CGATGAGATCTAAGTGAAGTTGAGAGAAGTAAGG TCAGTAGA
<i>act4DownRev</i> contém sítio HindIII	57 °C	AAAAAAGCTTACGGGAGCGTCGTCCTTCTGTTTT GCTTGTGAG
<i>act4pDEST17For</i>	57 °C	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATG CAAAGTACCATCGTGCTGG
<i>act4pDEST17Rev</i>	57 °C	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAG CCCACACGGCGGTTGT
vetor pTcNeo_3xFLAG_C-1		
IR1_GWrev	57 °C	CACTCCCCAGCGCCACGCAACGCGC
IR2_GWfor	57 °C	GACTTGGATTGTATCGGACGGCCGAATAGC
vetor pTcGW_FLAG_N		
IR1_GWrev	57 °C	CACTCCCCAGCGCCACGCAACGCGC
NeoEcoRIRev	55 °C	GGGGGAATTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGA TAGAA
NeoOutRev	57 °C	GAACCTGCGTGCAATCCATC
NeoOutFor	57 °C	
vetor pTcNeo_GFP		
IR1_GWrev	57 °C	CACTCCCCAGCGCCACGCAACGCGC
IR2_GWfor	57 °C	GACTTGGATTGTATCGGACGGCCGAATAGC

A análise da qualidade de todos os oligonucleotídeos foi realizada com o auxílio do programa online Oligo Analyzer da IDT - <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>.

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 template, 2 µL de MgSO₄ 50 mM, 4 µL de dNTPs 2,5 mM, 5 µL de tampão Taq DNA polimerase 10x e quantidade suficiente de H₂O 18.2 para completar 50 µL.

Os tubos contendo a solução foram colocados em termociclador (modelo MWG da Biotech®).

4.4.3 Eletroforese de DNA

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

4.4.4 Digestão de DNA com endonucleases de restrição

A digestão de DNA foi feita de acordo com o fabricante da enzima de restrição (Invitrogen, GE Healthcare, NEB ou Fermentas).

4.4.5 Ligação de DNA ao vetor

Para a ligação da região *downstream* ao plasmídeo pNFact4RH_Cter (contém a sequência final do gene *act4*), este foi digerido por 1 hora e 30 minutos à 37 °C com 2-5 U enzima *HindIII*. A enzima foi então inativada pelo calor, 65 °C por 20 minutos, conforme indicação do fabricante. Após a purificação do plasmídeo, o mesmo foi novamente digerido com *BglII*. A enzima foi então inativada pela adição de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), de acordo com a recomendação do fabricante. O DNA foi precipitado com a adição de 2 volumes de etanol absoluto e seco à 42 °C e dissolvido em água ultrapura estéril. O inserto (região *downstream*) foi digerido e purificado seguindo as mesmas etapas acima descritas.

Foram utilizadas aproximadamente 70 ng do vetor digerido e 3 a 5 vezes mais inserto em relação à massa do vetor. Ao sistema foi adicionado tampão de ligação (1x) e 0,5 a 1U de enzima T4 DNA Ligase. O sistema foi incubado a 16

°C por aproximadamente 24 horas, dando origem ao vetor pNFact4RH_Cter+Down. Este vetor foi transformado na bactéria DH5 α , amplificado e purificado por mini preparação de plasmídeo.

As demais ligações foram realizadas utilizando a plataforma Gateway®, conforme recomendação do fabricante (Invitrogen).

4.4.6 Preparo do cassete para recombinação homóloga

Para a obtenção do cassete para recombinação homóloga, o vetor pNFact4RH+Down_Cter foi submetido à digestão com 2-5 U das endonucleases *Xba*I e *Hind*III. Após a digestão completa do vetor pNFact4RH_Cter+Down, o cassete foi purificado pelo método do fenol:clorofórmio:álcool isoamílico. Foram utilizados aproximadamente 20 μ g deste cassete na transfecção de formas epimastigotas de *T. cruzi* Dm28c, pelo método da eletroporação, para a indução da recombinação integrativa no DNA genômico do parasita.

4.4.7 Transfecção de epimastigotas de *T. cruzi*

Formas epimastigotas de *T. cruzi* serão cultivadas por 3 dias, coletadas por centrifugação, ressuspensas em 1 mL de solução de eletroporação (NaCl 140 mM, Hepes ácido 25 mM, Na₂HPO₄ 0,74 mM) e transferidos para cubetas de eletroporação estéreis e pré-resfriadas. Serão adicionados cerca de 20 μ g do material a ser transfectado. Será sempre usada uma cubeta contendo apenas a suspensão de parasitas que será utilizada como controle. As amostras serão submetidas a 2 pulsos e transferidas para garrafas de cultura contendo meio LIT e incubadas. Após 24 horas de incubação será adicionado o antibiótico neomicina na concentração de 500 μ g/mL. As culturas serão mantidas até a ausência de proliferação celular na cultura controle.

4.4.8 Extração de DNA de *T. cruzi*

A obtenção do DNA foi realizada mediante extração em pequena escala utilizando cloreto de lítio. Para isso, foi utilizada cultura 3 dias de *T. cruzi* (aproximadamente 10^7 parasitas por mL). Da cultura foi retirado 1 mL, centrifugado por 5 minutos a 6.000 g e lavados 2 vezes com PBS. O pellet foi ressuspensão em 500 μ L de TELT (Tris-HCl 50 mM, EDTA 62,5 mM, LiCl 2,5 mM e Triton X-100 4%) e incubado por 5 minutos, vertendo o tubo algumas vezes. Foram adicionados 300 μ L 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 μ L de fenol/clorofórmio e o material foi centrifugado novamente. 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* foi ressuspensão em 50 μ L de T.E/RNase (Tris HCl 10 mM pH 7,4, EDTA 1 mM pH 8, RNase 1 mM).

4.5 MANIPULAÇÃO DE PROTEÍNAS

4.5.1 Expressão e purificação da proteína heteróloga actina 4

Para a expressão da proteína Act4, o gene codificante foi inserido no vetor de entrada pDONR221, que foi então transformado na estirpe DH5 α de *E. coli* para a obtenção dos plasmídeos pDONRact4. Posteriormente o gene foi inserido por clonagem recombinatória no vetor expressão pDEST17 utilizando a plataforma Gateway®, os vetores resultantes foram então transformados na estirpe DH5 α de *E. coli* originando o plasmídeo pDEST17act4, que foi transformado na estirpe própria para a expressão heteróloga ROSETA gami2 de *E. coli*. A transformação foi plaqueada em meio LB contendo os antibióticos selecionadores ampicilina, estreptomicina, tetraciclina e cloranfenicol (TABELAS 1 E 3), uma colônia de cada placa foi raspada, inoculada em 300 mL de meio LB e incubada a 37 °C até atingir uma D.O._{600nm} de 0,5, quando, então, IPTG (300 μ mol/L) foi adicionado às culturas para a indução da expressão das proteínas.

Um mililitro de cada cultura sem indução foi guardado, centrifugado a 4 °C, 7.500 rpm por 5 minutos e ressuspensão em 110 µL de tampão de TBE. Após 3 horas de indução, o restante da cultura foi centrifugado a 4 °C 7.500 rpm por 10 minutos, lavado por 3 vezes com PBS e o pellet de células ressuspensão em 8 mL de tampão de lise (NaH₂PO₄ 100 mM, NaCl 500 mM, Triton x-100 2%), as amostras foram sonicadas em 5 ciclos de 15 segundos alternados por 15 segundos de repouso em gelo, e então centrifugadas a 4 °C a 11.000 rpm por 10 minutos para a separação das frações solúvel e insolúvel. A fração insolúvel foi ressuspensa em 8 mL de TBE. Foram adicionados inibidor de protease PMSF e E64 em todas as frações.

A proteína foi purificada a partir da fração insolúvel por gel preparativo de poliacrilamida 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 induzidas, induzidas e eluídas foram analisadas por gel SDS-PAGE com poliacrilamida 12% (LAEMMLI, 1970). A determinação da concentração da proteína Act4 foi estimada pelo método de Bradford 1976.

4.5.2 Obtenção do extrato protéico de *T. cruzi*

O extrato protéico 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 ressuspensas em uma concentração final de 10⁶ parasitas/mL em tampão de amostra [Tris HCl 40 mM, SDS 1%, β-mercaptoetanol 2,5%, Glicerol 6%, azul de bromofenol 0,005% e coquetel de inibidor de proteases (Sigma®) em PBS].

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

4.5.3 Western blot

Western blot foi realizado de acordo com protocolo de Towbin e colaboradores (1979) com modificações. A proteína recombinante actina 4 ou o extrato lisado de *T. cruzi*, na concentração de 5×10^6 células/poço, foi separado por SDS-PAGE e transferido para uma membrana de nitrocelulose de 0,5 μ m. A membrana foi bloqueada com solução de bloqueio (PBS/Tween 0,05% pH 8,0 + leite desnatado 4%). Após o bloqueio a membrana foi lavada por 3 vezes com PBS/Tween 0,05% pH 8,0 e incubada com o anticorpo primário diluído em solução de bloqueio por uma hora a temperatura ambiente. Após esse tempo a membrana foi lavada por 3 vezes com PBS/Tween 0,05% pH 8,0, incubada com o anticorpo secundário diluído na solução de bloqueio por 1 hora à temperatura ambiente e lavada por 3 vezes com PBS/Tween 0,05% pH 8,0. A membrana foi revelada por quimioluminescência pela atividade da peroxidase.

4.6 OBTENÇÃO DO SORO POLICLONAL E ANTICORPO MONOCLONAL

4.6.1 Obtenção do soro policlonal contra actina 4

Para a obtenção de soro policlonal, 3 camundongos albinos BALB/c (30 a 45 dias de vida) foram inoculados com um peptídeo contendo 14 aminoácidos (VEGTGDGVGGGDGA), correspondendo a uma região específica não conservada da sequência da actina 4 (ID Tc00.1047053511463.4) de *T. cruzi*, obtidos comercialmente (Genscript) conjugado à proteína KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*).

Antes das imunizações, foi retirado o soro pré-imune da veia caudal de todos os animais. Os camundongos foram imunizados com uma solução contendo 50 μ g do peptídeo e 77 μ L de adjuvante hidróxido de alumínio gel, por via intraperitoneal. Foram realizados quatro inóculos com intervalo de duas semanas cada. O último inóculo foi realizado por via intravenosa sem a presença do adjuvante. Três dias após o último inóculo, o sangue dos animais foi coletado por punção cardíaca, centrifugado por 5 minutos a 2.000 g, e coletado o soro policlonal. O soro foi aliquoteado e mantido em freezer a -70 °C.

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

4.6.2 Análise de especificidade do soro

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

4.6.3 Obtenção de anticorpos monoclonais

Os baços dos camundongos previamente imunizados (e previamente sangrados para a obtenção de soro policlonal contra a actina 4) foram retirados para obtenção de linfócitos B. Os linfócitos B e células de mieloma foram fusionados utilizando polietilenoglicol (PEG) de acordo com o protocolo de Phillips (1973). Para isto os baços foram 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 filtragem o volume foi completado com RPMI para 50 mL e centrifugado por 10 minutos a 0,5 g. O sobrenadante foi descartado e ressuspenso em RPMI com solução de lise (Cloreto de amônia gelado) e incubado por 5 minutos no gelo. A solução foi centrifugada a 0,5 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 ressuspenso em 10 mL de RPMI. As células foram contadas e colocadas numa proporção de 1:5 de mieloma e esplenócitos, centrifugadas por 10 minutos a 0,5 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. A essa solução também foi adicionado mais 9 mL de RPMI. A solução foi centrifugada novamente e o *pellet* foi ressuspenso em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (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, Aminopterina e Timidina) por poço. 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.

Após as células atingirem uma confluência de dois terços do fundo do poço, foi realizada a identificação dos anticorpos de interesse pelo método de ELISA (MAZZAROTTO, 2009). Para isto, a proteína actina 4 recombinante foi utilizada para a sensibilização das placas de ELISA. A proteína foi ressuspensa em tampão de sensibilização (NaCO_3 0,16 %, NaHCO 0,28 % pH 9,6) em concentrações decrescentes de 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 e 0,612 μg por poço, 100 μL de suspensão protéica foi adicionada por poço em placa de 96 poços, e incubada a 4 °C por 16 horas. Após esse período, as placas foram lavadas 5 vezes com tampão PBS/Tween 20 0,01%. Às placas foi adicionado 100 μL de tampão de bloqueio (PBS + 5% de leite em pó desnatado) por poço e incubados por 30 minutos a temperatura ambiente. As placas foram lavadas 5 vezes com 200 μL por poço com 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-IgG de camundongo conjugado à peroxidase a uma diluição de 1:1200, diluído em tampão de bloqueio. As placas foram incubadas por 45 minutos a 37 °C. Após a incubação as placas 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. Foi adicionado então 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 que secretarem os anticorpos de interesse 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.

4.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE ACTINA 4

O perfil de expressão da actina 4 será analisado em ensaios de *Western blot*, onde extratos protéicos de *T. cruzi*, obtidos a partir das diferentes formas de desenvolvimento do parasita, serão fixados em membrana de nitrocelulose e então incubados com soro policlonal ou anticorpos monoclonais (purificados) contra actina 4 e revelados pela atividade da peroxidase.

4.8 IMUNOLocalização POR IMUNOFLORESCÊNCIA

Para os ensaios de imunofluorescência, os parasitas foram fixados em formaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,2 por 30 minutos e depositados em lamínulas tratadas com poli-L-lisina. Após 30 minutos de incubação, as lamínulas foram lavadas três vezes por 10 minutos (cada lavagem) com PBS e incubadas por 5 minutos com Triton X-100 a 0,1% diluído em PBS à temperatura ambiente. As lamínulas foram novamente lavadas com PBS e incubadas em solução de bloqueio (PBS pH 8,0 + BSA 3%) por uma hora a temperatura ambiente. A solução de bloqueio foi retirada e o anticorpo primário de interesse diluído em solução de bloqueio foi incubado por 1 hora. As lâminas foram lavadas com solução de bloqueio por 3 vezes de 10 minutos cada, e incubadas por uma hora com o anticorpo secundário de interesse conjugado ao fluorocromo Alexa-Fluor (Sigma®), na diluição 1:600 em solução de bloqueio. As lâminas foram lavadas com solução de bloqueio por 3 vezes de 10 minutos cada, posteriormente com PBS por 3 vezes de 10 minutos cada. O corante de DNA Hoechst 33258 foi adicionado e incubado por 20 minutos. As lâminas foram lavadas em água e montadas com o reagente *Prolong® Gold antifade* sobre uma lamínula de microscopia ótica, e observadas em microscópio de epifluorescência com sistema de deconvolução.

5. RESULTADOS

Trabalhos anteriores que mostraram a localização celular e expressão da actina nas diferentes formas de *Trypanosoma cruzi*, utilizaram soro policlonal obtido de camundongos imunizados com a proteína actina 1. Devido à grande similaridade entre todas as proteínas actina de *T. cruzi*, é possível que este soro esteja reconhecendo mais de uma isoforma simultaneamente. Assim, para a caracterização específica de cada uma destas actinas, se torna indispensável a obtenção de ferramentas que possam identificar cada isoforma de maneira individual. Dentro deste contexto, o presente trabalho pretende elucidar questões referentes à biologia celular de *T. cruzi* quanto à localização, possível função e expressão diferenciada da actina 4 nas diferentes formas de desenvolvimento do parasita. Para isso, duas abordagens distintas, porém complementares estão sendo utilizadas. Primeiramente foram obtidos parasitas transfectantes expressando a actina 4 fusionada a uma etiqueta comercial, para posterior imunolocalização subcelular em formas epimastigotas. Futuramente, a imunoprecipitação desta proteína recombinante também permitirá a análise das proteínas a ela associadas por meio de espectrometria de massa. Outra abordagem será a produção de anticorpo monoclonal que permitirá a análise da expressão e localização subcelular da proteína nos diferentes estágios evolutivos do parasita, a fim de corroborar e complementar os resultados obtidos nas formas epimastigotas.

5.1 CONTRUÇÃO DO PLASMÍDEO PARA A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA actina 4

Para a imunização dos animais e posterior obtenção do soro policlonal e anticorpo monoclonal, foram utilizados peptídeos conjugados a KLH (conforme o item 4.6 em Material e Métodos), afim de obter uma resposta específica contra a actina 4. Uma vez que durante uma posterior triagem dos anticorpos monoclonais por ELISA não seria possível determinar quais clones estariam reconhecendo a sequência de peptídeos da actina e os que estariam reconhecendo KLH (apenas peptídeos conjugados à KLH foram obtidos), foi

realizada a expressão heteróloga em bactéria da actina 4 para ser utilizada na sensibilização das placas de ELISA. Para isto, o gene *act4* foi primeiramente clonado em vetor próprio para a ligação de fragmentos de *attB* PCR (pDONR221), originando o plasmídeo pDONRact4. Este plasmídeo foi sequenciado para a confirmação da identidade dos insertos (dado não mostrado), e o gene *act4* foi subclonado em vetor de superexpressão pDEST17 através da plataforma Gateway®. O vetor pDEST17 contendo o inserto foi transformado na estirpe DH5α de *E. coli* dando origem ao plasmídeo pDEST17act4. Colônias resistentes ao antibiótico ampicilina foram crescidas em meio LB líquido para a extração do DNA plasmidial. A confirmação da clonagem foi realizada por PCR de colônia com os oligonucleotídeos iniciadores *act4pDEST17for* x *act4pDEST17rev* (Figura 4).

O tamanho esperado para a actina 4 (aproximadamente 1340 pb) foi compatível com o tamanho das bandas amplificadas, tendo sido positivas todas as colônias testadas. A colônia 1 foi escolhida para amplificação e extração do plasmídeo que foi transformado na bactéria *E. coli* Rosetta-gami 2 para expressão heteróloga e posterior purificação da proteína actina 4. Esta estirpe foi escolhida por apresentar como características a expressão de sete tRNAs para códons raros, além de formar pontes dissulfeto. A identidade do inserto foi confirmada por sequenciamento (dado não mostrado).

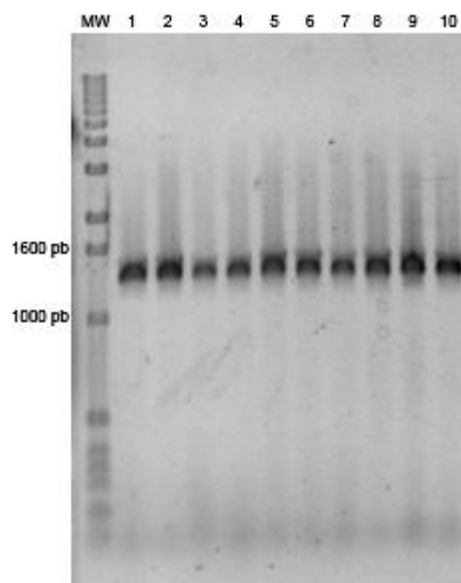


Figura 4: PCR de colônia. PCR das colônias transformantes de DH5α de *E. coli* contendo o plasmídeo pDEST17act4 utilizando o par de oligonucleotídeos iniciadores *act4pDEST17for* x *act4pDEST17rev* que amplifica um produto de 1343 pb. (MW) Marcador de peso molecular 1 Kb; (1) Controle positivo com DNA genômico de *T. cruzi*; (2 – 10) Colônias transformantes.

Após a indução da Act4 foi verificado que a proteínas encontravam-se na fração insolúvel. As proteínas foram purificadas a partir dos extratos insolúveis por gel preparativo e a banda correspondente a proteína foi eluída com tampão TBE por três vezes, durante 24 horas cada, a 4 °C. Todas as frações foram analisada em gel SDS-PAGE com poliacrilamida 12% (Figura 5).

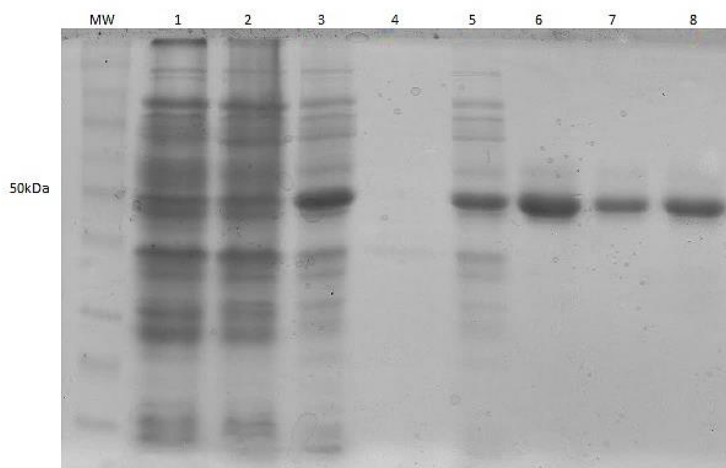


Figura 5: Gel SDS-Page 12 % das frações de actina 4. (MW) Marcados de peso molecular ; (1) Extrato de *E. coli* Rosetta-gami 2; (2) Extrato bruto não induzido; (3) Fração total induzida; (4) Fração solúvel; (5) Fração insolúvel, (6) Eluído 1; (7) Eluído 2; (8) Eluído 3.

Para confirmar a presença da proteína de interesse, todas as frações foram submetidas à *Western blot* utilizando anticorpo primário contra histidina, uma vez que a proteína heteróloga foi fusionada a uma cauda de histidina. Assim como observado no gel SDS-PAGE (Figura 5), tanto as frações insolúveis quanto os eluídos a partir de gel preparativo revelaram a presença da proteína, enquanto que na fração solúvel nenhuma banda foi observada (Figura 6).

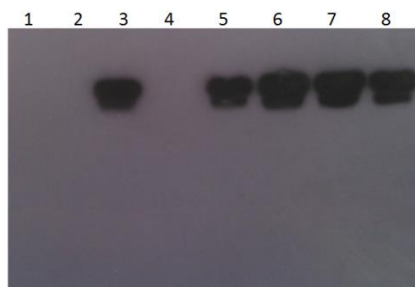


Figura 6: Confirmação da presença da Actina 4 recombinante na fração insolúvel e nos eluídos através de ensaio de *Western Blot* utilizando anticorpos anti-histidina. As frações foram fixadas em membrana de nitrocelulose, incubadas com anticorpo monoclonal anti-histidina e reveladas pela atividade da fosfatase alcalina. (1) Extrato de *E. coli* ROSETA gami2; (2) Extrato bruto não induzido; (3) Fração total induzida; (4) Fração solúvel; (5) Fração insolúvel, (6) Eluido 1; (7) Eluido 2; (8) Eluido 3.

A proteína purificada foi armazenada a -20 °C e está sendo utilizada para a sensibilização de placas de ELISA para triagem dos anticorpos monoclonais.

5.2 CONSTRUÇÃO DO CASSETE PARA MUTAGÊNESE

5.2.1 Construção do cassete pNFact4RH_Cter+Down

Para a obtenção dos parasitas transfectantes com uma das cópias do gene da actina 4 fusionada a etiqueta comercial FLAG, foi construído um cassete para recombinação homóloga, contendo a porção final (últimos 535 pb) do gene da actina 4 fusionada à etiqueta Flag na posição carboxi-terminal, e a região intergênica *downstream* (590pb) (vetor pNFact4RH_Cter+Down). Esse cassete foi construído em duas etapas.

Primeiramente, a sequência final do gene da actina 4, correspondente aos últimos 535 nucleotídeos foi amplificada por PCR e inserida no vetor via plataforma Gateway®. Paralelamente, a porção *downstream* do gene *act4* foi também amplificada por PCR. As reações de PCR foram realizadas com os oligonucleotídeos *act4RH_CterFor* x *act4rev* (*act4*), e *act4DownFor* x *act4DownRev* (*downstream*). As condições das PCRs foram: desnaturação inicial 95 °C por 4 minutos, desnaturação 95 °C por 30 segundos, anelamento 57 °C por 30 segundos, extensão 72 °C por 30 segundos, extensão final por 4 minutos. Os produtos das ampliações estão mostrados na Figura 7.

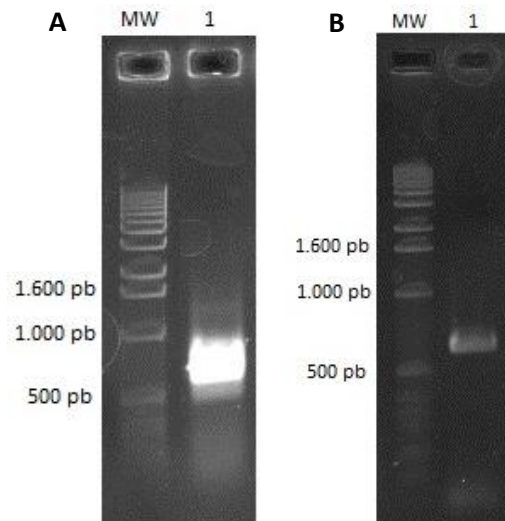


Figura 7: PCR da porção final do gene da actina 4 e da região *downstream*. (A) PCR da porção final do gene da actina 4 com os oligonucleotídeos iniciadores *act4RH_CterFor* x *act4Rev* (amplifica 535 nucleotídeos); (B) PCR da região *downstream* do gene da actina 4 com os oligonucleotídeos iniciadores *act4DownFor* x *act4DownRev* (amplifica 590 nucleotídeos). (MW) Marcador de peso molecular 1 Kb.

Após a ligação da sequência final do gene *act4* ao vetor de entrada pDONR221 (Figura 8) e subclonagem no vetor contendo a etiqueta comercial FLAG (Figura 9), foi obtido o plasmídeo pNFact4RH_Cter (contém a sequência final do gene *act4*), que foi então ligado ao produto purificado da PCR da região *downstream* (Figura 7-B). A ligação foi realizada pela digestão do vetor e do inserto com as enzimas *Hind* III / *Xba* I, conforme descrito no item 4.4.5. Após ligar os 2 fragmentos, o vetor resultante foi transformado na bactéria *E. coli* DH5 α originando o plasmídeo pNFact4RH_Cter+Down. Para a triagem das colônias positivas foi realizada a técnica de *toothpick* e PCR de colônia (Figura 10). As condições das PCRs foram as mesmas acima descritas.

A colônia positiva 4 foi escolhida para expansão e purificação do plasmídeo, que foi então linearizado pela digestão com as enzimas *EcoRV*/*Hind*III (Figura 11) para a obtenção do cassete de transfecção para recombinação homóloga. A figura 12 mostra um mapa do cassete usado na transfecção.

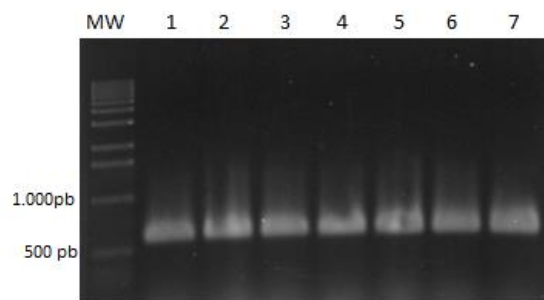


Figura 8: PCR de colônia. PCR das colônias transformantes de DH5 α de *E. coli* pDONR*act4C_ter* com os oligonucleotídeos iniciadores *act4RH_CterFor* x *act4Rev* (amplifica 535 nucleotídeos). (MW) Marcador de peso molecular 1 Kb; (1) Controle positivo com DNA genômico de *T. cruzi*; (2 – 7) Colônias transformantes 1 a 6.

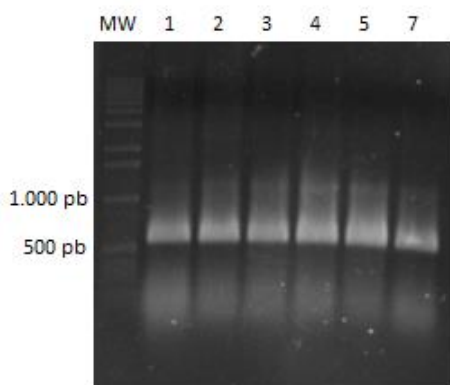


Figura 9: PCR de colônia. PCR das colônias transformantes de DH5 α de *E. coli* pTcNeoFLAG-*act4* com os oligonucleotídeos iniciadores *act4RH_CterFor* x *act4Rev* (amplifica 535 nucleotídeos). (MW) Marcador de peso molecular 1 Kb; (1) Controle positivo com DNA genômico de *T. cruzi*; (2 – 7) Colônias transformantes 1 a 6.

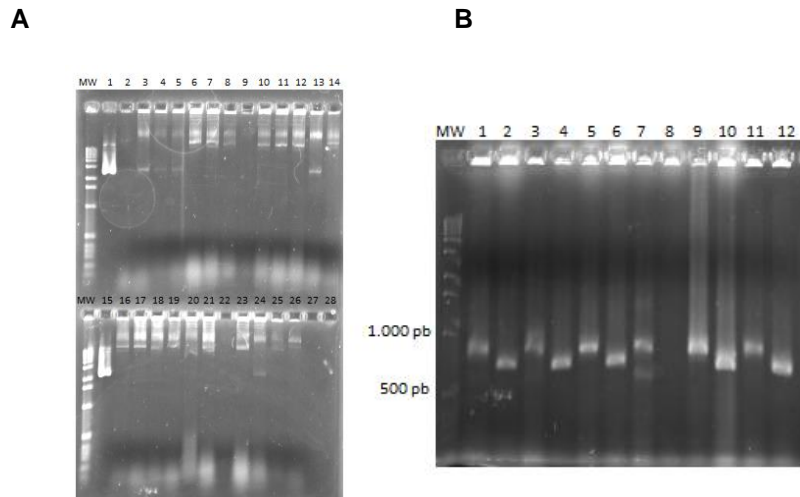


Figura 10: Triagem das colônias positivas contendo o plasmídeo pNFact4+Down. (A) *Toothpick* das colônias transformantes de *E. coli* DH5 α pNFact4RH_Cter+Down 1 à 28. (B) PCR das colônias transformantes de *E. coli* DH5 α pNFact4RH_Cter+Down, números ímpares com a combinação de oligonucleotídeos iniciadores *act4RHfor* x *intg1 R'* (amplifica 813 nucleotídeos) e números pares com a combinação de oligonucleotídeos iniciadores *Intg2F'* x *act4Downrev* (amplifica 654 nucleotídeos). (1) e (2) Colônia 2; (3) e (4) Colônia 3; (5) e (6) Colônia 4; (7) e (8) Colônia 12; (9) e (10) Colônia 13; (11) e (12) Colônia 22. (MW) Marcador de peso molecular 1 Kb.

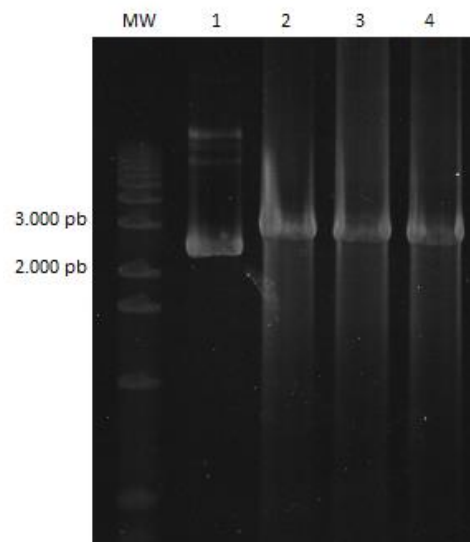


Figura 11: Linearização do plasmídeo pNFact4RH_Cter+Down por digestão com as enzimas *EcoRV/HindIII*. (MW) Marcador de peso molecular 1 Kb; (1) Plasmídeo não digerido; (2 – 4) Produto da digestão após 2h (aproximadamente 3.000 pb).

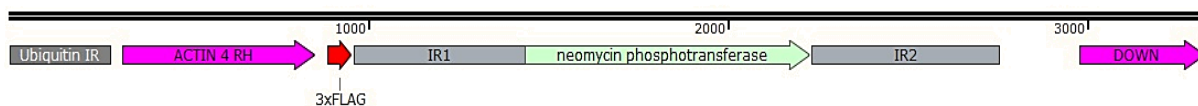


Figura 12: Mapa do cassete de transfecção para recombinação homóloga. O cassete possui o fragmento final do gene da actina 4 fusionado à etiqueta Flag na posição C-terminal, o gene de resistência a neomicina e um fragmento *downstream* do gene da *act4*

O cassete foi transfectado em formas epimastigostas de *T. cruzi* Dm28c, pelo método da eletroporação, para a indução da recombinação integrativa no DNA genômico do parasita. No entanto, após a morte dos parasitas controle e consequente seleção dos parasitas contendo o cassete, não foi possível confirmar o lócus correto da recombinação por PCR. Também não foi possível imunolocalizar a etiqueta FLAG nem por *Wester blot* nem por imunofluorescência.

Uma nova transfecção foi realizada e novamente não foi possível confirmar a recombinação, desta forma passou-se então para as construções epissomais, embora uma nova transfecção deste cassete esteja em andamento.

5.3 CONSTRUÇÃO DOS VETORES EPISSOMAIS

Como metodologia alternativa aos cassetes para recombinação homóloga, cuja eficiência em *T. cruzi* é muito baixa, construções epissomais também foram produzidas. As construções epissomais possuem um promotor específico de *T. cruzi* seguido pela sequência completa do gene *act4* fusionada à etiqueta FLAG na posição amino ou carboxi-terminal, ou à etiqueta GFP na posição carboxi-terminal.

Embora vetores epissomais possam levar à super-expressão da proteína recombinante, esta metodologia possui como vantagens a facilidade na construção do vetor e maior probabilidade de obtenção de parasitas geneticamente modificados após a seleção com antibióticos.

5.3.1 Construção dos vetores pNFact4Epi_Cter e pNFact4Epi_Nter

Os vetores episossomais pNFact4Epi_Cter e pNFact4Epi_Nter foram construídos utilizando a plataforma Gateway®. Para isto, a sequência completa do gene *act4* foi clonada em vetor de entrada pDONR221 e posteriormente subclonada em dois vetores distintos, o vetor pTcNeo_3xFLAG_C-1 cuja etiqueta FLAG encontra-se na posição carboxi-terminal, e o vetor pTcGW_FLAG_N, cuja etiqueta FLAG encontra-se na posição amino-terminal. O gene *act4* foi amplificado por PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores *act4For* x *act4Rev*. As condições da PCR foram: desnaturação inicial a 95 °C por 4 minutos, desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 57 °C por 30 segundos, extensão a 72 °C por 1 minuto e 30 segundos (estas três últimas etapas foram repetidas 30 vezes), e extensão final a 72 °C por 4 minutos. O produto da PCR foi inserido no vetor pDONR221, transformado na bactéria *E. coli* DH5α (Figura 13), crescida em placa contendo o antibiótico de seleção estreptomicina, e após purificação obteve-se o plasmídeo pDONR*act4*.

O gene foi subclonado em dois vetores distintos, pTcNeo_3xFLAG_C-1 e pTcGW_FLAG_N, posteriormente transformados na bactéria *E. coli* DH5α, crescida em placa contendo o antibiótico de seleção canamicina, e após purificação dos plasmídeos obteve-se os vetores episossomais pNFact4Epi_Cter (Figura 14) e pNFact4Epi_Nter (Figura 15), respectivamente. Estas construções foram confirmadas por PCR e sequenciamento.

As figuras 16 e 17 mostram os mapas dos vetores pNFact4Epi_Cter (para expressão da actina 4 fusionada à Flag na porção C-terminal) e pNFact4Epi_Nter (para expressão da actina 4 fusionada à Flag na porção N-terminal), respectivamente.

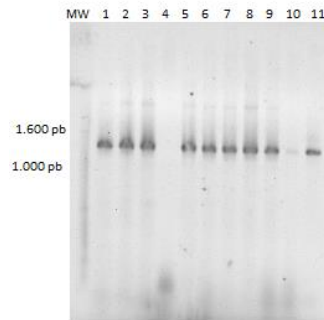


Figura 13: PCR de colônia dos transformantes para pDONRact4. PCR das colônias transformantes de DH5 α de *E. coli* contendo o vetor pDONRact4C_ter com os oligonucleotídeos iniciadores act4For x act4Rev (amplifica 1340 nucleotídeos). (MW) Marcador de peso molecular 1 Kb; (1 – 10) Colônias transformantes; (11) Controle positivo com DNA genômico de *T. cruzi*.

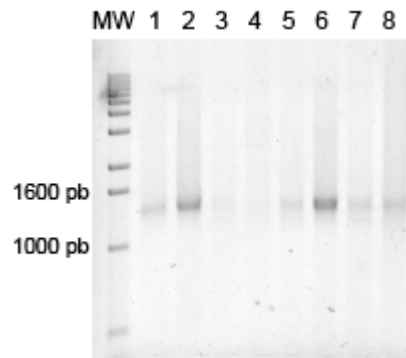


Figura 14: PCR de colônia dos transformantes para pNFact4Epi_Cter. PCR das colônias transformantes de DH5 α de *E. coli* contendo o vetor pNFact4Epi_Cter com os oligonucleotídeos iniciadores act4For x act4Rev (amplifica 1340 nucleotídeos). (MW) Marcador de peso molecular 1 Kb; (1 – 8) Colônias transformantes.

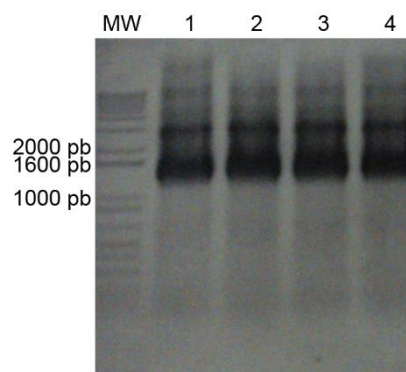


Figura 15: PCR de colônia dos transformantes para pNFact4Epi_Nter. PCR das colônias transformantes de DH5 α de *E. coli* contendo o vetor pNFact4Epi_Nter com os oligonucleotídeos iniciadores act4For x act4Rev (amplifica 1340 nucleotídeos). (MW) Marcador de peso molecular 1 Kb; (1 – 4) Colônias transformantes.

Após a purificação dos plasmídeos e obtenção dos vetores episossomais pNFact4Epi_Cter e pNFact4Epi_Nter, estes foram transfectados separadamente em formas epimastigotas de *T. cruzi*. Cerca de 20 µg dos vetores foram utilizados por transfecção. Após a morte do controle, foi feita a extração do DNA do parasita e realizada a confirmação da presença do vetor por PCR com combinações de oligonucleotídeos iniciadores que anelam no vetor e na sequência da actina 4. As condições da PCR foram: desnaturação inicial a 95 °C por 4 minutos, desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 60 °C por 30 segundos, extensão a 72 °C por 2 minutos (estas três últimas etapas foram repetidas 30 vezes), e extensão final a 72 °C por 4 minutos.

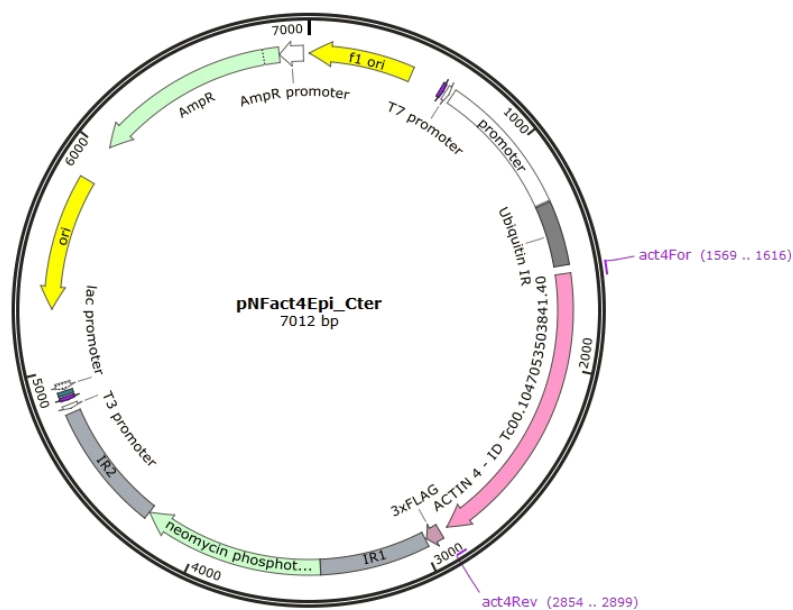


Figura 16: Mapa do vetor pNFact4Epi_Cter. O vetor contém promotor, a sequência codificadora completa do gene *act4* de *T. cruzi* fusionada a etiqueta FLAG na porção C-terminal e o gene de resistência ao antibiótico neomicina.

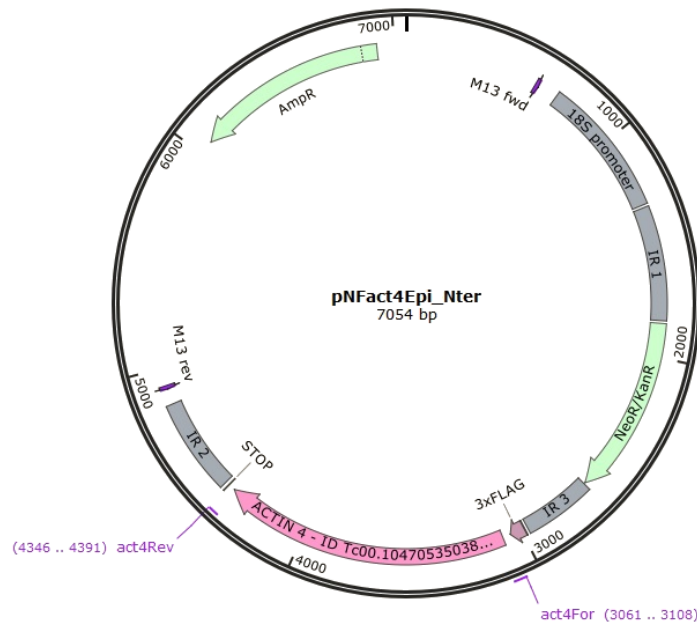


Figura 17: Mapa do vetor pNFact4Epi_Nter. O vetor contém o promotor 18S, a sequência codificadora completa do gene *act4* de *T. cruzi* fusionada a etiqueta FLAG na porção N-terminal e o gene de resistência ao antibiótico neomicina.

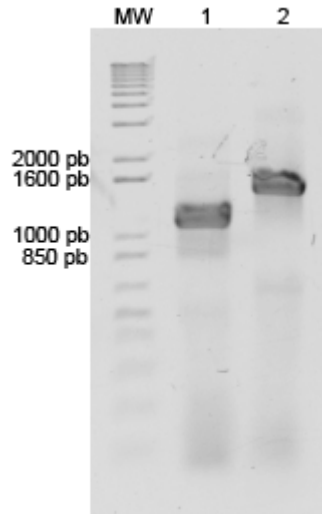


Figura 18: PCR de *T. cruzi* transfectado com pNFact4Epi_Cter. PCR de *T. cruzi* transfectado com pNFact4Epi_Cter com oligonucleotídeos iniciadores que anelam no vetor e na actina recombinante. (MW) Marcador de peso molecular 1 Kb plus; (1) NeoOutRev x *act4RH_CterFor* (amplifica 1182 nucleotídeos); (2) *act4For* x IR1_GWrev (amplifica 1557 nucleotídeos).

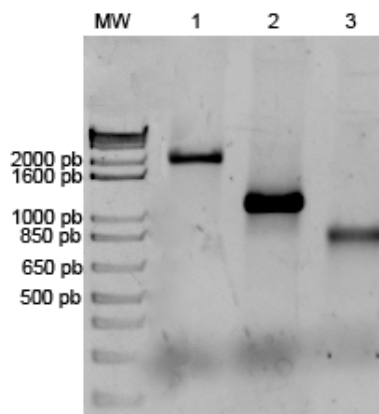


Figura 19: PCR de *T. cruzi* transfectado com pNFact4Epi_Nter. PCR de *T. cruzi* transfectado com pNFact4Epi_Nter com oligonucleotídeos iniciadores que anelam no vetor e na actina recombinante. (MW) Marcador de peso molecular 1 Kb plus; (1) Neo Out F' x *act4*Rev (amplifica 1955 nucleotídeos); (2) NeoOutFor x *act4*RH_NterRev (amplifica 1177 nucleotídeos); (3) IR1_GWrev x *act4*RH_CterFor (amplifica 728 nucleotídeos).

Ambas as construções foram confirmadas por PCR (Figuras 18 e 19). Foi obtido então o extrato protéico dos parasitas para a confirmação da presença da actina recombinante através de ensaio de *Western blot* utilizando anticorpo anti-Flag. A presença da actina 4 fusionada a etiqueta Flag C-terminal (Figura 20) e N-terminal (Figura 21) foi confirmada. Os tamanhos foram compatíveis com os tamanhos esperados de 50,6 kDa para actina 4 com Flag C-terminal, e 51,2 kDa para actina 4 com Flag N-terminal.



Figura 20: Confirmação da construção pNFact4Epi_Cter por *Western blot*. *Western blot* de extrato de formas epimastigotas de *T. cruzi* transfectados com o vetor pNFact4Epi_Cter. As proteínas do extrato foram separadas por gel SDS-PAGE 12 %, fixadas em membrana de nitrocelulose, incubadas com anticorpo anti-FLAG e reveladas pela atividade da fosfatase alcalina. (1) Extrato de epimastigotas de *T. cruzi* transfectados com o vetor pNFact4Epi_Cter. (2) Extrato de epimastigota tipo selvagem.

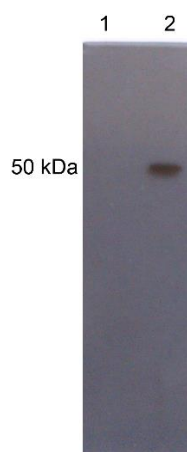


Figura 21: Confirmação da construção pNFact4Epi_Nter por Western blot. Western blot de extrato de formas epimastigota de *T. cruzi* transfectados com o vetor pNFact4Epi_Nter. As proteínas do extrato foram separadas por gel SDS-PAGE 12 %, fixadas em membrana de nitrocelulose, incubadas com anticorpo anti-FLAG e reveladas pela atividade da fosfatase alcalina. (1) Extrato de epimastigota tipo selvagem. (2) Extrato de epimastigota de *T. cruzi* transfectados com o vetor pNFact4Epi_Nter.

5.3.2 Construção do vetor pNGFPact4Epi_Cter

O vetor episomal contendo a etiqueta GFP foi construído utilizando a plataforma Gateway®. Para isto, a sequência completa do gene *act4* foi clonada em vetor de entrada pDONR221 e, posteriormente, subclonada no vetor pTcNeo_GFP_C-1 cuja etiqueta GFP encontra-se na posição carboxi-terminal.

Este vetor possui como vantagem em relação aos outros vetores episomais, o fato de a etiqueta GFP (*green fluorescent protein*) ser uma proteína auto-fluorescente, sendo assim possível a observação direta da sua localização subcelular *in vivo*, sem a necessidade da utilização de anticorpos para sua visualização (embora possa ser utilizado um anticorpo anti-GFP para a amplificação do sinal).

Para esta construção, o gene *act4* que havia sido previamente clonado no vetor pDONR221 (descrito no item anterior 5.3.1), originando o plasmídeo pDONRact4, foi subclonado no vetor pTcNeo_GFP_C-1, transformado na bactéria *E. coli* DH5 α , crescida em placa contendo o antibiótico de seleção canamicina, e após purificação do plasmídeo obteve-se o vetor episomal pNGFPact4Epi_Cter (Figura 22). Esta construção foi confirmada por PCR e

sequenciamento. As condições da PCR foram: desnaturação inicial a 95 °C por 4 minutos, desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 57 °C por 30 segundos, extensão a 72 °C por 1 minuto e 30 segundos (estas três últimas etapas foram repetidas 30 vezes), e extensão final por 4 minutos. A figura 23 mostra o mapa do vetor pNGFPact4Epi_Cter.

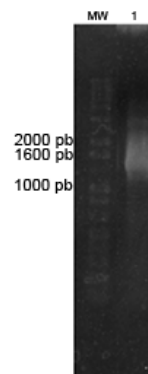


Figura 22: PCR de colônia dos transformantes para pNGFPact4Epi_Cter. PCR das colônias transformantes de DH5α de *E. coli* pNGFPact4Epi_Cter com os oligonucleotídeos iniciadores *act4For* x *act4Rev* (amplifica 1340 nucleotídeos). (MW) Marcador de peso molecular 1 Kb; (1) Colônia transformante.

Após a purificação dos plasmídeos e obtenção do vetor epissomal pNGFPact4Epi_Cter, este foi transfectado em formas epimastigotas de *T. cruzi*. Cerca de 20 µg do vetor foi utilizado para a transfecção. Após a morte do controle, foi feita a extração do DNA do parasita e realizada a confirmação da presença do vetor por PCR com combinações de oligonucleotídeos iniciadores que anelam no vetor e na sequência da actina 4 (Figura 24). As condições da PCR foram: desnaturação inicial a 95 °C por 4 minutos, desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 30 segundos, extensão a 72 °C por 2 minutos (estas três últimas etapas foram repetidas 30 vezes), e extensão final por 4 minutos.

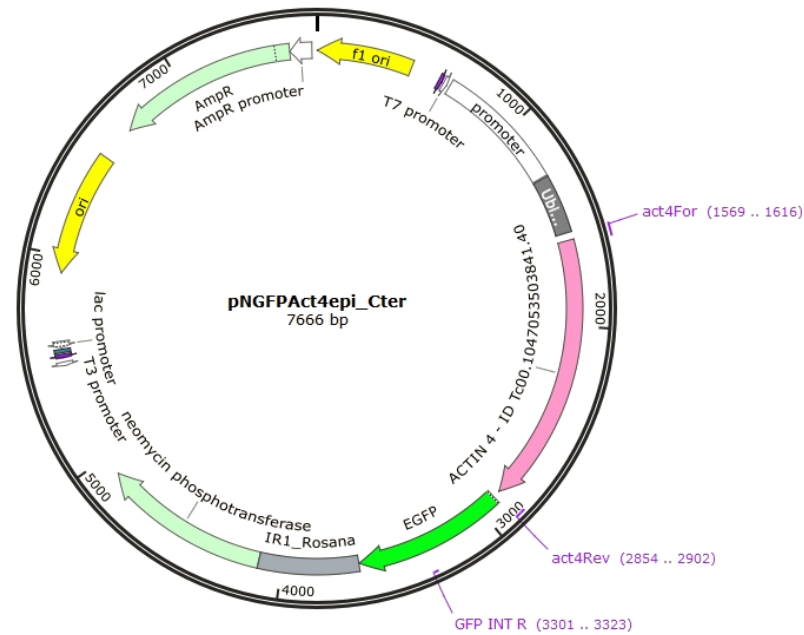


Figura 23: Mapa do vetor pNGFPact4Epi_Cter. O vetor contém promotor, a sequência codificadora completa do gene *act4* de *T. cruzi* fusionada a etiqueta GFP na porção C-terminal e o gene de resistência ao antibiótico neomicina.

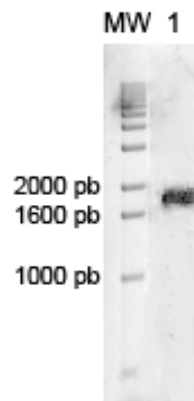


Figura 24: PCR de *T. cruzi* transfectado com pNGFPact4Epi_Cter. PCR de *T. cruzi* transfectado com pNGFPact4Epi_Cter com oligonucleotídeos iniciadores que anelam no vetor e na actina recombinante. (MW) Marcador de peso molecular 1 Kb; (1) *act4RH_CterFor* x *GFPirev* (amplifica 1760 nucleotídeos);

A confirmação da expressão da actina 4 fusionada à GFP foi realizada por *Western blot* utilizando anticorpo anti-GFP. O tamanho foi compatível com

esperado, de aproximadamente 77 kDa (50 kDa da actina 4 e 26,7 kDa do GFP) (Figura 25).

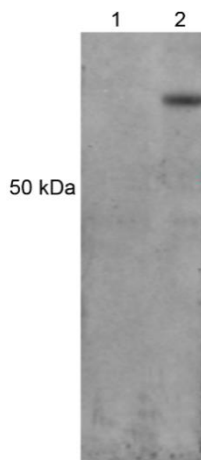


Figura 25: Confirmação da construção pNGFPact4Epi_Cter por *Western blot*. *Western blot* de extrato de formas epimastigota de *T. cruzi* transfectados com o vetor pNGFPact4Epi_Cter. As proteínas do extrato foram separadas por gel SDS-PAGE, fixadas em membrana de nitrocelulose, hibridizadas com anticorpo anti-GFP e reveladas pela atividade da fosfatase alcalina. (1) Extrato de epimastigota tipo selvagem. (2) Extrato de formas epimastigota de *T. cruzi* transfectados com o vetor pNGFPact4Epi_Cter.

5.4 OBTENÇÃO DO SORO POLICLONAL E TESTE DE ESPECIFICIDADE

Para a obtenção do soro policlonal, 3 camundongos foram inoculados com peptídeo obtido comercialmente (Genscript®) contendo 14 aminoácidos correspondendo a uma região específica não conservada da sequência da actina 4 (ID Tc00.1047053511463.4) de *T. cruzi*, conjugado à proteína KLH. O reconhecimento da proteína actina 4 pelo soro imune foi testado por *Western blot* e *Dot blot*. Para o *Western blot*, o extrato lisado de epimastigotas foi separado por SDS-PAGE e transferido para uma membrana de nitrocelulose e testado contra o soro policlonal da actina 4 na diluição 1:500. Como controle positivo foi utilizado o soro policlonal contra dinamina (Gonçalves, dados não publicados), uma proteína GTPase que participa da formação de vesículas, com peso molecular de aproximadamente 73 kDa. Os tamanhos observados foram compatíveis com o tamanho da actina 4 e da dinamina. Já para o *Dot blot*, 500 ng da actina 4 recombinante foi usada para impregnar uma membrana de nitrocelulose (sob vácuo) e, posteriormente, testada contra três concentrações

do soro policlonal, 1:1000, 1:2000 e 1:3000. Como controle negativo da reação foi utilizado o soro pré-imune na concentração de 1:1000 e como controle positivo foi utilizado soro contra cruzipaína (BATISTA et al., 2014) (Figura 26).

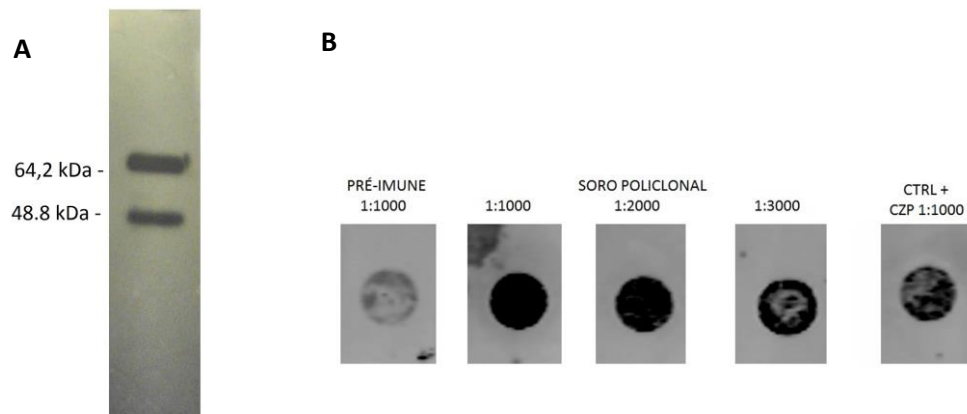


Figura 26: Confirmação do reconhecimento da actina 4 pelo soro policlonal. (A) *Western blot* de extrato de formas epimastigota de *T. cruzi*. As frações foram fixadas em membrana de nitrocelulose, hibridizadas com soro policlonal contra actina 4 de *T. cruzi* e reveladas pela atividade da fosfatase alcalina. A banda de baixo corresponde à actina 4 (peso molecular 45.9 kDa) e a banda de cima corresponde à dinâmina (peso molecular 72,9 kDa). (B) *Dot blot* com 500 ng da actina 4 recombinante. Lane 1, soro pré-imune na diluição 1:1000; Lane 2, soro imune na diluição 1:1000; Lane 3, soro imune na diluição 1:2000; Lane 4, soro imune na diluição 1:3000; Lane 5, controle positivo com 500 ng de cruzipaína recombinante e soro policlonal anti-cruzipaína na diluição 1:1000.

A especificidade no reconhecimento da actina 4 foi testada por *Dot blot*, onde 500 ng das proteínas recombinantes actina 4, actina 2 (isoforma exclusiva de *T. cruzi*) e actina 1 (isoforma mais conservada de *T. cruzi*) foram usadas para impregnar uma membrana de nitrocelulose (sob vácuo) e posteriormente testadas contra o soro policlonal na concentração de 1:1000. Somente a lane 6 contendo a actina 4 recombinante foi positiva (Figura 27).

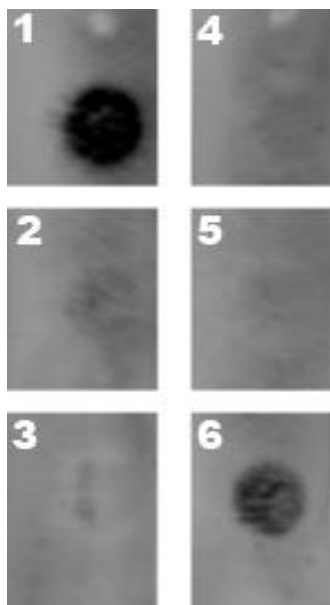


Figura 27: Teste de especificidade do soro policlonal contra actina 4. *Dot blot* com 500 ng das proteínas recombinantes purificadas actina 1, 2 e 4 testadas contra o soro policlonal da actina 1 e 4 na diluição de 1:1000. (1) Proteína actina 1 recombinante testada contra o soro da actina 1 (controle positivo); (2) Proteína actina 2 recombinante testada contra o soro da actina 1; (3) Proteína actina 4 recombinante testada contra o soro da actina 1; (4) Proteína actina 1 recombinante testada contra o soro da actina 4; (5) Proteína actina 2 recombinante testada contra o soro da actina 4; (6) Proteína actina 4 recombinante testada contra o soro da actina 4.

Os três animais imunizados foram sacrificados e os baços foram retirados para a fusão com células de mieloma, para posterior obtenção dos hibridomas. Após uma primeira tentativa de fusão, as culturas apresentaram contaminação durante a fase de seleção de hibridomas e foram descartadas. Desta forma, outros três animais foram novamente imunizados para uma segunda tentativa de fusão. No entanto, este processo ainda está em andamento.

5.5 IMUNOLOCALIZAÇÃO

A localização subcelular da actina 4 em formas epimastigotas de *T. cruzi* foi determinada por imunofluorescência indireta com o soro policlonal na diluição 1:100 e anticorpo secundário anti-camundongo fusionado à Alexa-Fluor 594 (Sigma®) na diluição 1:600.

Foi observado que a actina 4 encontra-se, principalmente, na região correspondente à base do flagelo. De acordo com o que já havia sido observado

por *Dot blot*, o soro pré-imune não apresentou reação (dados não mostrados) (Figura 28).

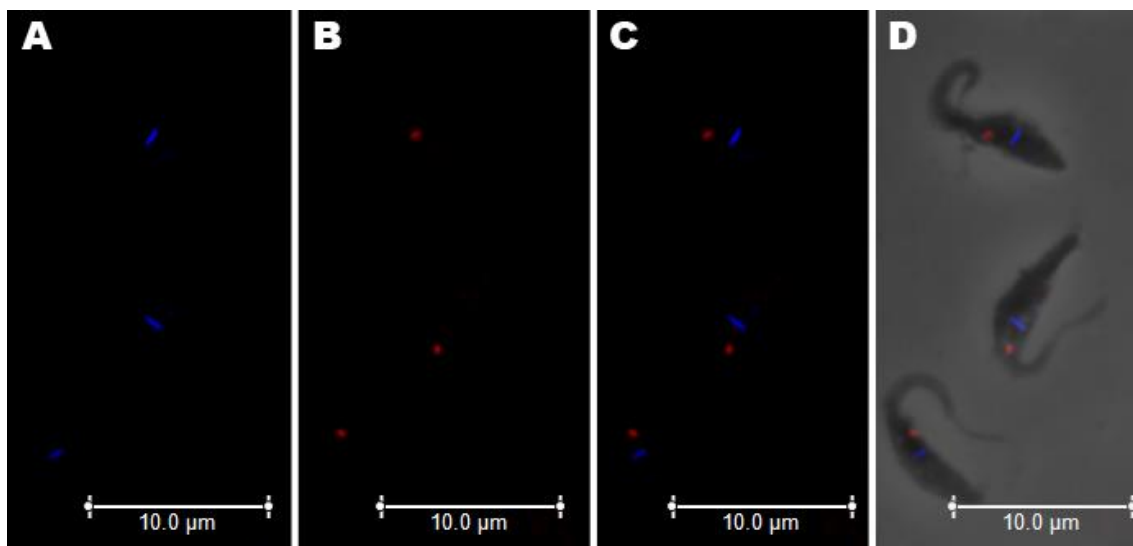


Figura 28: Localização subcelular da actina 4. Imunofluorescência indireta de formas epimastigota de *T. cruzi*. (A) Marcação fluorescente do DNA (núcleo e cinetoplasto) com DAPI (Invitrogen®). (B) Imunofluorescência indireta da actina 4 obtida com soro policlonal contra actina 4 e anticorpo secundário conjugado à Alexa-Fluor 594 (Sigma®). (C) Sobreposição de A e B. (D) Sobreposição de A e B em contraste de fase.

A localização subcelular da actina 4 em formas tripomastigotas de *T. cruzi* foi determinada por imunofluorescência indireta com o soro policlonal na diluição 1:100 e anticorpo secundário anti-camundongo fusionado à Alexa-Fluor 594 (Sigma®) na diluição 1:600. Foi observado que nesta forma evolutiva a actina 4 encontra-se dispersa por todo o citoplasma (Figura 29).

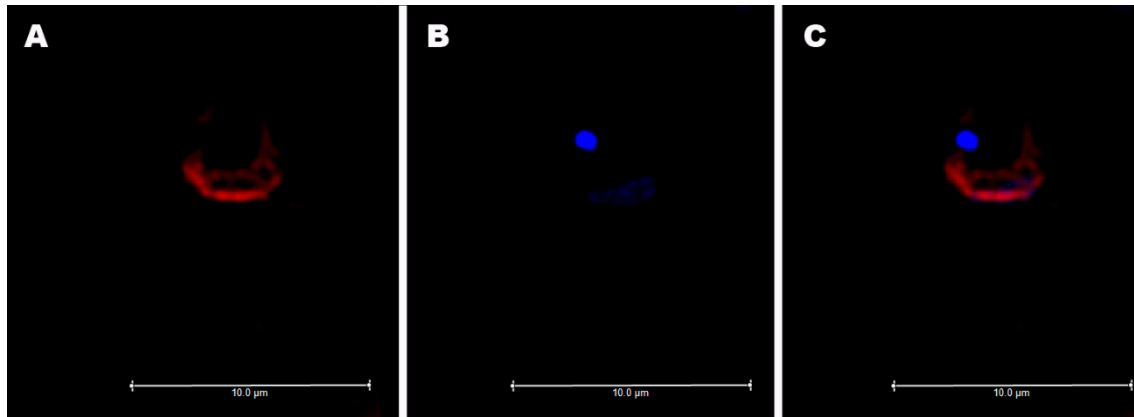


Figura 29: Localização subcelular da actina 4. Imunofluorescência indireta de formas tripomastigota de *T. cruzi*. (A) Imunofluorescência indireta da actina 4 obtida com soro policlonal contra actina 4 e anticorpo secundário conjugado à Alexa-Fluor 594 (Sigma®). (B) Marcação fluorescente do DNA (núcleo e cinetoplasto) com DAPI (Invitrogen®). (C) Sobreposição de A e B.

A localização subcelular da actina 4 em formas epimastigota de *T. cruzi* transfectadas com o vetor pNFact4Epi_Cter foi determinada por imunofluorescência indireta através de dupla marcação utilizando as seguintes combinações de anticorpos: soro policlonal na diluição 1:100 e anticorpo secundário anti-camundongo conjugado à Alexa-Fluor 594, e anticorpo primário anti-Flag e anticorpo secundário anti-coelho conjugado à Alexa-Fluor 488 (Alexa-Fluor, Sigma®).

Foi observado que a adição da etiqueta Flag na posição carboxi-terminal da proteína leva à uma marcação mais dispersa pelo citoplasma (Figura 30), em comparação ao parasita tipo selvagem (Figura 28). A marcação pontual próxima à base do flagelo ainda é observada.

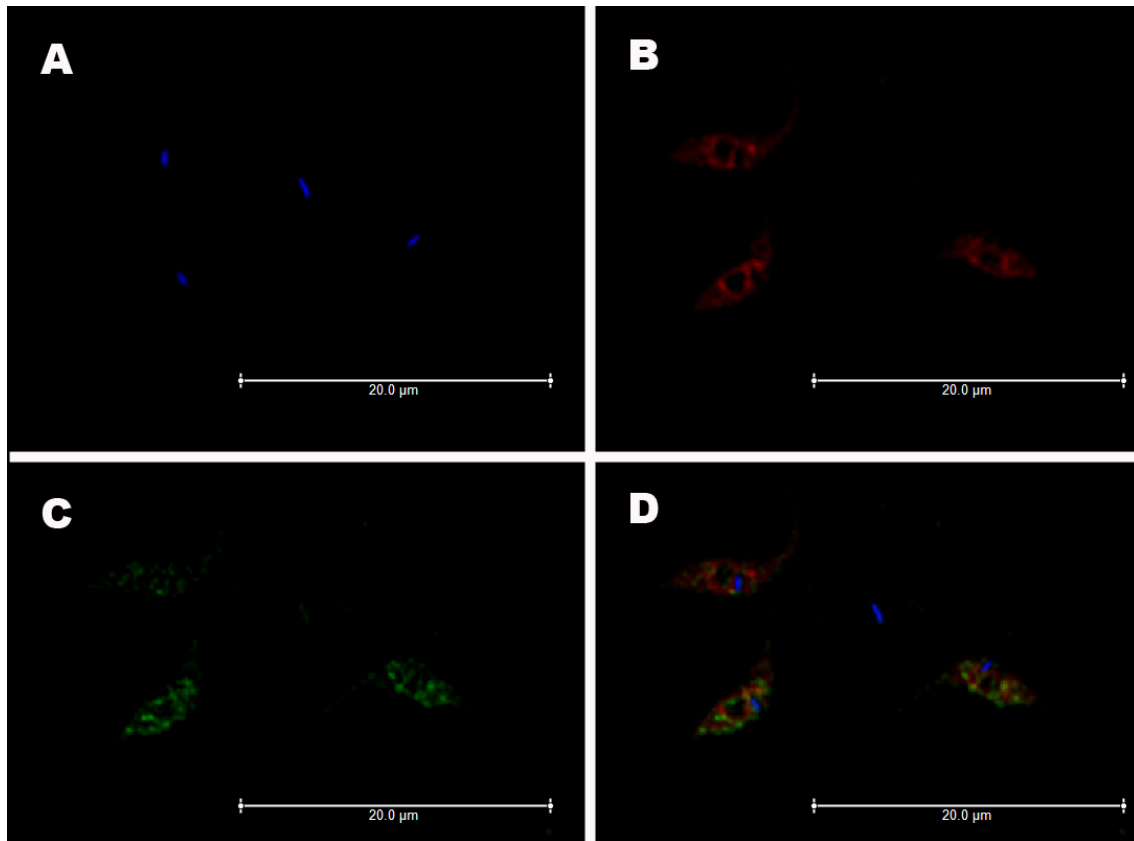


Figura 30: Localização subcelular da actina 4 fusionada a etiqueta Flag C-terminal. Imunofluorescência indireta de formas epimastigota de *T. cruzi* transfectadas com o vetor pNFact4Epi_Cter. (A) Marcação fluorescente do DNA (núcleo e cinetoplasto) com DAPI (Invitrogen®). (B) Imunofluorescência indireta da actina 4 obtida com soro policlonal contra actina 4 e anticorpo secundário conjugado à Alexa-Fluor 594 (Sigma®). (C) Imunofluorescência indireta da actina 4 fusionada a Flag com anticorpo primário anti-Flag e anticorpo secundário conjugado à Alexa-Fluor 488 (Sigma®). (D) Sobreposição de A, B C.

A localização subcelular da actina 4 em formas epimastigota de *T. cruzi* transfectadas com o vetor pNFact4Epi_Nter foi determinada por imunofluorescência indireta com anticorpo anti-FLAG (camundongo) na diluição 1:1000 e anticorpo secundário anti-camundongo conjugado à Alexa-Fluor 594 (Sigma®) na diluição de 1:600. Foi observada uma marcação dispersa por todo o corpo celular (Figura 31).

A dupla marcação foi realizada utilizando o soro policlonal para actina 4 na diluição 1:100 e anticorpo primário anti-FLAG (coelho) na diluição 1:1500 e anticorpos secundários anti-camundongo fusionado à Alexa-Fluor 594 e anti-coelho fusionado à Alexa-Fluor 488, ambos na diluição 1:600. Na figura 32 é

possível observar também a presença da marcação pontual obtida com o soro policlonal (Figura 32 – B).

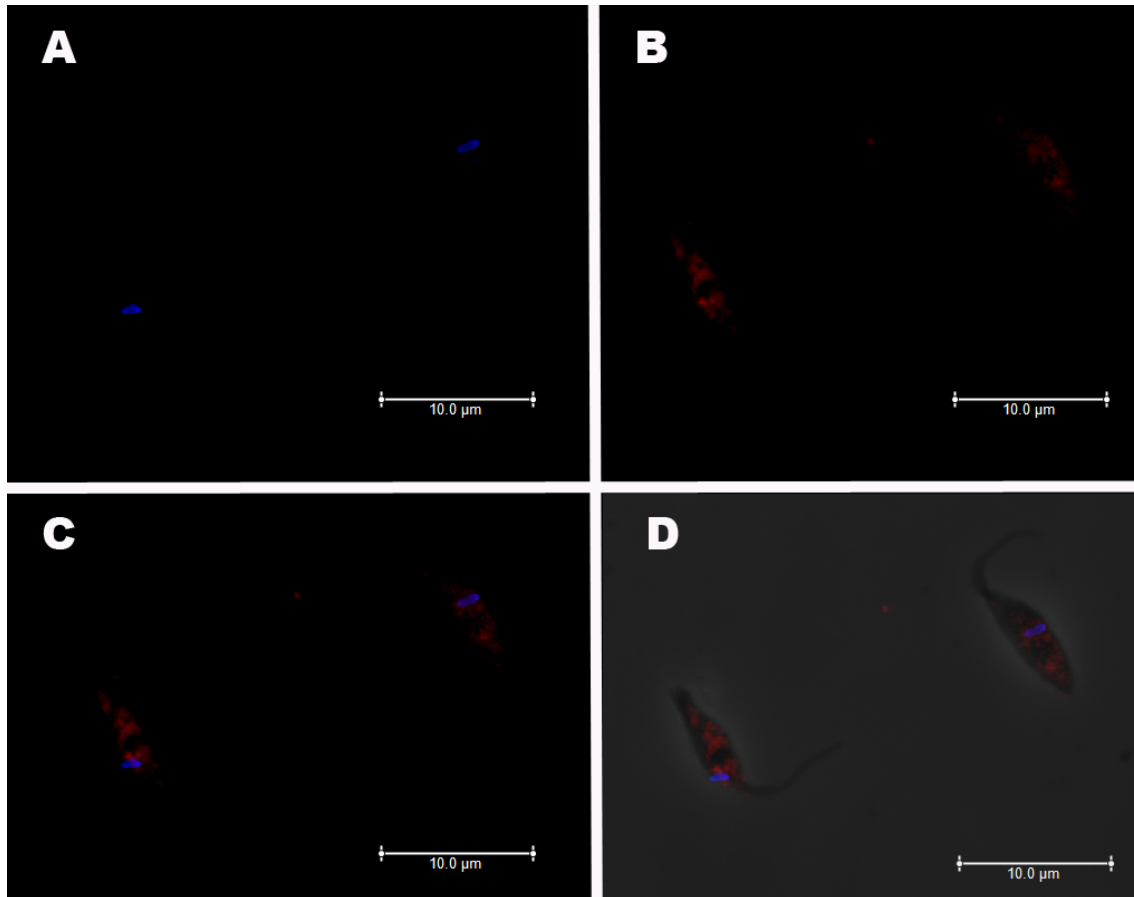


Figura 31: Localização subcelular da actina 4 fusionada à etiqueta Flag N-terminal. Imunofluorescência indireta de formas epimastigota de *T. cruzi* transfectadas com o vetor pNFact4Epi_Nter. (A) Marcação fluorescente do DNA (núcleo e cinetoplasto) com DAPI (Invitrogen®). (B) Imunofluorescência indireta da actina 4 fusionada a Flag obtida com anticorpo primário anti-Flag e anticorpo secundário conjugado à Alexa-Fluor 594 (Sigma®). (C) Sobreposição de A e B. (D) Sobreposição de A e B com contraste de fase.

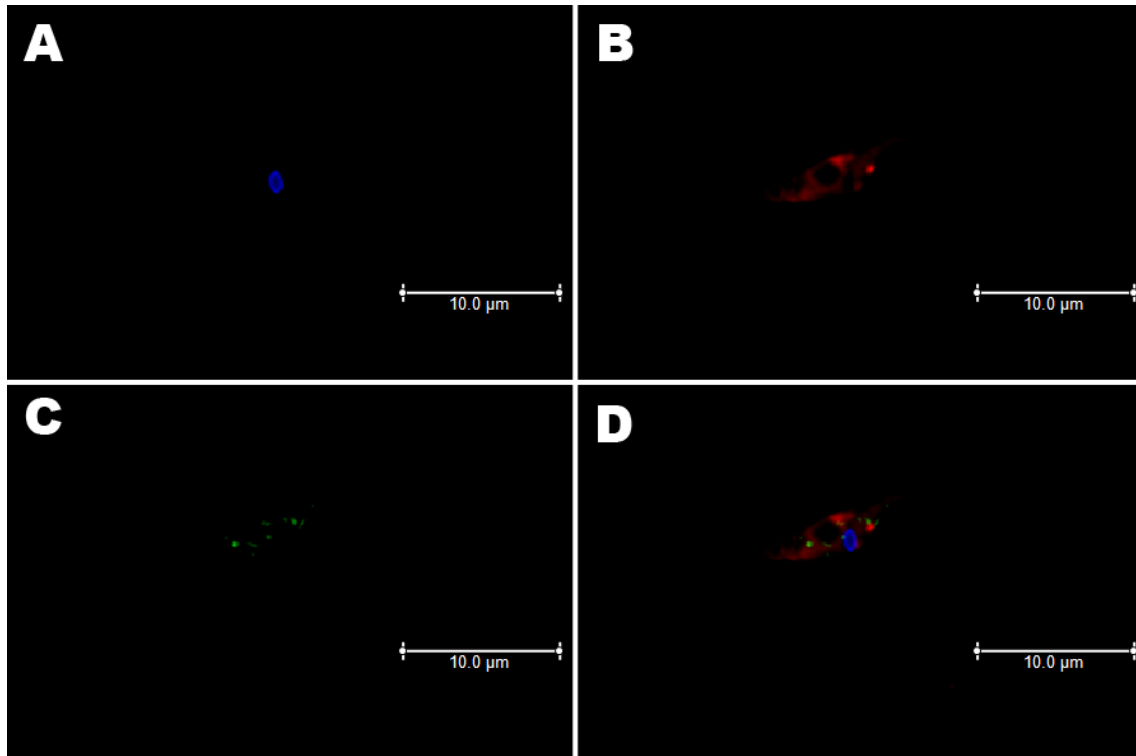


Figura 32: Localização subcelular da actina 4 fusionada a etiqueta Flag N-terminal. Imunofluorescência indireta de formas epimastigota de *T. cruzi* transfectadas com o vetor pNFact4Epi_Nter. (A) Marcação fluorescente do DNA (núcleo e cinetoplasto) com DAPI (Invitrogen®). (B) Imunofluorescência indireta da actina 4 obtida com soro policlonal contra actina 4 e secundário Alexa-Fluor 594 (Sigma®). (C) Imunofluorescência indireta de actina 4 fusionada a Flag com anticorpo primário anti-Flag e anticorpos secundário conjugado à Alexa-Fluor 488 (Sigma®). (D) Sobreposição de A, B e C.

Para a localização subcelular da actina 4 em formas epimastigota de *T. cruzi* transfectadas com o vetor pNGFPact4Epi_Cter foi realizada imunofluorescência indireta com soro policlonal para actina 4 na diluição 1:100 e anticorpo primário anti-Flag (coelho) na diluição 1:500, e anticorpos secundários anti-camundongo conjugado à Alexa-Fluor 594 e anti-coelho conjugado à Alexa-Fluor 488 ambos na diluição 1:600 (Figura 33), em alguns parasitas é possível observar a marcação pontual obtida com o soro policlonal (Figura 33 – B).

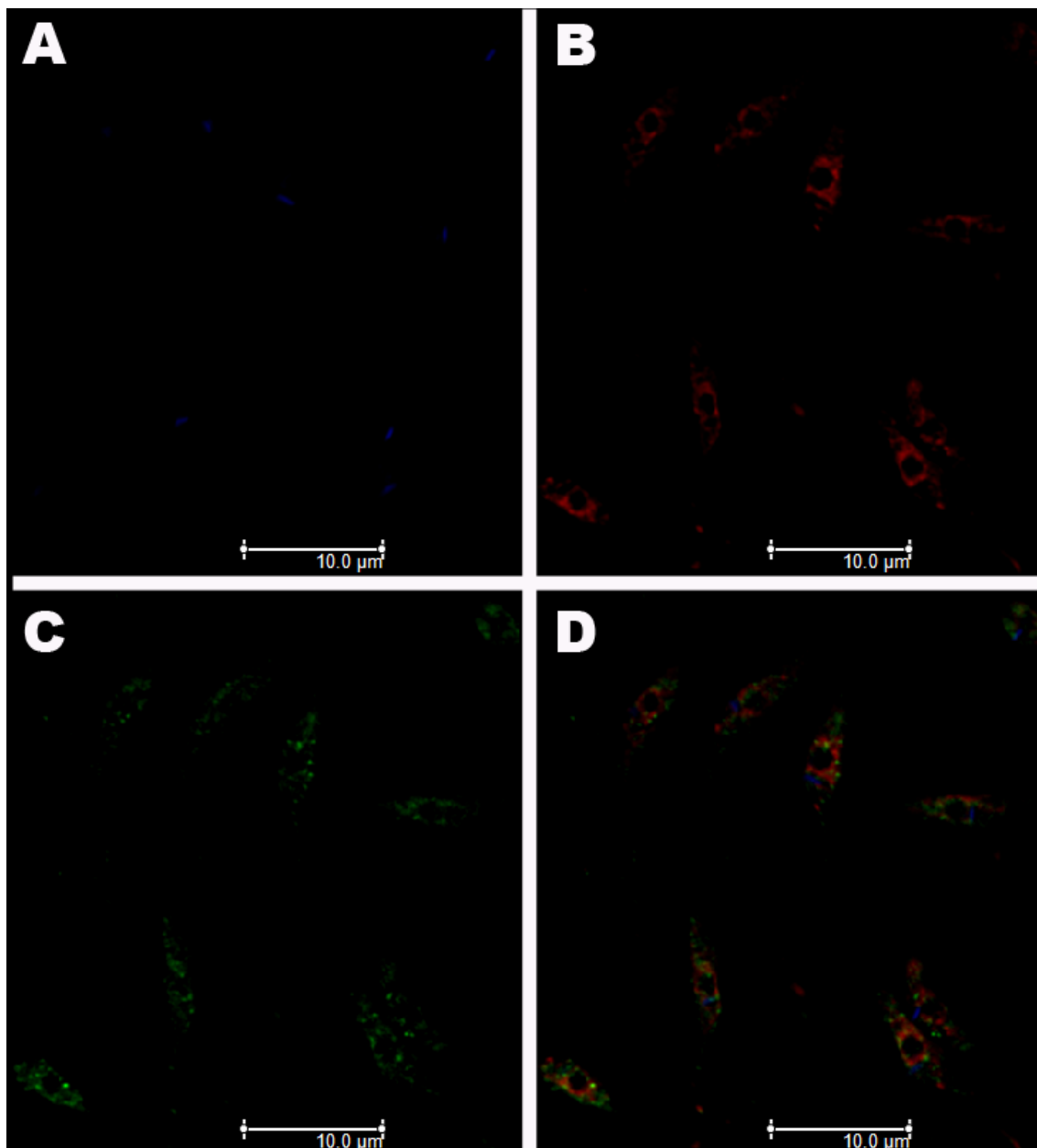


Figura 33: Localização subcelular da actina 4 fusionada a etiqueta GFP C-terminal. Imunofluorescência indireta das formas epimastigota de *T. cruzi* transfectados com o vetor pNGFPact4Epi_Cter. (A) Marcação fluorescente do DNA (núcleo e cinetoplasto) com DAPI (Invitrogen®). (B) Imunofluorescência indireta da actina 4 obtida com soro policlonal contra actina 4 e anticorpo secundário conjugado à Alexa-Fluor 594 (Sigma®). (C) Imunofluorescência indireta da actina 4 fusionada à GFP com anticorpo primário anti-GFP e anticorpos secundário conjugado à Alexa-Fluor 488 (Sigma®). (D) Sobreposição de A, B e C.

6. DISCUSSÃO

O citoesqueleto da maioria das células eucarióticas é composto por três principais elementos: (i) os microtúbulos, constituídos pela proteína tubulina; (ii) os microfilamentos, constituídos pela proteína actina; e (iii) os filamentos intermediários, que podem ser constituídos por diferentes proteínas, dependendo do tipo celular. Enquanto microtúbulos e microfilamentos estão presentes em todas as células eucarióticas, os filamentos intermediários estão presentes apenas em alguns metazoários. Assim, protozoários parasitas por exemplo, não possuem filamentos intermediários. O citoesqueleto do *T. cruzi* no entanto, assim como outros tripanosomatídeos, é ainda mais atípico quando comparado ao citoesqueleto de outras células eucarióticas. Se por um lado sua estrutura é baseada em uma rede subpelicular de microtúbulos bastante estáveis (normalmente os microtúbulos são estruturas bastante instáveis), por outro lado, filamentos de actina nunca foram observados nesses parasitas. Entretanto, diversos genes anotados como actina, proteínas relacionadas à actina e proteínas tipo actina, estão presentes no genoma de *T. cruzi* (CEVALLOS et al., 2011). Além disso, a prospecção do genoma de *T. cruzi* revelou que as principais proteínas que participam dos processos de nucleação e de *treadmilling* em eucariotos superiores estão conservadas, indicando que a maquinaria básica necessária para a formação do filamento está presente no genoma deste parasita. Especula-se que o fato de a actina na forma filamentosa nunca ter sido observada nestes protozoários pode ser explicado por uma possível instabilidade do filamento ou montagem ineficiente, embora tais eventos não estejam claramente compreendidos (DE MELO et. al, 2008).

As sequências de aminoácidos da actina de diferentes espécies apresentam cerca de 90% de similaridade, porém as variações na sequência de aminoácidos geram significativas diferenças funcionais, como por exemplo contração em células musculares e não musculares, formação de anel contrátil ao final da divisão celular, movimentos ameboides, e preservação das microvilosidades intestinais. Embora a actina seja uma proteína bastante estudada em outros organismos, o papel da actina em *T. cruzi* permanece pouco explorado.

Apesar da estrutura global da actina ser conservada na maioria dos organismos, actinas de protozoários são bem menos conservadas, não só comparadas às actinas convencionais de organismos multicelulares, mas também às variantes de um mesmo organismo (SEHRING et al., 2007). Em *T. cruzi*, a similaridade entre as sequências de aminoácidos de genes anotados como actina é, na grande maioria, inferior a 70% (CEVALOS et al., 2011). De Melo e colaboradores (2008) observaram que a maioria das trocas de aminoácidos de actina de *T. cruzi*, comparadas à outras sequências de actina de eucariotos, estão na superfície do monômero, grande parte nos *loops* responsáveis pela interação monômero-monômero durante a formação do filamento.

Alterações no padrão de expressão de actina durante o ciclo de vida, também têm sido relatados. Cevalos e colaboradores (2011) detectaram, por imunoblotting, diferenças na distribuição subcelular da actina entre os estágios de desenvolvimento de *T. cruzi* e a presença de 5 variantes de actina nos diferentes estágios, com padrões de expressão distintos, além de identificarem no genoma quatro genes que codificam actina e diversos outros genes que codificam proteínas relacionadas à actina (ARPs) e proteínas semelhantes à actina (AcL). Para facilitar a identificação de cada uma destas isoformas de actina, os autores as numeraram de 1 a 4. Apesar de terem sido confirmadas como sendo Actina por pelo menos 6 algoritmos diferentes, após análise filogenética foi possível observar que, enquanto a actina 1 é a isoforma mais conservada (até mesmo quando comparada com outros organismos, incluindo mamíferos como camundongos e humanos), a isoforma actina 4 parece ser filogeneticamente mais próxima às ARPs (ARP-2) do que à proteína actina (isoforma 1) propriamente dita. Utilizando o *software Phyre 2* (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) foi realizada uma análise *in silico* que mostrou que a sequência da actina 4 parece ser mais próxima à ARP (actin related protein) do que a uma actina propriamente dita (dado não mostrado), corroborando observações feitas por Cevallos e colaboradores (2011) através de análise filogenética. Vale ressaltar que, até o presente momento, todas as isoformas de actina anotadas são putativas, com base em informações obtidas após análise *in silico*, e nenhuma destas isoformas

foi ainda caracterizada de forma diferencial quanto à sua expressão, localização e função nas diferentes formas de desenvolvimento do *T. cruzi*.

Em protozoários, têm sido relatados exemplos de diferenças na localização subcelular das isoformas de actinas devido à sua utilização em compartimentos celulares específicos. Em *T. brucei*, por exemplo, uma actina atípica (TryARP), que é expressa apenas no flagelo, foi caracterizada (ERSFELD & GULL, 2001). Trabalhos anteriores mostraram a presença de actina no flagelo, assim foi observado neste trabalho. De Souza e colaboradores (1983) obtiveram uma marcação no flagelo de *T. cruzi* usando anticorpo contra actina de *Entamoeba histolytica*. Mais recentemente, de Melo e colaboradores (2008), utilizando soro policlonal contra um peptídeo correspondendo à uma região conservada da actina 1 de *T. cruzi*, e Cevalos e colaboradores (2011) utilizando soro policlonal contra a sequência completa da actina 1 de *T. cruzi*, observaram uma marcação difusa por todo o corpo celular inclusive na região flagelar. Já em outros tripanossomatídeos a presença de actina e proteínas relacionadas na região flagelar já foram mais bem descritas. Além disto foi observado que em *Leishmania donovani*, a depleção nos níveis de ARP1, uma proteína relacionada à actina, leva ao comprometimento dos batimentos flagelares (SINGH et al., 2014).

O presente trabalho representa uma parte de um grande projeto que visa compreender estas complexas questões relacionadas às diferentes isoformas de actina em *T. cruzi*. Resultados ainda não publicados do nosso grupo mostraram um padrão diferente de localização subcelular da actina 4 utilizando soro policlonal, quando comparado com a imunolocalização da actina 2 também com soro policlonal e imunolocalização da actina 1 fusionada à etiqueta Flag. Desta forma, podemos confirmar que mesmo sendo um soro policlonal, por ter sido obtido após imunização dos animais com um peptídeo de 14 aminoácidos correspondendo à uma porção específica da actina 4, não presente nas outras isoformas de actina, este soro policlonal já funciona como uma ferramenta bastante específica para o estudo da actina 4 em *T. cruzi*. Ainda assim, a seleção de hibridomas para a posterior obtenção de anticorpo monoclonal está em andamento a fim de confirmar a especificidade deste soro, e ser uma fonte virtualmente inesgotável de anticorpo contra actina 4. Para confirmar a localização da actina 4 em *T. cruzi*, experimentos de imunocitoquímica utilizando

o soro policlonal, para observação por microscopia eletrônica de transmissão, estão em andamento.

Parasitas transfectados com os vetores contendo a actina 4 fusionada à Flag C-terminal estão sendo selecionados. No entanto, devido a esta ser uma construção para recombinação homóloga, cuja eficiência em *T. cruzi* é muito baixa, construções episomais também foram produzidas como metodologia alternativa. Todos os parasitas geneticamente modificados que expressam a actina 4 fusionada à uma etiqueta, seja a etiqueta Flag nas posições amino ou carboxi-terminal, seja a etiqueta GFP na posição carboxi-terminal, levaram à uma marcação dispersa pelo corpo celular em comparação à marcação pontual obtida com o soro no parasita tipo selvagem. Tal efeito pode ter sido causado por se tratar de um vetor de superexpressão, ou pela interferência da etiqueta no dobramento e no endereçamento da proteína. No entanto, se por um lado estes parasitas geneticamente modificados não podem ser utilizados para determinar a localização subcelular da actina 4, a utilização destes vetores, que são vetores de superexpressão, pode facilitar a captura desta proteína por ensaios de co-imunoprecipitação, que são de extrema utilidade para a determinação das proteínas parceiras por espectrometria de massas.

Compreendendo o importante papel da actina na dinâmica celular, e tendo como modelo de estudo um organismo com características bastante diferenciadas dos modelos celulares convencionais, este trabalho prevê a construção e a aplicação de ferramentas moleculares para compreender o papel da actina 4 em *T. cruzi*, bem como caracterizá-la como uma actina ou uma ARP e determinar sua possível função.

7. CONCLUSÕES

Como principais conclusões deste trabalho temos que:

- ✓ A imunização de animais com peptídeo de 14 aminoácidos (conjugado à KLH) levou a produção de soro policlonal altamente específico, que, apesar da semelhança entre as diferentes isoformas de actina do *T. cruzi*, é capaz de reconhecer apenas a isoforma 4, sem reação cruzada com as isoformas 1 e 2;
- ✓ A localização subcelular da actina 4 é bastante específica, restrita a um ponto na região próxima da bolsa flagelar, que poderia corresponder à base do flagelo;
- ✓ A transfecção com vetor episomal para expressão da actina 4 fusionada à uma etiqueta comercial (Flag ou GFP) levou à uma marcação menos específica e mais dispersa pelo corpo celular.

8. PERSPECTIVAS

- ✓ Obtenção dos anticorpos monoclonais contra a actina 4 de *T. cruzi*;
- ✓ Determinação do nível de expressão da actina 4 nas diferentes formas de desenvolvimento do parasita por *Western blot*;
- ✓ Imunolocalização indireta da actina 4 nas diferentes formas de desenvolvimento do parasita por microscopia de fluorescência (em formas amastigotas) e microscopia eletrônica (epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas);
- ✓ Co-imunoprecipitação de complexos contendo a actina 4 e proteínas parceiras, a serem identificadas por espectrometria de massas.

9. REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed 2004.
- BATISTA, C. M., KESSLER, R. L., EGER, I., SOARES, M. J. **Trypanosoma cruzi Intracellular Amastigotes Isolated by Nitrogen Decompression Are Capable of Endocytosis and Cargo Storage in Reservosomes**. Plos One. v.10 (6), 2015.
- BATISTA, C. M., SOARES MEDEIROS, L. C., EGER, I., SOARES, M. J. **mAb CZP-315.D9: An Antirecombinant Cruzipain Monoclonal Antibody That Specifically Labels the Reservosomes of Trypanosoma cruzi Epimastigotes**. BioMed Research International. 2014.
- BEN AMAR, M. F., PAYS, A., TEBABI, P., DERO, B., SEEBECK, T., STEINERT, M., PAYS, E. **Structure and transcription of the actin gene of Trypanosoma brucei**. Mol Cell Biol. v. 8(5), p. 2166-76, 1988.
- 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. v. 6, p. 93-100, 1964
- CAMPELLONE, K. G., WELCH, M. D. **A nucleator arms race: cellular control of actin assembly**. Nat Rev Mol Cell Biol. v. 11, p. 237-251, 2010.
- CAVALIER-SMITH, T. **Kingdoms Protozoa and Chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree**. Biology Letters, v. 6, p. 342-5, 2010.
- Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: <http://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmerican/index.html>. Acessado em 15/07/2015.
- 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**. Exp Parasitol. v. 127(1), p. 249-59, 2011.
- CONTRERAS, V. T., ARAUJO-JORGE, T. C., BONALDO, M. C., THOMAZ, N., BARBOSA, H. S., MEIRELLES, M. D. E. N., GOLDENBERG, S. **Biological**

aspects of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. Mem Inst Oswaldo Cruz. v. 83(1), p. 123-33, 1988.

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

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

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

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

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

ERSFELD, K., GULL, K. **Targeting of cytoskeletal proteins to the flagellum of *Trypanosoma brucei*.** J Cell Sci. v. 114, p. 141–148, 2001

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

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

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

HERMAN, I. M. **Actin isoforms.** Curr Opin Cell Biol. v. 5(1), p. 48-55, 1993.

HIDE, G. **History of Sleeping Sickness in East Africa.** Clinical Microbiology Reviews, v. 12, p. 112-125, 1999.

KOHL, L., GULL, K. **Molecular architecture of the trypanosome cytoskeleton.** Mol Biochem Parasitol. v. 93(1), p.1-9, 1998.

LAEMMLI, U. K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature. v. 227, p. 680-685, 1970.

MAZZAROTTO, G. A., RABONI, S. M., STELLA, V., CARSTENSEN, S., DE NORONHA, L., LEVIS, S., ZANLUCA, C., ZANETTI, C. R., BORDIGNON, J., DUARTE DOS SANTOS, C.N. **Production and characterization of**

monoclonal antibodies against the recombinant nucleoprotein of *Araucaria hantavirus*. J Virol Methods. v. 162, p. 96-100, 2009.

MBInfo contributors. **Actin binding proteins influence actin dynamics.** Disponível em: <http://www.mechanobio.info/figure/figure/1384242015241.jpg.html>. Acessado em 15/07/2015.

MORTARA, R. A. **Studies on trypanosomatid actin. I. Immunochemical and biochemical identification.** Journal of Protozoology. v. 36, p. 8–13, 1989.

OTTERBEIN, L. R., GRACEFFA, P., DOMINGUEZ, R. **The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state.** Science. v. 293(5530), p. 708-11, 2001.

PENG, D., KURUP, S. P., YAO, P. Y., MINNING, T. A., TARLETON, R. L. **CRISPR-Cas9-mediated single-gene and gene family disruption in *Trypanosoma cruzi*.** MBio. v. 6, p. 2097-14, 2015.

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

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

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

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

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

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

SCHAFER, D. A., SCHROER, T. A. **Actin-related proteins.** Annul Rev Cell Dev Biol. v. 15, p. 341-63, 1999.

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

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

SINGH, K., VELURU, N. K., TRIVEDI, V., GUPTA, C. M., SAHASRABUDDHE, A. A. **An actin-like protein is involved in regulation of mitochondrial and**

flagellar functions as well as in intra macrophage survival of Leishmania donovani. *Molecular Microbiology*. v. 91(3), p. 562–578, 2014.

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

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

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

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

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