BERNARDO PEREIRA MOREIRA

Caracterização celular e molecular das proteínas gigantes do citoesqueleto de
Trypanosoma brucei

Ribeirão Preto
2016

BERNARDO PEREIRA MOREIRA

Caracterização celular e molecular das proteínas gigantes do citoesqueleto de
Trypanosoma brucei

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para obtenção de título de Doutor em
Ciências

Área de Concentração: Biologia Celular e
Molecular

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Munira Muhammad
Abdel Baqui

Ribeirão Preto
2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Moreira, Bernardo Pereira.

Caracterização celular e molecular das proteínas gigantes do citoesqueleto de *Trypanosoma brucei*. Ribeirão Preto, 2016.

178 p : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Muhammad Abdel Baqui, Munira.

1. *Trypanosoma brucei*. 2. Proteínas gigantes. 3. Citoesqueleto. 4. RNA de interferência.

MOREIRA, B. P. **Caracterização celular e molecular das proteínas gigantes do citoesqueleto de *Trypanosoma brucei***. Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Julgamento: _____

Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Julgamento: _____

Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Julgamento: _____

Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Julgamento: _____

Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Julgamento: _____

Instituição: _____
Assinatura: _____

Dedico este trabalho a todos brasileiros e brasileiras que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa.

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, Prof^a. Munira M. A. Baqui, pela oportunidade de trabalhar no laboratório e pela orientação durante o curso;

Ao Departamento de Biologia Celular e Molecular e a todos professores que contribuíram para o meu crescimento profissional;

Aos amigos do laboratório: Lígia Carolina, Camila Ferezin e Camila Gachet pela amizade, companheirismo, e discussões no desenvolvimento do projeto;

À técnica do laboratório, Carol Kabori, pela amizade e todos serviços prestados;

A todos os técnicos do departamento que auxiliaram no desenvolvimento dos experimentos deste trabalho, em especial à Elizabete Rosa Milani pelos ensinamentos de microscopia;

Aos amigos e companheiros de outros laboratórios do departamento pelo apoio e amizade;

Às secretárias Gabriela, Camila, Lúcia e demais funcionários pelo auxílio e serviços prestados durante todo o doutorado;

À Dr^a Tansy Hammarton pela orientação durante meu doutorado sanduiche na Escócia;

À FAPESP, CNPq, CAPES e FAEPA pelas bolsas de estudo e pelo suporte financeiro;

À Camilla, pelo carinho e apoio durante todos esses anos e pela assistência durante o desenvolvimento do projeto;

À minha mãe, meu pai e minha irmã pelo apoio incondicional em todas as minhas decisões tomadas;

Aos que não citei, as razões do esquecimento são tantas e, certamente, alheias ao meu profundo agradecimento pelas suas contribuições.

Science is more than a body of knowledge. It is a way of thinking...

Carl Sagan

Resumo

MOREIRA, B. P. **Caracterização celular e molecular das proteínas gigantes do citoesqueleto de *Trypanosoma brucei***. 2016. 178 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

O *Trypanosoma brucei* é o agente etiológico da Tripanossomíase Africana Humana. Este protozoário é um parasita extracelular que possui um único flagelo e um citoesqueleto de alta estabilidade, responsável por vários processos celulares como motilidade, morfologia, infectividade e divisão celular. Em todos os gêneros da família Trypanosomatidae foram descritas proteínas de alto peso molecular (500-3500 kDa) as quais, além do papel estrutural, podem estar envolvidas na organização e regulação do citoesqueleto e seus constituintes. Este projeto teve como objetivo caracterizar no âmbito celular, bioquímico e molecular as proteínas gigantes de *T. brucei* e determinar os seus papéis funcionais na biologia do parasito. A partir do isolamento do citoesqueleto de *T. brucei* e análise por SDS-PAGE, produzimos anticorpos contra as proteínas gigantes que serviu como ferramenta para realização de *Western Blotting* (WB) e imunofluorescência no estudo das propriedades moleculares destas proteínas. O sequenciamento por espectrometria de massas foi utilizado para determinação da sequência primária parcial destas proteínas e identificação dos genes em no banco de dados TriTrypDB. Aqui, mostramos que as proteínas de alta massa molecular se localizam em estruturas essenciais para a regulação do citoesqueleto como na zona de adesão flagelar (FAZ), bem como no complexo tripartido responsável pela adesão do flagelo ao cinetoplasto. A espectrometria de massas revelou 19 novas proteínas de alta massa molecular ainda não estudadas em *T. brucei* dentre as quais 2 foram caracterizadas funcionalmente: FAZ10 e Tb927.8.3540. Para investigar os seus papeis biológicos utilizamos o modelo de silenciamento gênico por RNA de interferência. O silenciamento da proteína FAZ10 levou ao destacamento do flagelo, ao reposicionamento incorreto dos núcleos e cinetoplastos, e mais importante ao erro na definição do local de ingresso do sulco de clivagem durante a citocinese, em formas procíclicas e sanguícolas de *T. brucei*. Por sua vez, a proteína Tb927.8.3540 é responsável pela estabilização do citoesqueleto de microtúbulos e formação do FAZ e flagelo. Quando ausente nas células, estas adquirem um formato esférico com a presença de um flagelo internalizado. Em ambos os casos, as células induzidas apresentam inibição da proliferação celular e o acúmulo de células multinucleadas na cultura. O estudo funcional das proteínas gigantes revelou que elas possuem um papel central na morfogênese do *T. brucei*, agindo diretamente na organização e formação de estruturas do citoesqueleto, na manutenção da adesão flagelar, e no direcionamento da citocinese.

Palavras chave: *Trypanosoma brucei*. Proteínas gigantes. Citoesqueleto.

Abstract

MOREIRA, B. P. **Cellular and molecular characterization of *Trypanosoma brucei* cytoskeletal giant proteins**. 2016. 178 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Trypanosoma brucei, the causative agent of sleeping sickness or Human African Trypanosomiasis (HAT), has been used as experimental model for cellular, biochemical and molecular studies. This is an extracellular protozoan parasite that has a single flagellum and a highly stable cytoskeleton, responsible for many cellular processes such as motility, morphology, infectivity and cell division. In Trypanosomatidae family, a novel class of High Molecular Weight Proteins (HMWPs; 500-3500 kDa) has been described, which besides their structural role, may play a role in cytoskeleton organization and regulation. Trypanosomatids cytoskeletons contain abundant HMWPs, but many of their biological functions are still unclear. Here, we aimed to describe the cellular and molecular properties of these proteins, and to determine their functional roles in the parasite biology. SDS-PAGE was used to analyze *T. brucei* cytoskeletons. Also, the HMWP bands were injected in mouse in order to produce polyclonal antibodies, which were used as a molecular tool in Western Blotting (WB) and immunofluorescence analysis. Here we show that the high molecular weight proteins are located on essential structures for the regulation of the cytoskeleton such as the flagellar adhesion zone (FAZ) and the tripartite complex, which connects the flagellum to the kinetoplast. Detergent-extracted cytoskeletons were also analyzed by gradient SDS-PAGE and the HMWP bands were sent to mass spectrometry analysis. We able to identify 19 new high molecular weight proteins most of which are uncharacterized so far in *T. brucei*. Here, we report the characterization of two giant proteins: FAZ10 and Tb927.8.3540. To investigate their biological roles we used a model of gene silencing by RNA interference (RNAi). Our data showed that FAZ10 is an essential giant cytoskeletal protein in both procyclic and bloodstream parasite life cycle stages, since its depletion led to defects in cell morphogenesis, flagellum attachment and kinetoplast and nucleus positioning. More importantly, ablation of FAZ10 impaired the timing and placement of the cleavage furrow during cytokinesis, resulting in premature or asymmetrical cell division. In turn, the Tb927.8.3540 protein is responsible for the stabilization and regulation of the microtubule cytoskeleton as well as the flagellum and FAZ. In its absence, cells acquire a spherical shape together with an internalized flagellum. In both cases, the resulting phenotype results in inhibition of cell proliferation and accumulation of multinucleated cells in culture. The functional study of the giant proteins revealed that they have a central role in morphogenesis of *T. brucei*, acting directly on the organization and regulation of cytoskeletal structures, such as the flagellum and the FAZ.

Keywords: *Trypanosoma brucei*. Giant proteins. Cytoskeleton.

Lista de Figuras

- Figura 1:** [A] Representação esquemática da distribuição do *Trypanosoma brucei gambiense* (em verde) e *Trypanosoma brucei rhodesiense* (em vermelho) na África subsaariana. Reproduzido de KENNEDY (2013). [B] Número de casos de THA registrados na África entre 1940 e 2010. Adaptado de LEJON; BENTIVOGLIO e FRANCO (2013). 17
- Figura 2:** Formas tripomastigotas do *T. b. rhodesiense* em lâmina de esfregaço de sangue periférico. Fotografia de Jean Jannin (WHO/CPE). 19
- Figura 3:** Morfotipos básicos dos tripanossomatídeos, que servem como parâmetro para a classificação taxonômica do grupo. A – amastigota, EN – endomastigota, C – coanomastigota, OM – opistomastigota, P – promastigota, O – opistomorfo, E – epimastigota e T – tripomastigota. Reproduzido de MASLOV et al. (2013). 22
- Figura 4:** Ciclo de vida do *Trypanosoma brucei*. Imagem de Alexander J. de Silva e Melanie Moser da Biblioteca Pública de Imagens de Saúde do Centro de Controle de Doenças (CDC). 24
- Figura 5:** Arquitetura celular do *Trypanosoma brucei*. Representação simplificada das principais organelas presente nesta célula: 1. Núcleo, 2. Cinetoplasto, 3. Bolso flagelar, 4. Corpo basal e corpúsculo pró-basal, 5. Flagelo, 6. Golgi, 7. Lisossomo, 8. Endossomos, 9. Mitocôndria, 10. Citoesqueleto de microtúbulos e 11. Glicossomos. Adaptado de MATTHEWS (2005). 27
- Figura 6:** Morfologia ultra estrutural do *Trypanosoma brucei*. [A-D] Seções ultrafinas do *T. brucei* visualizado por microscopia eletrônica de transmissão. N – núcleo, K – cinetoplasto, BF – bolso flagelar, AXO – axonema, CBF – colar do bolso flagelar. Elaborado pelo autor. 29
- Figura 7:** Microscopia eletrônica de transmissão do citoesqueleto de *T. brucei* após extração com detergente. FG – flagelo, spMT – microtúbulos subpeliculares, N – núcleo, BB – corpo basal, FAZ – zona de adesão flagelar. Elaborado pelo autor. 31
- Figura 8:** Microscopia eletrônica de transmissão do flagelo isolado de *T. brucei*. AXO – Axonema, BB – corpo basal, TZ – zona de transição, PFR – bastão paraflagelar. Adaptado de SUBOTA et al. (2014). 32
- Figura 9:** Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de corte transversal do flagelo de *T. brucei* [A] e esquema ilustrativo dos domínios do PFR [B]. PD – domínio proximal; ID – domínio intermediário; DD – domínio distal. Adaptado de PORTMAN e GULL (2010). 33
- Figura 10:** Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de seções ultrafinas de *T. brucei* evidenciando o flagelo e a zona de adesão flagelar cortados longitudinalmente [A] ou transversalmente [B]. Setas brancas [A] indicam os complexos juncionais presentes ao longo do FAZ. AXO – axonema; PFR – bastão paraflagelar; FAZ – zona de adesão flagelar; spMT – Microtúbulos subpeliculares. Elaborado pelo autor [A] ou adaptado de SUNTER e GULL (2016) [B]. 35
- Figura 11:** Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida das proteínas do citoesqueleto de diversos membros da família Trypanosomatidae. M – miofibrila como marcador padrão. Setas brancas indicam as proteínas gigantes. Adaptado de BAQUI et al. (2000b). 38

Figura 12: Mapa circular do vetor plasmideal pGEX-4T-1. As clonagem foram feitas na região *poli-linker in frame* com a sequência codante da GST. 54

Figura 13: Esquema do vetor pNATx^{TAG} com os sítios de restrição disponíveis para clonagem do fragmento de interesse na região X. 55

Figura 14: [A] Mapa esquemático do vetor p2T7-177. O vetor contém dois promotores T7 regulados pelo operador da tetraciclina (TetO), uma região 177 (177-targeting) com sítio único de clivagem por NotI, o gene de resistência a ampicilina (AmpR), e o marcador de seleção fleomicina (BLEO). [B] Desenho do background genético da linhagem 29-13 contendo a T7RNAP e a TETR selecionados por NEO e HYG, respectivamente. [C] Esquema do operador da tetraciclina: o repressor TetR se liga no sítio TetO inibindo a transcrição do gene de interesse pela T7 RNAP. Na presença de tetraciclina ou doxíciclina, esta se liga ao repressor tetR inibindo sua ligação ao promotor tetO que permanece livre permitindo a transcrição pela T7RNAP. 58

Figura 15: Desenho experimental do método de diluição limitante. Para cada transfecção, foram feitas duas diluições (200 células/mL e 5 células/mL) que foram plaqueadas e incubadas em cultura por pelo menos duas semanas. Os clones isolados foram congelados e analisados independentemente. 61

Figura 16: Placa de cultura de 96 poços após método de diluição limitante das células transfectadas. Após 2 semanas, alguns poços apresentaram crescimento (amarelo) e estes clones foram transferidos para garrafas de cultura e congelados. 61

Figura 17: Proteínas gigantes do citoesqueleto total de *T. brucei* PCF analisado por SDS-PAGE. [A] Foi adicionado em cada canaleta a quantidade de proteína referente a $1-3 \times 10^7$ parasitos. M - marcador proveniente da miofibrila de músculo esquelético de coelho. Corado com *Coomassie blue*. [B] WB da amostra do citoesqueleto usando anti-PG1 ou anti-PG2 e revelado com peroxidase HRP conjugado ao anticorpo secundário. 67

Figura 18: Detecção das proteínas de alto peso molecular nas frações do citoesqueleto de *T. brucei*. [A] Representação básica do protocolo de obtenção das frações do citoesqueleto. [B] SDS-PAGE em gel de gradiente 2,5%-12,5% das frações do citoesqueleto. M – marcador, S1 – sobrenadante da lise celular, P1 – citoesqueleto, S2 – fração solúvel em 1M NaCl, F1 – flagelo. Corado com *Coomassie blue*. [C-D] WB das amostras produzidas em [B] usando anti-PG1 ou anti-PG2. 68

Figura 19: Avaliação da reatividade e especificidade dos antissoros produzidos contra as proteínas de alta massa molecular. [A] Solubilização do citoesqueleto total de *T. brucei* para ensaio de imunoprecipitação. WB foi utilizado para confirmar a solubilização das proteínas usando anticorpos contra as proteínas gigantes (anti-PG1 e anti-PG2), proteína do bastão paraflagelar (anti-PFR) e β -tubulina (anti- β TUB). [B] WB da imunoprecipitação das proteínas gigantes usando anti-PG1 e anti-PG2. 69

Figura 20: Distribuição celular das proteínas gigantes no citoesqueleto de *T. brucei*. Imunofluorescência indireta das proteínas de alta massa molecular usando anti-PG1 ou anti-PG2 (verde) visualizado por microscopia confocal [A] ou microscópio de epifluorescência [B]. DAPI (azul) foi usado para marcar os núcleos e cinetoplastos. DIC, contraste de interferência diferencial. Barras = 5 μ m. 70

Figura 21: Imunofluorescência do citoesqueleto de *T. brucei* BSF usando anti-PG1 ou anti-PG2 (verde) visualizados por microscopia de epifluorescência. DAPI (azul) foi usado para marcar núcleo e cinetoplasto. Barra = 5 μ m. 71

Figura 22: Análise por microscopia confocal do citoesqueleto de *T. brucei*. [A-B] Imunofluorescência do citoesqueleto marcado com antissoro anti-PG1 e anti-AcetTUB (tubulina acetilada) ou anti-PFR (PFR). Os núcleos e os cinetoplastos foram marcados com DAPI. Barra = 7,5 µM. [C-D] Imunofluorescência tripla da distribuição da marcação dos anticorpos usados em A e B com avaliação da distribuição de fluorescência na estrutura. A distribuição da fluorescência corresponde ao segmento demarcado pela reta xzy. DAPI foi usado para visualizar os núcleos e os cinetoplastos. [E] Imunofluorescência do citoesqueleto de *T. brucei* marcado com anti-PG1 (PG1) e L3B2 (FAZ1). Os núcleos e os cinetoplastos foram marcados com DAPI. Barra = 7,5 µM. 73

Figura 23: Análise por microscopia confocal do citoesqueleto de *T. brucei*. Imunofluorescência do citoesqueleto marcado com antissoro anti-PG2 (verde) e anti-Morn1 (TbMORN1, vermelho) [A, B] ou YL1/2 (tubulina tirosinada, vermelho) [C, D]. Os núcleos e os cinetoplastos foram marcados com DAPI (azul). Barra = 10 µM [A, C] e 5 µM [B, D]. 74

Figura 24: Análise da reatividade cruzada dos antissoros anti-PG1 e anti-PG2 em *T. brucei* (Tb) *T. cruzi* (Tc) e *L. major* (Lm). [A] WB das amostras do citoesqueleto usando anti-PG1. [B] WB das amostras do lisado total (S, fração solúvel; P, *pellet*) usando anti-PG2. [C] Imunofluorescência do citoesqueleto usando anti-PG1 ou anti-PG2 (verde) visualizados por microscopia de epifluorescência. DAPI (azul) foi usado para marcar os núcleos e cinetoplastos. Barras = 10 µm. 76

Figura 25: Propriedades moleculares da proteína gigante FAZ10. [A] Representação esquemática da estrutura da FAZ10. Ela apresenta uma região C-terminal (N-term), duas regiões *coiled-coil* (CC) separadas por uma região central e uma região C-terminal (C-term). [B] Representação da sequência repetitiva consenso presente nas proteínas gigantes de tripanossomas. [C] FAZ10 de *T. brucei* apresenta um único ortólogo em outras espécies de Trypanosoma. As caixas representam regiões repetitivas dentro da sequência e ao lado está representado o tamanho e número destas sequencias. 81

Figura 26: Análise comparativa da sequência da proteína gigante Tb927.8.3540 de *T. brucei* com seus respectivos ortólogos. Essa proteína possui um peptídeo sinal de ancoragem transmembrana, e um domínio C-terminal não citosólico. Os ortólogos encontrados em outros parasitas apresentam estruturas semelhantes como mostrado pelo alinhamento das sequências. 82

Figura 27: Confirmação das clonagens no vetor pGEX-4T-1. O gel mostra bandas correspondente aos tamanhos das regiões N- e C-terminal da FAZ10 e Tb927.8.3540. A reação de digestão enzimática foi realizada com duas enzimas de restrição (EcoRI e XhoI) e as reações foram analisadas em gel 1% agarose. Brometo de etídio foi utilizado para visualização do DNA. O padrão utilizado foi o 1 kb *Plus DNA ladder* (Invitrogen). 83

Figura 28: Expressão das proteínas recombinantes fusionadas à GST. Lisado total (solúvel e insolúvel) de *E. coli* induzida com ou não com IPTG. Setas indicam as bandas resultantes da indução. Os géis foram corados com *Coomassie blue*. Canaletas: M, Marcador; Ins., Fração insolúvel; S., Fração solúvel. 84

Figura 29: Confirmação da expressão das proteínas recombinantes fusionadas à GST em sistema procarioto. WB usando anti-GST (1:10000) e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo. N-term, N-terminal; C-term, C-terminal. 85

Figura 30: Purificação de GST-FAZ10 C-terminal. [A] Análise por SDS-PAGE das frações da purificação por coluna de afinidade da proteína GST-FAZ10 C-terminal visualizado com

Coomassie blue. [B] WB da proteína recombinante usando anti-GST. Canaletas: M - marcador, 0h-2h - lisado sem ou com indução por IPTG, E1-3 - frações de eluição da purificação. 85

Figura 31: Distribuição celular das proteínas gigantes do citoesqueleto de *T. brucei*. Imunofluorescência indireta utilizando o anticorpo específico (1:50) produzido em camundongo contra as regiões N- e C-terminais da FAZ 10 [A, verde] e Tb927.8.3540 [B, verde]. Núcleos e cinetoplastos foram marcados com DAPI (azul). Barras = 10 µm. 86

Figura 32: Fracionamento do citoesqueleto de *T. brucei* e análise de WB utilizando anticorpo anti-FAZ10, anti-PFR e anti-βTUB. S1, fração solúvel do lisado celular; P1, citoesqueleto total; S2, fração solúvel do citoesqueleto; P2, flagelo isolado. 87

Figura 33: Imunoprecipitação da proteína FAZ10. Imunoprecipitação realizada com o anticorpo anti-FAZ10, visualizada pelo método de coloração por prata e confirmada por WB usando anti-FAZ10. IP, imunoprecipitação. 87

Figura 34: Fusão da cauda myc às proteínas gigantes. Clonagem de 900 bp da região c-terminal sem o códon de parada da proteína FAZ10 [A, B] e Tb927.8.3540 [C, D]. Os fragmentos (setas) foram amplificados por PCR [A, C], subclonados no vetor pNAT, e a clonagem foi confirmada por digestão enzimática [B, D]. 88

Figura 35: Confirmação das linhagens expressoras das proteínas gigantes fusionadas à cauda myc. [A, C] WB do lisado total de *T. brucei* 29-13 PCF utilizando anti-myc, anti-FAZ10 e anti-PFR nas linhagens 29-13 e FAZ10:myc [A] ou Tb927.8.3540:myc [C]. [B, D] Imunofluorescência do citoesqueleto de *T. brucei* utilizando anti-myc. DAPI foi utilizado para marcar o núcleo e cinetoplasto. Barras = 5 µm. 89

Figura 36: Imunomarcagem do citoesqueleto de *T. brucei* PCF. As células FAZ10:myc foram preparadas e marcadas com anti-FAZ10 e anti-myc. Os anticorpos secundários conjugados a partículas de ouro utilizados foram anti-IgG de camundongo (15 nm) e anti-IgG de coelho (6 nm). Setas indicam a distribuição coincidente de anti-FAZ10 e anti-myc. Barras = 100 nm. 90

Figura 37: Clonagem dos fragmentos de FAZ10 e Tb927.8.3540 para ensaio de RNAi. [A] Amplificação por PCR dos fragmentos dos genes da FAZ10 (1) e Tb927.8.3540 (2) com tamanhos de 575 e 429 bp (setas), respectivamente. [B] Confirmação da clonagem dos fragmentos (setas) no vetor p2T7-177 por digestão enzimática. (1) p2T7-177+FAZ10; (2) p2T7-177+ Tb927.8.3540. [C] Linearização dos vetores com enzima NotI. (1) p2T7-177+FAZ10, (2) p2T7-177+FAZ10 linearizado, 3 - p2T7-177+Tb927.8.3540 e 4 - p2T7-177+Tb927.8.3540 linearizado. 91

Figura 38: Confirmação do silenciamento da FAZ10. [A] WB usando anti-FAZ10 em extrato total de *T. brucei* PCF em diferentes tempos após a indução do RNAi. PFR foi usado como controle de carregamento. [B] Imunofluorescência indireta de citoesqueleto de *T. brucei* PCF usando anti-FAZ10 em células sem indução (-dox) ou 96 horas após indução (+dox) do RNAi. Barras = 10 µm. 93

Figura 39: Imunofluorescência de células silenciadas para a proteína FAZ10. As células foram fixadas e coradas com DAPI para visualização do núcleo e cinetoplasto. Todas as imagens representam células aberrantes observadas a partir de 24 horas após a indução do silenciamento. 94

Figura 40: Avaliação do silenciamento de FAZ10 em *T. brucei* PCF. [A] Contagem diária da densidade celular de células induzidas (+dox) ou não (-dox) para o silenciamento da FAZ10.

[B] Contagem da proporção de células contendo diferentes quantidades de núcleo (N) e cinetoplasto (K) antes e após a indução do RNAi da FAZ10..... 95

Figura 41: Avaliação da adesão flagelar em células PCF de *T. brucei* silenciadas para FAZ10. [A] Proporção de células com defeitos na adesão flagelar após a indução do RNAi. [B] Tipos de destacamento flagelar durante as primeiras 48 horas de indução do silenciamento da FAZ10. [C] Imagem de célula 2N2K prestes a se dividir. DAPI foi usado para marcar núcleos e cinetoplastos. Barra = 5 µm. [D] Proporção de células 2N2K prestes a gerar *zooids*, contendo ou não defeito na adesão flagelar..... 96

Figura 42: Imunofluorescência do citoesqueleto de *T. brucei* PCF. Células da linhagem FAZ10 RNAi induzidas (+ dox) ou controle (- dox) foram marcadas com anti-FAZ1 [A] ou anti-PFR [B] para visualização da zona de adesão flagelar e do bastão paraflagelar, respectivamente. DAPI foi usado para marcar núcleos e cinetoplastos. Barras = 10 µm..... 97

Figura 43: Silenciamento de FAZ10 afeta a organização da estrutura flagellar. [A] MET de seções transversais ultrafinas de células de *T. brucei* controle, não induzidas ou induzidas para o silenciamento da FAZ10. O colchete marca a distância entre o filamento do FAZ e o domínio distal do PFR. Barra = 100 nm. [B] Gráfico da distância (nm) entre o filamento do FAZ e o domínio distal do PFR (*one-way* ANOVA *** $P < 0.0001$). [C] Imagens dos flagelos duplicados de células selvagem (WT), células FAZ10 RNAi não induzidas (-dox) ou induzidas (+ dox) com doxiciclina. Setas indicam a orientação da estrutura AXO-PFR. Barra = 500 nm. [D] Proporção de células contendo flagelos duplicados na mesma orientação ou orientação oposta, como visto em [C]. [E] MET de células FAZ10 RNAi PCF após 96 horas de indução mostrando os flagelos opostos e desorganização dos microtúbulos subpeliculares (seta branca). AXO, axonema; PFR, bastão paraflagelar; MtQ, quarteto de microtúbulos do FAZ. Barra = 500 nm..... 98

Figura 44: Desenho esquemático de *T. brucei* PCF durante a progressão do ciclo celular com ênfase para a duplicação e posicionamento dos núcleos (N) e cinetoplastos (K). Elaborado pelo autor..... 99

Figura 45: Posicionamento dos núcleos e cinetoplastos em células PCF silenciadas para a FAZ10. [A] Gráfico de coordenadas da posição dos cinetoplastos (K posterior e K anterior) e do N anterior (círculo cinza claro) em relação ao N posterior em células 2N2K controle (-dox) ou induzidas (+dox). Os posicionamentos dos N e K foram medidos como descrito nos Materiais e Métodos. [B] Proporção dos diferentes fenótipos de N e K em células 2N2K induzidas (+dox) ou não (-dox) com doxiciclina, visualizadas por DAPI. $n > 90$ por experimento. Barra = 5 µm..... 100

Figura 46: FAZ10 é necessária para o correto inserção do sulco de clivagem em *T. brucei* PCF. [A] Proporção de células 2N2K (-dox ou + dox) durante a citocinese com sulco de clivagem correto ou incorreto. $n > 70$ células/experimento. [B] Imagem de célula induzida marcada com DAPI mostrando o posicionamento aberrante do sulco de clivagem. Barra = 5 µm. [C] Proporção de células 2N2K com defeito na adesão flagellar correlacionado com a presença ou ausência do sulco de clivagem incorreto em células com ou sem indução do RNAi. $n > 50$ células/experimento. [D] Imagem de célula 2N2K induzida marcada com DAPI (azul) mostrando o posicionamento aberrante do sulco de clivagem com o flagelo aderido ao corpo celular. Barra = 5 µm..... 101

Figura 47: [A] Microscopia confocal do citoesqueleto de células 2N2K marcadas com anti-β-TUB e DAPI com evidência para o posicionamento incorreto do sulco de clivagem em células induzidas com doxiciclina. *Inset*/seta branca mostra o detalhe do sulco de clivagem cortando o N anterior. Barra = 5 µm. [B-C] Imagens de MEV de células induzidas ou não com doxiciclina.

As imagens representam a formação da dobra de divisão (i) e a ingressão do sulco de clivagem (ii), indicado pelas pontas de setas. Barra = 2 μ m..... 103

Figura 48: Silenciamento da FAZ10 em *T. brucei* BSF. [A] WB usando anticorpo anti-FAZ10 em lisado celular total de células não induzidas (-tet) ou induzidas (48 e 96 horas, + tet) das linhagens FAZ10:myc e FAZ10:myc RNAi. Anti-EF1 α foi usado como controle. [B] Imunofluorescência de citoesqueleto de células FAZ10:myc RNAi não induzidas (- tet) ou induzidas (+ tet) usando anticorpo anti-myc. DAPI foi utilizado para marcar núcleos e cinetoplastos. Barra = 5 μ m. [C] Curva de crescimento acumulativa de células FAZ10 RNAi na presença (+ tet) ou ausência (- tet) de tetraciclina. [D] Células FAZ10 RNAi marcadas com DAPI após indução com tetraciclina. Setas indicam o flagelo totalmente ou parcialmente destacado. Barra = 5 μ m. [E] Quantificação de células FAZ10 RNAi com flagelo destacado após indução do silenciamento com tetraciclina. n > 500 células/ponto. [F-G] Quantificação dos núcleos (N) e cinetoplastos (K) em células FAZ10 RNAi antes e durante indução com tetraciclina. n > 150 células/ponto. [H] Epifluorescência de células induzidas coradas com DAPI após 8 horas de indução com tetraciclina. Barra = 5 μ m. 105

Figura 49: Análise de WB de amostras do fracionamento do citoesqueleto da linhagem expressora de Tb927.8.3540:myc utilizando anticorpo anti-myc. 106

Figura 50: Silenciamento da Tb927.8.3540 em *T. brucei* PCF. [A] WB contra a cauda myc fusionada a Tb927.8.3540 em extrato total de *T. brucei* PCF em diferentes tempos após a indução do RNAi. A β -Tubulina foi usada como controle de carregamento. [B] Imunofluorescência indireta de citoesqueleto de *T. brucei* PCF usando anti-myc em células sem indução (-dox) ou 96 horas após indução (+dox) do RNAi. Barra = 10 μ m..... 107

Figura 51: Avaliação do silenciamento da Tb927.8.3540 em *T. brucei* PCF. [A] Contagem diária da densidade celular de células induzidas (+dox) ou controle (-dox) para o silenciamento. [B] Contagem da proporção de células contendo diferentes quantidades de núcleos (N) e/ou cinetoplastos (K) antes e após a indução do RNAi..... 108

Figura 52: Efeito do silenciamento de Tb927.8.3540 em *T. brucei* PCF. [A] Imunofluorescência de células silenciadas para a proteína Tb927.8.3540. As células foram fixadas e coradas com DAPI para visualização do núcleo e cinetoplasto. As imagens representam células controle (- dox) e células induzidas (+ dox) observadas após 96 horas de indução do silenciamento. Barra = 10 μ m. [B] Proporção de células na cultura que apresentaram formato arredondado ou esférica. 109

Figura 53: Imunofluorescência do citoesqueleto de *T. brucei* PCF silenciado para Tb927.8.3540. O anticorpo anti- β TUB (verde) foi utilizado para marcar os microtúbulos subpeliculares e DAPI (azul)foi utilizado para marcar núcleos e cinetoplastos. Barra = 10 μ m. 110

Figura 54: Imunofluorescência do citoesqueleto de *T. brucei* PCF induzidos (+dox) ou controle (-dox) para o silenciamento da proteína Tb927.8.3540. O anticorpo L3B2 foi usado para marcar a FAZ1 (verde) e DAPI foi usado para marcação dos cinetoplastos e núcleos (azul). Barra = 10 μ m..... 111

Figura 55: Imunofluorescência do citoesqueleto de *T. brucei* PCF induzidos (+dox) ou controle (-dox) para o silenciamento da proteína Tb927.8.3540. O anticorpo anti-PFR foi usado para marcar PFR (verde) e DAPI foi usado para marcação dos cinetoplastos e núcleos (azul). Barra = 10 μ m. 112

Figura 56: Microscopia eletrônica de transmissão de cortes ultrafinos de *T. brucei* silenciados para a proteína gigante Tb927.8.3540. [A] Corte transversal de uma célula esférica com o flagelo extracelular adjacente ausente. No detalhe, a presença do axonema formado intracelularmente (1 e 2, setas brancas) sem a estrutura paraflagelar. Barra = 1 μ m. [B] Corte transversal de flagelos, aderidos (esquerda) ou não (direita) ao corpo celular, sem a estrutura paraflagelar. Barra = 100 nm. 113

Figura 57: MEV de células Tb927.8.3540 RNAi induzidas. É possível observar diferentes estágios de modificação da morfologia celular com o flagelo internalizado [A] ou externo e destacado do corpo celular [B]. Barra = 1 μ m. 114

Lista de Tabelas

Tabela 1: Lista dos anticorpos (primários e secundários) e suas diluições usados nos ensaios de WB.....	47
Tabela 2: Lista dos anticorpos (primários e secundários) e suas diluições usados nos ensaios de imunofluorescência e Microscopia Confocal.	49
Tabela 3: Lista dos oligonucleotídeos iniciadores desenhados para a amplificação das regiões N- e C-terminais das ORFs candidatas. As bases sublinhadas e em negrito correspondem aos sítios de restrição EcoRI e XhoI, respectivamente.	52
Tabela 4: Lista dos oligonucleotídeos iniciadores desenhados para a amplificação dos fragmentos das proteínas gigantes. As bases sublinhadas e em negrito correspondem aos sítios de restrição HindIII e XbaI, respectivamente.	56
Tabela 5: Lista dos oligonucleotídeos iniciadores desenhados para a amplificação dos fragmentos das proteínas gigantes. As bases sublinhadas e em negrito correspondem aos sítios de restrição SpeI e HindIII, respectivamente.	59
Tabela 6: Lista dos genes de <i>T. brucei</i> obtidos na análise por espectrometria de massas a partir da banda do gel referente à Zona 1 das proteínas de alta massa molecular. MM – massa molecular; Pep. tot. – peptídeos totais; Pep. ún. – Peptídeos únicos.	78
Tabela 7: Lista dos genes de <i>T. brucei</i> obtidos na análise por espectrometria de massas a partir da banda do gel referente à Zona 2 das proteínas de alta massa molecular. MM – massa molecular; Pep. tot. – peptídeos totais; Pep. ún. – Peptídeos únicos.	79

Lista de Abreviaturas e Siglas

AXO	Axonema
BF	Bolso Flagelar
BSF	Formas Sanguícolas
CBF	Colar do Bolso Flagelar
ClpGM6	Proteína do Tipo Calpaína GM6
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dsRNA	RNA fita dupla
FAZ	Zona de Adesão Flagelar
FLAM	Membro Flagelar
GST	<i>Glutathione S-transferase</i>
K ou kDNA	Cinetoplasto
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LFT	Fatores Líticos de Tripanossomas
MAP	Proteína Associada a Microtúbulos
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mRNA	RNA mensageiro
miRNA	Micro RNA
MtQ	Quarteto de Microtúbulos
N	Núcleo
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Open Reading Frame
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PCF	Formas Procíclicas
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFR	Bastão Paraflagelar
PM	Peso Molecular
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAi	RNA de interferência
SBF	Soro fetal bovino
siRNA	Pequeno RNA de interferência
SNC	Tripanossomíase Humana Africana
spMT	Microtúbulos Subpeliculares
TBS	Tampão Tris-Salino
TCA	Complexo de Adesão Tripartido
VSG	Glicoproteína Variante de Superfície
WB	<i>Western Blotting</i>

Lista de Símbolos, Unidades e Medidas

L	Litro
mL	Mililitro ($\times 10^{-3}$)
μ L	Microlitro ($\times 10^{-6}$)
>	Maior
g	Grama
mg	Miligrama ($\times 10^{-3}$)
μ g	Micrograma ($\times 10^{-6}$)
ng	Nanograma ($\times 10^{-9}$)
m	Metro
mm	Milímetro ($\times 10^{-3}$)
μ m	Micrômetro ($\times 10^{-6}$)
nm	Nanômetro ($\times 10^{-9}$)
%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
Da	Dalton
kDa	Quilo Dalton ($\times 10^3$)
M	Molar
mM	Milimolar ($\times 10^{-3}$)
μ M	Micromolar ($\times 10^{-6}$)
bp	Pares de bases
kbp	Quilo Pares de bases
RPM	Rotações por minuto
pH	Potencial hidrogeniônico
V	Volts
kV	Quilo Volts
u	Unidade
OD	Densidade Ótica
min	Minuto
s	Segundo
μ F	Micro Faraday ($\times 10^{-6}$)

Sumário

1. Introdução	16
1.1. Tripanossomíase - doença e epidemiologia	16
1.2. Quadro clínico, diagnóstico e tratamento	17
1.3. Biologia celular dos tripanossomatídeos	20
1.4. Ciclo de vida do <i>Trypanosoma brucei</i> e interação parasita-hospedeiro	23
1.5. Arquitetura celular do <i>Trypanosoma brucei</i>	26
1.6. O citoesqueleto do <i>Trypanosoma brucei</i>	29
1.7. Proteínas de alta massa molecular	36
1.8. RNA de interferência em tripanossomatídeos	39
2. Objetivo	41
2.1. Objetivos específicos	41
3. Materiais e Métodos	42
3.1. Cultivo dos parasitas	42
3.2. Extração do citoesqueleto e do flagelo	42
3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	43
3.4. Produção de anticorpos policlonais	44
3.5. Imunoprecipitação das proteínas de alta massa molecular	45
3.6. Western Blotting	45
3.7. Imunofluorescência e Microscopia Confocal	47
3.8. Espectrometria de Massas	50
3.9. Extração de DNA genômico	51
3.10. PCR e clonagem dos vetores plasmidiais	51
3.11. Expressão e purificação das proteínas recombinantes fusionadas à GST em sistema procarioto	54
3.12. Clonagem das proteínas gigantes à cauda myc	55

3.13.	Clonagem para silenciamento das proteínas gigantes por RNAi	56
3.14.	Transfecção do <i>Trypanosoma brucei</i>	59
3.15.	Preparação do lisado celular total.....	61
3.16.	Análise do ciclo celular e avaliação da adesão flagelar	62
3.17.	Medições morfogênicas	62
3.18.	Imunomarcação e Microscopia eletrônica.....	63
3.19.	Bioinformática	64
4.	Resultados	66
4.1.	Detecção das proteínas gigantes no citoesqueleto de <i>T. brucei</i>	66
4.2.	Localização celular das proteínas gigantes de <i>T. brucei</i>	69
4.3.	Caracterização dos anticorpos anti-PG1 e anti-PG2 contra proteínas gigantes de outros tripanossomatídeos.....	75
4.4.	Identificação das proteínas gigantes por espectrometria de massas em <i>T. brucei</i>	77
4.5.	Caracterização <i>in silico</i> das proteínas gigantes da Zona 1	80
4.6.	Clonagem e produção de anticorpos contra as proteínas candidatas.....	82
4.7.	Caracterização dos anticorpos contra as proteínas candidatas do citoesqueleto de <i>T. brucei</i>	86
4.8.	Clonagem e geração das linhagem para expressão das proteínas gigantes fusionadas à cauda myc	88
4.9.	Clonagem dos vetores para estudo por RNA de interferência	90
4.10.	Caracterização funcional da proteína FAZ10	91
4.11.	Caracterização funcional da proteína gigante Tb927.8.3540.....	106
5.	Discussão.....	115
5.1.	Propriedades moleculares das proteínas gigantes	115
5.2.	Distribuição celular das proteínas gigantes.....	116
5.3.	Identificação das proteínas gigantes.....	117
5.4.	Papel da FAZ10 na biologia do <i>Trypanosoma brucei</i>	120

5.5. Papel da Tb927.8.3540 na biologia do <i>Trypanosoma brucei</i>	123
5.6. As proteínas gigantes dos tripanossomatídeos	126
6. Conclusão	128
Bibliografia	129
Anexos	142

1. Introdução

1.1. Tripanossomíase - doença e epidemiologia

A Doença do Sono ou Tripanossomíase Humana Africana (THA) é uma doença parasitária infecciosa causada pelo protozoário extracelular *Trypanosoma brucei*. A transmissão ocorre por meio da picada do inseto vetor, mosca Tsé-tsé (*Glossina* sp.). A doença ocorre predominantemente na África subsaariana e pode se apresentar de duas formas em humanos; podendo ser causada por duas subespécies do parasita: *T. b. rhodesiense* e *T. b. gambiense*. Cada forma possui uma distribuição geográfica, número de casos, meios de transmissão, evolução clínica e forma de tratamento diferentes (KENNEDY, 2013; LEJON; BENTIVOGLIO; FRANCO, 2013). A forma predominante da doença é causada pelo *T. b. gambiense*, presente nas porções oeste e central do continente africano, (**Fig. 1A**) e é responsável por aproximadamente 98% dos casos registrados. Esta forma causa uma doença crônica que se desenvolve ao longo dos anos de forma branda e lenta em humanos e se caracteriza pela presença de uma baixa quantidade de parasitas na circulação sanguínea. O *T. b. rhodesiense*, ao contrário, é predominantemente zoonótico podendo ocorrer acidentalmente em humanos. Por isso, é responsável por pouco menos de 2% dos casos registrados. Esta forma ocorre na região leste do continente africano (**Fig. 1A**) e causa uma doença aguda e caracterizada por uma alta parasitemia. Por ser predominantemente uma zoonose, o *T. b. rhodesiense* causa um grande impacto na economia local, uma vez que é o causador da Tripanossomíase Africana Animal ou Nagana, decorrente da infecção do gado e consequente dano à pecuária local (KENNEDY, 2013; LEJON; BENTIVOGLIO; FRANCO, 2013).

Atualmente, a THA está distribuída em mais de 300 focos ou áreas localizadas podendo afetar cerca de 24 países da África subsaariana (FRANCO et al., 2014). Descoberta no início do século XX, esta doença era considerada uma epidemia que afligia centenas de milhares de pessoas. Após uma melhora temporária por volta dos anos 40, fatores como fome, guerras, a crítica situação socioeconômica local e a diminuição no investimento de medidas de controle da doença contribuíram para o retorno da mesma a níveis altos nas décadas seguintes, até o final dos anos 90

quando foram registrados cerca de 300 mil casos (WHO, 1998; KENNEDY, 2013; LEJON; BENTIVOGLIO; FRANCO, 2013; FRANCO et al., 2014). A partir dos anos 2000, esforços conjuntos de organizações governamentais e outras agências tanto na detecção como tratamento da doença ajudaram a diminuir consideravelmente novos casos da doença para menos que 10 mil casos por ano pela primeira vez (**Fig. 1B**) (WHO, 2006; FRANCO et al., 2014).

Figura 1: [A] Representação esquemática da distribuição do *Trypanosoma brucei gambiense* (em verde) e *Trypanosoma brucei rhodesiense* (em vermelho) na África subsaariana. Reproduzido de KENNEDY (2013). [B] Número de casos de THA registrados na África entre 1940 e 2010. Adaptado de LEJON; BENTIVOGLIO e FRANCO (2013).

1.2. Quadro clínico, diagnóstico e tratamento

O desenvolvimento clínico das duas formas da THA diferem consideravelmente. A THA causada pelo *T. b. gambiense* se desenvolve lentamente e pode apresentar períodos latentes podendo o curso da doença demorar até 3 anos para se completar. Por outro lado, a THA causada por *T. b. rhodesiense* se desenvolve rapidamente de forma aguda podendo levar a morte em até 2 meses, antes mesmo do indivíduo manifestar os sintomas neurológicos (LEJON; BENTIVOGLIO; FRANCO, 2013; WHO, 2013; FRANCO et al., 2014). Clinicamente, a THA apresenta dois estágios de evolução da doença: inicial e tardio. O primeiro é chamado de Estágio Hemolinfático, pois se caracteriza pela presença de parasitas na corrente sanguínea e vasos linfáticos. Os sintomas e sinais clínicos deste estágio podem ser: dores de cabeça, enjoos, febre intermitente, fraqueza, linfadenopatia, anemia, distúrbios cardíacos e endócrinos, dores musculares e nas juntas e hepatoesplenomegalia (LEJON;

BENTIVOGLIO; FRANCO, 2013; WHO, 2013). Após um período variável de tempo, a doença se desenvolve para o estágio tardio ou Estágio Meningoencefálico. Este se caracteriza pela passagem dos parasitas através da barreira hematoencefálica atingindo o sistema nervosa central (SNC) causando severo dano neurológico. Os sintomas incluem principalmente distúrbios do sono, motivo pela qual a doença recebe o nome comum, mas também incluem transtornos psiquiátricos, convulsões, coma, falha generalizada dos órgãos e conseqüentemente a morte (LEJON; BENTIVOGLIO; FRANCO, 2013; WHO, 2013). Após a infecção, por ambas subespécies de *T. brucei*, a THA é considerada geralmente fatal se não tratada apropriadamente, apesar de casos individuais de cura espontânea da infecção já terem sido registrados (JAMONNEAU et al., 2012; LEJON; BENTIVOGLIO; FRANCO, 2013; WHO, 2013).

Levando em consideração a variedade de sintomas nas duas formas da doença, torna-se muito difícil um diagnóstico rápido e preciso. Não obstante, muitos dos sintomas da THA também são confundidos com sintomas de outras doenças endêmicas. Sintomas do primeiro estágio da THA podem ser confundidos com febre tifoide, hepatite e tuberculose, enquanto o segundo estágio é geralmente confundido com neurosífilis, tumor cerebral, brucelose e infecções decorrentes do HIV (KENNEDY, 2013; LEJON; BENTIVOGLIO; FRANCO, 2013). Esta definição é muito importante pois os diferentes estágios da doença requerem diferentes tratamentos, que são baseados em drogas bastante tóxicas para o organismo (KENNEDY, 2013).

Usualmente, o diagnóstico da THA envolve 3 etapas que são conduzidos de seguinte maneira: (1) *screening*, (2) confirmação e (3) definição do estágio da doença. O *screening* se dá geralmente em áreas endêmicas a fim de se identificar focos onde a população está infectada. Na maioria dos casos, é utilizado um teste sorológico simples e barato que pode ser empregado em regiões isoladas e sem infraestrutura adequada. O exemplo mais comum é o CATT (*Card Agglutination Test for Trypanosomiasis*) (CHAPPUIS et al., 2005; LEJON; BENTIVOGLIO; FRANCO, 2013). Outro teste sorológico que pode ser empregado é o LATEX/*T. b. gambiense*, que foi desenvolvido como alternativa para o CATT (BUSCHER et al., 1999). Apesar do custo superior, ainda são opções para o diagnóstico da doença alguns métodos como: o cultivo *in vitro* e inoculação animal do parasita a partir do sangue de pacientes, ensaio de PCR, avaliação de distúrbios do sono por meio da polissonografia e ainda técnicas

de imagem como ressonância magnética (MRI) (CHAPPUIS et al., 2005; LEJON; BENTIVOGLIO; FRANCO, 2013).

O segundo estágio do diagnóstico da THA se baseia na confirmação da infecção por evidência direta da presença do parasite no organismo. O diagnóstico parasitológico é realizado pelo exame microscópico do sangue, do aspirado de linfonodos periféricos ou do líquido cefalorraquidiano (LCR) (**Fig. 2**). Somente em casos bem iniciais da infecção, e possível detectar também a presença dos parasitas na punção do cancro tripanossômico, que é uma induração ou inchaço edematoso resultante da proliferação de parasitas no local da picadura da mosca Tsé-tsé. Este cancro se forma nos primeiros 3 dias e desaparece após três semanas (CHAPPUIS et al., 2005; KENNEDY, 2006; 2013). Apesar de simples e barata, esta técnica tem baixa sensibilidade e requer bastante tempo para detectar os parasitas (cerca de 1 parasita/200 campos de observação no microscópio) (CHAPPUIS et al., 2005; KENNEDY, 2006; 2013).

Figura 2: Formas tripomastigotas do *T. b. rhodesiense* em lâmina de esfregaço de sangue periférico. Fotografia de Jean Jannin (WHO/CPE).

A terceira etapa do diagnóstico e talvez a mais importante é a definição do estágio de evolução da doença. Este passo é vital para o paciente pois diferentes tratamentos são administrados em função da sua definição (estágio inicial ou tardio)

(KENNEDY, 2013; LEJON; BENTIVOGLIO; FRANCO, 2013). Na falta de sinais clínicos claros e testes indicando qual estágio a THA se encontra, esta etapa se baseia no exame do LCR por meio da punção lombar. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o segundo estágio da THA é caracterizado pela presença no LCR de um ou mais dos seguintes: (1) alto número de glóbulos brancos (> 5 células/ μL) e/ou (2) parasitas (triplanossomas).

O tratamento para a THA é uma tarefa difícil e a eficácia do mesmo é variável (70-95% de cura) e dependente da droga e da região afetada. Atualmente, das drogas antitripanossômicas registradas, quatro são usadas em larga escala e a bastante tempo: pentamidina, suramina, melarsoprol e eflornitina; e todas estão disponibilizadas gratuitamente no Departamento de Controle de Doenças Tropicais Negligenciadas da OMS (LEJON; BENTIVOGLIO; FRANCO, 2013). Apesar disso o desenvolvimento de novas drogas é ainda necessário, visto que nenhuma vacina contra a THA foi desenvolvida. Há também o interesse de desenvolver compostos com menor toxicidade do que as drogas existentes e que possam combater as duas formas da doença de maneira mais eficaz (LEJON; BENTIVOGLIO; FRANCO, 2013).

Considerando a diminuição expressiva de novos casos registrados desde o início dos anos 2000, a eliminação da THA passou a ser considerada possível. Entretanto, como já foi observado, a situação precária da região aliada a sua instabilidade econômica e sociopolítica, pode levar a re-emergência da doença caso haja diminuição na vigilância, prevenção e controle da mesma frente ao atual panorama de redução de casos.

1.3. Biologia celular dos tripanossomatídeos

A ordem Kinetoplastida engloba um grupo diverso e complexo de protistas flagelados de vida livre ou parasitária. Dentro deste grupo, os parasitas obrigatórios são reunidos na família Trypanosomatidae, a qual reúne alguns dos principais protozoários causadores de doenças parasitárias em humanos, como o *T. cruzi* (doença de Chagas), o *T. brucei* (doença do sono) e a *Leishmania spp.* (leishmanioses tegumentar e visceral); dentre outros parasitas de invertebrados e plantas. Adicionalmente, os tripanossomatídeos também podem ser classificados quanto ao número de hospedeiros que cada espécie infecta ao longo do seu ciclo de vida, sendo

considerados monoxênicos aqueles que possuem somente um hospedeiro definitivo (invertebrado) ou dixênicos aqueles que infectam um hospedeiro definitivo (vertebrados ou plantas) e um intermediário (invertebrados) (REY, 2008).

Os primeiros relatos de tripanossomatídeos foram documentados em 1851 por Burnett e alguns anos depois, os primeiros gêneros (*Leptomonas* e *Herpetomonas*) foram estabelecidos. Estes eventos foram seguidos por uma enorme quantidade de publicações na primeira metade do século XX quando diversas novas espécies foram identificadas, embora a microscopia ótica fosse a única ferramenta para identificação e classificação de novas espécies. Porém, somente após 1960, que um sistema de taxonomia baseado exclusivamente na morfologia e ciclo de vida foi proposto por HOARE e WALLACE (1966). O último catálogo de tripanossomatídeos publicado na década de 90 incluía 350 espécies (PODLIPAEV, 1990) sendo que este número hoje se aproxima de 400 (MASLOV et al., 2013). Inicialmente adotou-se o sistema taxonômico baseado nos morfotipos de cada organismo durante o ciclo de vida, o que facilitou a separação e classificação de vários novos gêneros. Os morfotipos foram discriminados de acordo com a forma celular e também com a posição relativa do cinetoplasto e do flagelo na célula, totalizando oito morfotipos diferentes: amastigota, promastigota, coanomastigotas, endomastigotas, opistomastigotas, opistomorfo, epimastigotas e tripomastigotas (**Fig. 3**). No caso do *T. brucei*, ocorrem apenas os morfotipos epimastigota e tripomastigota, com algumas variações na forma celular dependendo do estágio do ciclo de vida.

Figura 3: Morfotipos básicos dos tripanossomatídeos, que servem como parâmetro para a classificação taxonômica do grupo. A – amastigota, EN – endomastigota, C – coanomastigota, OM – opistomastigota, P – promastigota, O – opistomorfo, E – epimastigota e T – tripomastigota. Reproduzido de MASLOV et al. (2013).

Entretanto, devido aos problemas clássicos dos sistemas taxonômicos como a falta de caracteres e critérios, não se possuía um entendimento suficientemente claro dos elementos responsáveis pela biologia evolutiva deste grupo; nem mesmo com o avanço dos estudos de ultraestrutura. Sendo assim, novas ferramentas foram incorporadas para auxiliar a classificação e separação dos táxons (gênero e espécies) da família Trypanosomatidae. Com os avanços da era genômica e a disponibilidade de diversos estudos filogenéticos foi possível mudar o conhecimento acerca da sistemática e aspectos evolutivos do grupo em questão (MASLOV et al., 2013). Dentre as análises utilizadas para este fim podemos citar os estudos filogenéticos baseados nos genes das subunidades menores e maiores do RNA ribossômico (rRNA), gene do gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase glicossomal (GAPDH) e também do gene da proteína *heat-shock* (HSP) (MASLOV et al., 1996; HAMILTON et al., 2004; SIMPSON, A. G.; ROGER, 2004). Estas ferramentas foram mais tarde aperfeiçoadas após o completo sequenciamento do genoma de diversos parasitas e disponibilidade de vários marcadores para classificação do grupo (BERRIMAN et al., 2005; EL-SAYED et al., 2005a; IVENS et al., 2005). Apesar dos recentes avanços a taxonomia deste

grupo é considerada confusa e não somente novos estudos e análises robustos estão sendo publicados como também novos táxons estão sendo criados para tentar explicar a complexidade deste grupo em conjunto com a catalogação de novas espécies (VOTYPKA et al., 2015).

1.4. Ciclo de vida do *Trypanosoma brucei* e interação parasita-hospedeiro

Mais de trinta espécies e subespécies da mosca Tsé-tsé do gênero *Glossina* são responsáveis pela transmissão de diferentes espécies de tripanossomas. Por serem organismos hematófagos, estes insetos são capazes de hospedar e transmitir uma variedade de parasitas, incluindo o *T. brucei*. As moscas Tsé-tsé recém formadas são infectadas a partir do momento que se alimentam de um hospedeiro vertebrado infectado, maneira pela qual os parasitas alcançam o trato digestivo da mosca. Após uma série de eventos celulares, incluindo diferenciação, multiplicação e migração dos parasitas dentro do trato digestório da mosca, é que estes se tornam aptos a infectar um novo hospedeiro. Acredita-se que apenas 0,1% das moscas possuem uma infecção no estágio necessário para transmitir o parasita durante o repasto sanguíneo.

No curso do ciclo de vida do *T. brucei*, a infecção e transmissão da doença no ser humano se inicia quando (1) uma mosca Tsé-tsé infectada pica o indivíduo, durante o repasto sanguíneo. Essas formas infectivas do parasita chamados de tripomastigotas metacíclicos podem atingir a corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, dando início ao estágio humano do ciclo de vida. A partir deste ponto (2) os parasitas se diferenciam em longos e esguios tripomastigotas sanguícolas, (3) que se multiplicam e (4) colonizam os fluidos corporais, sangue e linfa, e eventualmente o LCR durante o estágio mais avançado da doença. Eventualmente, (5) o indivíduo infectado pode ser picado por uma mosca Tsé-tsé, que pode ingerir os parasitas dando continuidade ao ciclo de vida do mesmo. Uma vez que os parasitas atingem o intestino do inseto vetor, (6) os tripomastigotas sanguícolas diferenciam-se em tripomastigotas procíclicos. Estes, ao saírem do intestino e enquanto migram em direção as glândulas salivares, (7) se transformam na forma epimastigota, considerada a forma reprodutiva do parasito no hospedeiro invertebrado. Nas glândulas salivares (8) os parasitas se multiplicam e iniciam sua transformação em tripomastigotas metacíclicos. O parasita permanece neste estágio até atingir a

corrente sanguínea de um hospedeiro vertebrado, completando assim o seu ciclo de vida (**Fig. 4**).

Figura 4: Ciclo de vida do *Trypanosoma brucei*. Imagem de Alexander J. de Silva e Melanie Moser da Biblioteca Pública de Imagens de Saúde do Centro de Controle de Doenças (CDC).

Nem todas as espécies de tripanossomas são patogênicas ao ser humano. Na verdade, várias espécies que infectam outros animais, e também o *T. b. brucei*, são suscetíveis a fatores líticos que estão presentes no soro humano. Estes fatores são chamados de Fatores Líticos de Tripanossomas (LFT) e são os responsáveis diretos pelo combate a infecção por estes parasitas. Existem dois tipos de LFTs: o LFT-1 que é uma partícula lipoproteica de alta densidade (RIFKIN, 1978) e o LFT-2 que faz parte de um complexo de ligação a proteínas séricas (RAPER et al., 1999). Em relação ao parasita patogênico, o *T. b. rhodesiense* possui um gene codante para uma proteína resistente ao soro, chamado SRA. A proteína SRA se liga ao LFT-1 tornando então, o parasita resistente à lise. Por outro lado, o *T. b. gambiense* não possui o gene SRA. Entretanto, esta subespécie desenvolveu resistência ao LFT-1 usando outros mecanismos, como a perda da expressão de receptores haptoglobinas/hemoglobinas (HpHbR) que são necessários para a ligação e captação de LFT-1 pelo parasita

(KENNEDY, 2013). E justamente por serem parasitas extracelulares, ou seja, que não necessitam uma célula hospedeira para invadir e se multiplicar, é que o *T. brucei* está constantemente interagindo com fatores do sangue e soro naturais da defesa do hospedeiro.

Além disso, os tripanossomas patogênicos apresentam outros mecanismos de defesa. As formas tripomastigotas sanguíneas do *T. brucei* são caracterizadas pela alta expressão de glicoproteínas variantes de superfície (VSG). As VSGs recobrem toda a superfície da célula do parasita e agem como um importante mecanismo de defesa para o mesmo (PAYS, 2006). As células do indivíduo infectado respondem à infecção por *T. brucei* produzindo anticorpos específicos contra as VSGs para eliminar o parasita e conseqüentemente, levam a diminuição da parasitemia. Entretanto, por um mecanismo chamado de variação antigênica (HORN, 2014), uma pequena população dos parasitas é capaz de trocar toda sua capa de VSG, tornando-a irreconhecível para os anticorpos produzidos. Isto leva a uma proliferação de parasitas resistentes até que novos anticorpos sejam produzidos contra as novas VSGs. Com isto, o parasita e o sistema imune do hospedeiro permanecem repetidamente nesta ação recíproca, o que torna o organismo incapaz de eliminar a infecção. Além disso, a produção excessiva e acumulação sistêmica de imunoglobulinas pode levar a uma desregulação do organismo culminando na produção de auto anticorpos (KAZYUMBA et al., 1986).

Adicionalmente, as VSGs também estão associadas a disfunções na produção de citocinas. Por parte do sistema imunológico do hospedeiro, há a produção de altos níveis de citocinas inflamatórias como interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1 beta (IL-1 β), e também de citocinas anti-inflamatórias como a interleucina 10 (IL-10), tanto no sangue como no LCR (LEJON; BENTIVOGLIO; FRANCO, 2013). Outras moléculas relacionadas à interação parasita-hospedeiro incluem também as quimiocinas e espécies reativas de oxigênio, produzidas pelo hospedeiro, e a prostaglandina D2, produzida pelo parasita (LEJON; BENTIVOGLIO; FRANCO, 2013). Geralmente, estas reações imunes exacerbadas não levam a proteção do organismo, mas ao desenvolvimento de desordens imunopatológicas.

1.5. Arquitetura celular do *Trypanosoma brucei*

Os tripanossomas são protozoários unicelulares flagelados pertencentes ao filo Euglenozoa, porém se distinguem dos outros grupos por apresentarem uma estrutura peculiar chamada cinetoplasto, e por isso são agrupados na ordem Kinetoplastida. Neste grupo, os tripanossomas pertencem a família Trypanosomatidae, que agrupa exclusivamente os parasitas obrigatórios. Os tripanossomas apresentam morfologia e comportamento diferentes dependendo de cada fase do ciclo de vida e hospedeiro em que se encontram. A célula ao mesmo tempo que organizada deve ser capaz de apresentar uma plasticidade responsável pelas constantes mudanças morfológicas necessárias e por outros processos biológicos como motilidade, alimentação e reprodução. O *T. brucei* apresenta uma organização celular mais simples que os eucariotos superiores entretanto os vários aspectos da sua biologia são igualmente importantes, haja vista que embora o organismo unicelular deva responder somente ao ambiente à sua volta para sobreviver, os processos celulares devem ser coordenados para uma rápida adaptação celular aos estímulos. Esta adaptação requer transformações estágio específicas e envolve mudanças morfológicas, alterações na expressão gênica, no posicionamento de organelas, no tráfico de proteínas e coordenação do ciclo celular.

A arquitetura celular do *T. brucei* é baseada em uma célula alongada de 15 a 30 µm de comprimento e que possui um único flagelo que emerge de uma invaginação da membrana plasmática e permanece parcialmente aderido ao corpo celular. As principais organelas se apresentam em cópia única, como o núcleo (1), cinetoplasto (2) e mitocôndria (9). A célula ainda apresenta as organelas básicas para o tráfico de proteínas, processos de endocitose/exocitose e metabolismo celular, que incluem o Aparato de Golgi (6), os lisossomos (7), os endossomos (8) e os glicossomos (11). Há ainda importantes estruturas que são vitais para a biologia dos tripanossomas. São elas o bolso flagelar (3), o corpo basal e corpúsculo pró-basal (4), o flagelo (5) e os microtúbulos subpeliculares (10) (**Fig. 5**). Em termos de orientação, a célula apresenta uma região anterior, referente a porção distal do flagelo e uma região posterior, correspondente ao lado onde há o bolso flagelar (3) (**Fig. 5**). Esta polarização é importante para a organização celular, principalmente no que diz respeito à disposição das organelas cópia única, que estão localizadas na região centro-posterior da célula.

Figura 5: Arquitetura celular do *Trypanosoma brucei*. Representação simplificada das principais organelas presente nesta célula: 1. Núcleo, 2. Cinetoplasto, 3. Bolso flagelar, 4. Corpo basal e corpúsculo pró-basal, 5. Flagelo, 6. Golgi, 7. Lisossomo, 8. Endossomos, 9. Mitocôndria, 10. Citoesqueleto de microtúbulos e 11. Glicossomos. Adaptado de MATTHEWS (2005).

No que diz respeito ao material genético, a célula interfásica de *T. brucei* apresenta um núcleo central contendo o DNA genômico e um DNA mitocondrial chamado de cinetoplasto (kDNA ou K). O núcleo, localizado na região centro-posterior, possui um diâmetro de até 2,5 μm em um formato esférico (**Figs. 5 e 6A**). Sabe-se que este organismo contém 11 pares de cromossomos megabases, 1 a 5 cromossomos intermediários e por volta de 100 mini cromossomos. Os cromossomos megabases são diploides enquanto as duas últimas classes de cromossomos são consideradas haploides e contêm principalmente sequências repetitivas e relacionadas ao processo de variação antigênica e produção das VSGs (ERSFELD, 2011). O genoma do *T. brucei* foi sequenciado por BERRIMAN et al. (2005), sendo que dos 9068 genes anotados, incluem-se aproximadamente 900 pseudogenes, 1700 genes específicos de *T. brucei* e 806 genes para VSGs nas regiões subteloméricas. Além disso, os genes estão organizados em grandes regiões polistrônicas e são ausentes de íntrons (BERRIMAN et al., 2005).

O cinetoplasto por sua vez está contido dentro da única mitocôndria da célula (**Figs. 5 e 6B**). Este é composto por uma enorme malha de grandes (maxicírculos) e pequenos (minicírculos) círculos de DNA altamente condensados. Os maxicírculos são basicamente homólogos do DNA mitocondrial que variam de 20 a 40 kbp em tamanho, e transcrevem rRNAs e codificam proteínas, em sua maioria envolvidos com o metabolismo mitocondrial (SHAPIRO; ENGLUND, 1995). Os minicírculos compreendem 90% do kDNA com tamanho variando de 0,5 a 2,9 kbp. A principal função destes é transcrever pequenos RNAs responsáveis pela maquinaria de edição

de RNA da célula. Na célula, o kDNA está posicionado adjacente ao bolso flagelar e juntamente aos corpo e corpúsculo basais formam a estrutura base para a formação do flagelo (**Figs. 5 e 6B**) (SHAPIRO; ENGLUND, 1995).

A estrutura mais posterior da célula é o bolso flagelar (BF) (**Figs. 5 e 6C**), uma invaginação da membrana plasmática correspondente ao sítio de saída do flagelo e facilmente observado por microscopia eletrônica. O BF possui uma localização específica a qual está intimamente relacionada com componentes do citoesqueleto e diversas organelas, principalmente o Aparato de Golgi (OVERATH; ENGSTLER, 2004; FIELD; CARRINGTON, 2009). O BF apresenta subdomínios e posicionamento específico: a membrana do BF forma um microambiente com um conjunto de proteínas e moléculas específicas e o lúmen desta organela está preenchido por uma matriz rica em carboidratos variados e com função ainda não detalhada (FIELD; CARRINGTON, 2009). No local de saída do flagelo onde a membrana se invagina para formar o bolso está uma estrutura chamada de colar do bolso flagelar (CBF) (**Fig. 6C, D**). O CBF atua como uma barreira física contra a entrada e saída de moléculas do lúmen e como uma estrutura de estabilização da arquitetura do BF e do flagelo. O principal componente do CBF é a *Bilbo1*, a qual foi caracterizada como essencial para a formação do BF e pelo seu funcionamento, uma vez que o *knockdown* de *Bilbo1* por RNAi (RNAi) impede a formação do BF, e causa o rompimento do sistema de tráfego vesicular, e posicionamento errôneo do novo flagelo durante a citocinese (BONHIVERS et al., 2008). A membrana do BF apresenta uma composição particular, com a presença de proteínas de superfície específicas desta região como a SRA (VANHAMME et al., 2003), receptores de transferrina (STEVERDING et al., 1995), receptores de LDL (PAL et al., 2002), CRAM (QIAO et al., 2006), HPHBR (VANHOLLEBEKE et al., 2008), entre outros. Esta composição reflete o alto grau de endocitose/exocitose que ocorre no BF, haja vista que este compartimento é o único local em que esses processos ocorrem. Além disso, este compartimento é essencial para o endereçamento de proteínas, já que a retenção de determinadas moléculas e o direcionamento de outras para a membrana pelicular ou flagelar é vital para a biologia do parasita. Não menos importante, o BF também é necessário em processos de evasão da resposta imune, como na reciclagem das VSG em formas sanguíneas do *T. brucei* (FIELD; CARRINGTON, 2009).

Figura 6: Morfologia ultra estrutural do *Trypanosoma brucei*. [A-D] Seções ultrafinas do *T. brucei* visualizado por microscopia eletrônica de transmissão. N – núcleo, K – cinetoplasto, BF – bolso flagelar, AXO – axonema, CBF – colar do bolso flagelar. Elaborado pelo autor.

1.6. O citoesqueleto do *Trypanosoma brucei*

O citoesqueleto é uma estrutura dinâmica, em constante estado de reorganização e participa de vários processos celulares. Na maioria dos eucariotos, o citoesqueleto é composto principalmente por três tipos de filamentos: microtúbulos, filamentos intermediários e os microfilamentos de actina, que formam uma rede interconectada que permeia o espaço citoplasmático das células (ALBERTS;

WILSON; HUNT, 2008). Entretanto, o citoesqueleto do *T. brucei* é composto majoritariamente de microtúbulos além de compreender uma vasta gama de proteínas acessórias com diversas funções, dentre elas as proteínas associadas a microtúbulos (MAP), proteínas do bastão paraflagelar (PFR), proteínas da zona de adesão flagelar (FAZ), e proteínas motoras do flagelo; e esta complexidade é responsável pela funcionalidade de toda a célula (**Fig. 7**). Vale ressaltar que o *T. brucei*, assim como outros tripanossomatídeos, não possuem filamentos intermediários e até o momento sabe-se que a actina não forma filamentos nestes organismos (GULL, 1999).

Grande parte dos microtúbulos constituem uma grande malha que percorrem toda a célula em forma de feixes paralelos adjacentes e conectados entre si e à membrana plasmática pelicular, sendo denominados de citoesqueleto de membrana ou de microtúbulos subpeliculares (spMT) (GULL, 1999) (**Figs. 5 e 7**). Esta estrutura apresenta uma orientação polarizada refletida pela organização dos seus heterodímeros (α - e β -tubulina), onde as extremidades “menos” estão direcionados para a região posterior da célula e as extremidades “mais” para a região anterior (ROBINSON et al., 1995). Este arranjo de microtúbulos é o principal responsável pela morfogênese celular nos diferentes estágios do ciclo de vida, é capaz de fornecer um arcabouço para a ancoragem e posicionamento exato das várias organelas intracelulares, e ajuda a direcionar a citocinese no processo de divisão celular. No caso do último, o citoesqueleto da célula filha se forma interdigitalmente aos microtúbulos pré-existentes de forma que a herança desta estrutura é semiconservativa (SHERWIN; GULL, 1989). Alternativamente, outra parte dos microtúbulos da célula é usada para a formação do axonema no flagelo.

Figura 7: Microscopia eletrônica de transmissão do citoesqueleto de *T. brucei* após extração com detergente. FG – flagelo, spMT – microtúbulos subpeliculares, N – núcleo, BB – corpo basal, FAZ – zona de adesão flagelar. Elaborado pelo autor.

O flagelo é a estrutura mais proeminente e representa o motor mecanoquímico da célula, composto pelo axonema, PFR e proteínas motoras (BASTIN et al., 2000) (**Figs. 7 e 8A**). O axonema se forma na região anterior do BF onde o corpo basal, composto por 9 pares de microtúbulos sem o par central, associado ao corpúsculo pró-basal, servem como base para sua formação. O arranjo inicial de 9 pares sem o par central é chamado de zona de transição. Posteriormente se inicia o axonema propriamente dito com a formação clássica (9+2) de 9 pares de microtúbulos mais 2 microtúbulos centrais. A partir daí, o axonema emerge do BF e adjacente ao PFR se estende ao longo de todo corpo celular (**Fig. 8A**). O citoesqueleto flagelar está fortemente aderido à célula em diferentes porções: a base, na região anterior, está conectada ao corpo basal-cinetoplasto; a porção inicial dentro do BF está associado ao *bilobe*; enquanto toda sua porção extracelular (axonema + PFR) está conectada ao corpo celular pelo FAZ (**Fig. 8A**).

Na base do BF está o corpo basal (**Figs. 7 e 8**), que está fisicamente ligado ao cinetoplasto. As duas estruturas possuem uma complexa zona de transição composta de fibras estruturais que se conectam ao axonema. Para esclarecer a ligação física entre o cinetoplasto e o corpo basal através da membrana da mitocôndria, foram

realizados estudos com leishmanias lisadas hipotonicamente onde foi mostrado que a mitocôndria se tornava uma organela grande e inchada contendo o cinetoplasto, e geralmente estava associada ao corpo basal (SIMPSON, L., 1972). Estas observações, em conjunto com estudos da replicação do cinetoplasto (ROBINSON; GULL, 1991), serviram como evidência para esclarecer a presença deste complexo, que é chamado de complexo de adesão tripartido (TCA).

O axonema, localizado ainda dentro do BF, está associada a uma estrutura chamada *bilobe*. Ele está presente no CBF e se estende parcialmente até a porção exterior do BF (MORRISWOOD et al., 2009). O *bilobe* está intimamente associado ao citoesqueleto flagelar, ligado à base do flagelo e ao CBF, porém sua função ainda não está totalmente elucidada apesar de ter sido demonstrada sua relação com a biogênese do aparato de Golgi (HE; PYPAERT; WARREN, 2005). Estruturalmente, o *bilobe* apresenta-se em forma de anzol no qual o gancho está localizado adjacente ao CBF e a haste direcionada à região anterior da célula. Algumas proteínas foram caracterizadas como componentes do *bilobe*, como TbCentrin2, TbCentrin4, TbMORN1 e TbLRRP1, porém somente as duas últimas são exclusivas desta estrutura (ZHOU et al., 2010; ESSON et al., 2012).

Figura 8: Microscopia eletrônica de transmissão do flagelo isolado de *T. brucei*. AXO – Axonema, BB – corpo basal, TZ – zona de transição, PFR – bastão paraflagelar. Adaptado de SUBOTA et al. (2014).

A porção externa do flagelo, é composta pelo axonema e PFR (**Figs. 8 e 9**). O PFR foi identificado pela primeira vez por VICKERMAN (1962) como a estrutura adjacente ao axonema exclusivamente na porção extracelular, sendo que ambas estruturas, axonema e PFR, estão envoltos inteiramente pela membrana celular. Por isso, esta estrutura está presente em formas morfológicas como epimastigotas e tripomastigotas, mas não em formas amastigotas do parasita. A principal função do PFR é fornecer sustentação ao axonema e mantê-lo aderido ao corpo celular, mas as implicações para as vantagens desta estrutura são diversas, desde o auxílio no batimento flagelar e motilidade celular como no auxílio para adesão na célula

hospedeira quando dentro do hospedeiro invertebrado (PORTMAN; GULL, 2010). Estudos iniciais identificaram duas principais e mais abundantes proteínas do PFR: PFR1 e PFR2. Desde então, e com o auxílio de estudos de proteoma e técnicas de bioquímica, bioinformática e imunologia, uma grande variedade de novas proteínas foram identificadas como componentes do PFR, já totalizando mais de 40 proteínas (PORTMAN; GULL, 2010). Estruturalmente, o PFR é uma estrutura complexa, trilaminar e entrelaçada com três domínios bem definidos: proximal, intermediário e distal (**Fig. 9**). O domínio proximal está conectado ao axonema, enquanto o distal é responsável pela adesão ao corpo celular.

Figura 9: Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de corte transversal do flagelo de *T. brucei* [A] e esquema ilustrativo dos domínios do PFR [B]. PD – domínio proximal; ID – domínio intermediário; DD – domínio distal. Adaptado de PORTMAN e GULL (2010).

A maneira pela qual o PFR, e todo o flagelo, se aderem lateralmente ao corpo celular é realizado por uma estrutura chamada de zona de adesão flagelar (FAZ). Nas formas de tripanossomatídeos com flagelos aderidos, há um complexo sistema de conexões de membrana, composto por uma rede de longos e densos filamentos, e microtúbulos especializados que definem o FAZ ao longo de todo o corpo celular adjacente ao flagelo (GULL, 1999) (**Fig. 10**). O FAZ foi descrito como essencial para a morfogênese do parasita, sendo a principal estrutura responsável pela adesão flagelar (VAUGHAN et al., 2008; ROTUREAU et al., 2014), alterações morfológicas da célula (ZHOU et al., 2011; SUN et al., 2013; HAYES et al., 2014; SUNTER et al.,

2015a), e também essencial para o processo de citocinese durante a divisão celular (LACOUNT; BARRETT; DONELSON, 2002).

Estruturalmente o FAZ é organizado em cinco domínios estruturais principais: 1) FAZ flagelar, 2) FAZ intracelular, 3) FAZ filamento, 4) Quarteto de microtúbulos (MtQ) e 5) domínio de ligação MtQ-FAZ (**Fig. 10**). Apesar de apresentar domínios específicos, os componentes do FAZ ainda não estão totalmente caracterizados quanto à organização e disposição estrutural, e por isso estes 5 domínios foram subdivididos em oito zonas de acordo com a composição das proteínas atualmente descritas (SUNTER; GULL, 2016). Estas zonas se sobrepõem justamente para levar em consideração a limitação no que diz respeito à caracterização do FAZ. Basicamente, o filamento do FAZ presente no corpo celular (Zonas 5 e 6), por meio de conexões (Zona 8) está fisicamente associado um quarteto de microtúbulos subpeliculares (MtQ) (Zona 7), que por sua vez e estão associados a uma porção de retículo endoplasmático liso (**Fig. 10**). O filamento por sua vez está fisicamente conectado (Zona 4) aos complexos juncionais de membrana que se estendem até a membrana flagelar passando pelo domínio do FAZ intracelular (Zonas 2 e 3). Estes complexos juncionais são formados por botões adesivos intermembranares de aproximadamente 30 nm de diâmetro presentes do lado citoplasmático de cada membrana e espaçados por algo em torno de 122 nm de distância entre si (**Fig. 10A**). Do lado flagelar, os filamentos que irradiam destes complexos juncionais se conectam à região distal do PFR para fornecerem a adesão necessária para o flagelo (Zona 1) (**Fig. 10**).

Figura 10: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de seções ultrafinas de *T. brucei* evidenciando o flagelo e a zona de adesão flagelar cortados longitudinalmente [A] ou transversalmente [B]. Setas brancas [A] indicam os complexos juncionais presentes ao longo do FAZ. AXO – axonema; PFR – bastão paraflagelar; FAZ – zona de adesão flagelar; spMT – Microtúbulos subpeliculares. Elaborado pelo autor [A] ou adaptado de SUNTER e GULL (2016) [B].

No que diz respeito à sua composição, o FAZ apresenta uma grande variedade de proteínas. O primeiro componente identificado do FAZ de *T. brucei* foi a glicoproteína de superfície FLA1, homóloga à proteína GP72 presente no FAZ de *T. cruzi* (NOZAKI; HAYNES; CROSS, 1996). Mais tarde foi demonstrado que esta proteína era requerida para a adesão flagelar, citocinese e sua ausência levava à formação de células com fenótipo multinucleado, que embora realizavam mitose eram incapazes de separar-se em células filhas e acabavam morrendo (LACOUNT; BARRETT; DONELSON, 2002). Posteriormente, foi realizada a investigação de parceiros moleculares da FLA1, onde uma nova proteína ligadora de FLA1, chamada FLA1BP, foi identificada em formas procíclicas de *T. brucei* (SUN et al., 2013). Estas duas proteínas interagem de maneira que formam um zíper molecular que atua na adesão do flagelo ao corpo celular. FLA1 está ancorada na membrana do corpo celular enquanto FLA1BP está ancorada na membrana flagelar, e ambas estão voltadas para o espaço intracelular. A interação destas proteínas é essencial para a biogênese e adesão do flagelo e consequente formação e alongação do FAZ. A segunda proteína descrita na zona de adesão flagelar foi a FAZ1. Por meio do uso da técnica de RNAi,

foi realizado o silenciamento da expressão desta proteína o que acarretou no destacamento parcial do flagelo, formando alças ao longo da sua estrutura (VAUGHAN et al., 2008).

Os últimos anos, a partir de diversas técnicas de biologia molecular, bioquímica, bioinformática, e microscopia de alta resolução foi possível identificar uma grande quantidade de proteínas presentes no FAZ, sendo que atualmente a estrutura compreende mais de 30 proteínas (**Anexo 1**). Em 2015, por meio de técnicas de proteoma a partir da imunoprecipitação de FAZ1, e aliada a estudos de bioinformática foram identificadas nove proteínas novas do FAZ (FAZ2-10) (SUNTER et al., 2015b). Vale também ressaltar o estudo de proteoma do flagelo intacto de *T. brucei*, onde foi caracterizada uma família de proteínas flagelares associadas ao PFR (FLAM1, 2, 4, 5 e 7), o axonema (FLAM6), à porção distal do flagelo (FLAM8) e ao FAZ (FLAM3) (SUBOTA et al., 2014). Estudos posteriores mostraram que o silenciamento de FLAM3 por RNAi causa defeitos na motilidade e na morfogênese deste organismo (ROTUREAU et al., 2014). Das proteínas do FAZ recentemente descritas, uma que merece destaque é a proteína do tipo calpaína GM6 (ClpGM6). Esta é uma proteína de alta massa molecular localizada no domínio FAZ flagelar e foi demonstrada ser essencial para a morfogênese do *T. brucei*. Na sua ausência, formas tripomastigotas do parasita adquiriram uma morfologia do tipo epimastigota, com evidentes alterações no posicionamento do cinetoplasto e flagelo (HAYES et al., 2014). Apesar de muitas proteínas do FAZ terem sido identificadas nos últimos anos, grande parte ainda não foi caracterizada quanto a sua função biológica nos tripanossomatídeos.

1.7. Proteínas de alta massa molecular

Proteínas de alta massa molecular foram inicialmente descritas em músculo estriado de vertebrados e estão geralmente associadas a proteínas do citoesqueleto (WANG, K.; MCCLURE; TU, 1979; WANG, K.; WILLIAMSON, 1980; WANG, K., 1984). A titina, de massa molecular de cerca de 3800 kDa, confere propriedades de elasticidade passiva às fibras musculares e participa junto com a nebulina (900 kDa) e a obscurina (870 kDa) na montagem, estabilização e organização dos sarcômeros (LABEIT; KOLMERER, 1995; KONTROGIANNI-KONSTANTOPOULOS; BLOCH, 2005; WITT et al., 2006). Além do seu papel celular como proteína estrutural e

sinalizadora, as proteínas gigantes também estão relacionadas a várias doenças dependendo do tipo de mutação que pode ocorrer nos seus genes (PELIN et al., 1999; HERMAN et al., 2012). A nível celular, outras proteínas gigantes do citoesqueleto de vertebrados também foram descritas, dentre elas as enaptinas ou nesprinas (~1000 kDa) (ZHANG et al., 2002; PADMAKUMAR et al., 2004), e as plectinas (~500 kDa) (SVITKINA; VERKHOVSKY; BORISY, 1996) que basicamente são elementos do citoesqueleto com domínios de ligação a outros parceiros celulares, como actina principalmente. As titinas e proteínas do tipo titina são componentes essenciais das células de vertebrados, entretanto proteínas gigantes também foram descritas em várias classes de invertebrados e denominadas de mini-titinas, de peso molecular de aproximadamente 500 a 900 kDa. Dentre elas podemos citar a projectina em *Drosophila* e abelhas (SAIDE, 1981; AYME-SOUTHGATE et al., 1991), a twitchina em *Caenorhabditis elegans* (BENIAN et al., 1989) e a conectina em lagostas (MANABE et al., 1993). Apesar dos papéis estruturais destas proteínas gigantes, as titinas e proteínas do tipo titina estão sendo cada vez mais estudadas pelas suas propriedades quinases e participações na sinalização celular, o que ressalta a importância destes componentes na biologia de vários organismos.

Em protozoários também já foram descritas proteínas gigantes. Em *Plasmodium falciparum* e *P. chabaudi* foram descritas duas proteínas, Pf11-1 e Pf332, de aproximadamente 1000 kDa e 2500 kDa respectivamente, que são sintetizadas pelo parasita durante seu estágio intraeritrocítico e exportadas para o citoplasma das hemácias onde regulam o processo de citoaderência da célula hospedeira (PETERSEN et al., 1990; MATTEI; HINTERBERG; SCHERF, 1992; GARCIA; ABRAHAMSON, 1995). Também no citoesqueleto de organismos de todos os gêneros da família Trypanosomatidae foram identificadas proteínas gigantes de alto massa molecular (**Fig. 11**). Em *T. cruzi*, proteínas gigantes (700-2500 kDa) estão associadas à região do FAZ e próximas ao MtQ do citoesqueleto subpeliclar (RUIZ-MORENO et al., 1995). Em *Phytomonas serpens*, a proteína gigante Ps3500 (3500 kDa) foi identificada na zona de adesão flagelar, na extremidade anterior do citoesqueleto de microtúbulos na região do BF o que sugere sua participação na ligação desta estrutura com a membrana do flagelo (BAQUI et al., 1996). Em *Crithidia luciliae thermophila* foi descrita uma fosfoproteína gigante, chamada Ct2300 (2300 kDa), situada entre o vacúolo contrátil e a bolsa flagelar deste organismo onde sugere-se que participe do

processo osmorregulatório como uma proteína periférica de membrana (BAQUI et al., 2000a). Adicionalmente, também nos gêneros *Phytomonas*, *Leptomonas* e *Leishmania* foram identificadas proteínas gigantes, Ps3500 (3500 kDa), Ls2500 (2500 kDa) e Lt1200 (1200 kDa) respectivamente, com localização predominante na região anterior das formas promastigotas, especificamente na região do BF, porém com função ainda desconhecida. Estas proteínas ainda compartilham propriedades físico-químicas como termoestabilidade além de coimunoprecipitarem com a tubulina, características inerentes aos componentes da família das proteínas associadas aos microtúbulos (MAPs) (BAQUI et al., 2000b).

Figura 11: Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida das proteínas do citoesqueleto de diversos membros da família Trypanosomatidae. M – miofibrila como marcador padrão. Setas brancas indicam as proteínas gigantes. Adaptado de BAQUI et al. (2000b).

Recentemente, duas proteínas de massa molecular elevada foram também identificadas e caracterizadas em *T. brucei*. A ClpGM6 e a FLAM3 são proteínas do FAZ flagelar que possuem massa molecular de aproximadamente 503 e 660 kDa, respectivamente (HAYES et al., 2014; ROTUREAU et al., 2014). Outro exemplo, a FAZ10, identificada por MORRISWOOD et al. (2013) e caracterizada pelo nosso grupo (MOREIRA, B. P. et al., 2016, sob revisão, **Anexo 3**), foi inicialmente anotada como

um gene codante para uma proteína de massa aparente de 502 kDa (ASLETT et al., 2010).

Apesar dos recentes avanços na identificação e caracterização de proteínas dos protozoários, muitas delas ainda possuem função desconhecida, em especial as proteínas de alta massa molecular. O tamanho exacerbado destas proteínas é um obstáculo e causa limitações no uso de diversas técnicas de biologia celular e molecular para o estudo das mesmas. Portanto, faz-se necessária a utilização de metodologias alternativas capazes de fornecer informações sobre a função destas proteínas e a importância destas na biologia dos diversos organismos.

1.8. RNA de interferência em tripanossomatídeos

RNA de interferência (RNAi) é um mecanismo celular endógeno que age no controle pós-transcricional de RNA mensageiros (mRNA) por meio da inibição da tradução ou degradação dos mesmos por homologia entre as sequências. Este mecanismo é disparado pela presença de moléculas de RNA dupla fita (dsRNA) de origem endógena ou exógena, sendo chamados de pequenos RNAs de interferência (siRNA) ou micro RNAs (miRNA) dependendo das suas origens e características. Resumidamente, o mecanismo se baseia na formação de dsRNA para a degradação de mRNA complementares. Este dsRNA é processado pela enzima DICER, que cliva o dsRNA em siRNA de 20 a 25 nucleotídeos de tamanho. Este por sua vez, aciona o complexo RISC, onde uma fita antissenso do siRNA e o mRNA alvo complementar se unem para uma subsequente degradação do último pela atividade de nuclease de RISC (HANNON, 2002).

O fenômeno do RNAi foi observado na natureza pela primeira vez quando pesquisadores tentaram intensificar a cor de flores de petúnias pela introdução e superexpressão de um gene desta planta. Surpreendentemente eles observaram uma cossupressão resultando em flores brancas ou variegadas (NAPOLI; LEMIEUX; JORGENSEN, 1990). Posteriormente, FIRE et al. (1998) injetaram moléculas senso e antissenso de dsRNA em *C. elegans* e viram que as mesmas foram suficientes para silenciar o gene homólogo. Este trabalho rendeu-lhes o Prêmio Nobel de Medicina de 2006. A maquinaria de RNAi já foi descrita em diversos organismos como mamíferos, invertebrados, fungos, plantas e protozoários parasitas. O RNAi em *T. brucei* foi

descrito pela primeira vez durante um estudo sobre processamento de mRNA nesta espécie (NGO et al., 1998). Neste trabalho eles observaram que dsRNA derivado a partir das sequências que codificam para o gene da α -tubulina, fazia com que as células de *T. brucei* se arredondassem, fenótipo conhecido como “FAT”. Curiosamente este foi um dos primeiros relatos da presença de RNAi em células eucarióticas após estudos em plantas e vermes. Vários tripanossomatídeos possuem maquinaria de RNAi endógena, incluindo *T. brucei* spp. e *T. congolense* (INOUE et al., 2002), entretanto o RNAi está ausente em *T. cruzi* e *Leishmania* spp.

A combinação de ferramentas genéticas disponíveis, com o genoma sequenciado, e várias questões a serem respondidas na biologia dos tripanossomas, fazem a utilização de RNAi como ferramenta molecular nestes organismos altamente relevante. Além da relevância de *T. brucei* para a saúde humana, este organismo bem como outros parasitas evolutivamente relacionados (e.g. *Leishmania*) são excelentes modelos para o estudo de processos intracelulares de células eucarióticas.

6. Conclusão

No presente trabalho identificamos 19 novas proteínas de alta massa molecular no citoesqueleto do *Trypanosoma brucei*, sendo duas delas relacionadas com ou com o processo de citocinese, ou com a regulação do citoesqueleto de microtúbulos. Utilizando ferramentas de silenciamento pós-transcricional por RNAi, realizamos a caracterização funcional das proteínas FAZ10 e Tb927.8.3540 em formas procíclicas e sanguícolas do *T. brucei*.

Dentre as proteínas gigantes caracterizadas, a FAZ10 está localizada na zona de adesão flagelar, associada ao citoesqueleto flagelar, e possui papel essencial na adesão flagelar, no posicionamento de organelas, e mais importante atua na definição do local de ingressão do sulco de clivagem durante a citocinese. A Tb927.8.3540 por sua vez, é uma proteína presente na zona de adesão flagelar, possivelmente associada ao citoesqueleto de microtúbulos. Além disso, esta proteína possui papel fundamental na organização do citoesqueleto do corpo celular, formação do FAZ e na regulação da localização flagelar de *T. brucei*.

Bibliografia

ABSALON, S. et al. Basal body positioning is controlled by flagellum formation in *Trypanosoma brucei*. **PLoS One**, v. 2, n. 5, p. e437, 2007.

ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of The Cell**. 5th. 2008.

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol**, v. 215, n. 3, p. 403-10, Oct 5 1990.

ASLETT, M. et al. TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. **Nucleic Acids Res**, v. 38, n. Database issue, p. D457-62, Jan 2010.

AYME-SOUTHGATE, A. et al. *Drosophila* has a twitchin/titin-related gene that appears to encode projectin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 18, p. 7973-7, Sep 15 1991.

BAQUI, M. M. et al. A giant phosphoprotein localized at the spongione region of *Crithidia luciliae thermophila*. **J Eukaryot Microbiol**, v. 47, n. 6, p. 532-7, Nov-Dec 2000a.

BAQUI, M. M. et al. In vivo and in vitro phosphorylation and subcellular localization of trypanosomatid cytoskeletal giant proteins. **Cell Motil Cytoskeleton**, v. 47, n. 1, p. 25-37, Sep 2000b.

BAQUI, M. M. et al. A giant protein associated with the anterior pole of a trypanosomatid cell body skeleton. **Eur J Cell Biol**, v. 70, n. 3, p. 243-9, Jul 1996.

BASTIN, P. et al. Inside and outside of the trypanosome flagellum: a multifunctional organelle. **Microbes Infect**, v. 2, n. 15, p. 1865-74, Dec 2000.

BENIAN, G. M. et al. Sequence of an unusually large protein implicated in regulation of myosin activity in *C. elegans*. **Nature**, v. 342, n. 6245, p. 45-50, Nov 2 1989.

BERRIMAN, M. et al. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 416-22, Jul 15 2005.

BONHIVERS, M. et al. Biogenesis of the trypanosome endo-exocytotic organelle is cytoskeleton mediated. **PLoS Biol**, v. 6, n. 5, p. e105, May 6 2008.

BROADHEAD, R. et al. Flagellar motility is required for the viability of the bloodstream trypanosome. **Nature**, v. 440, n. 7081, p. 224-7, Mar 9 2006.

BRUN, R.; SCHONENBERGER. Cultivation and in vitro cloning or procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. Short communication. **Acta Trop**, v. 36, n. 3, p. 289-92, Sep 1979.

BUSCHER, P. et al. Improved latex agglutination test for detection of antibodies in serum and cerebrospinal fluid of *Trypanosoma brucei gambiense* infected patients. **Acta Trop**, v. 73, n. 1, p. 11-20, May 25 1999.

CHAPPUIS, F. et al. Options for field diagnosis of human african trypanosomiasis. **Clin Microbiol Rev**, v. 18, n. 1, p. 133-46, Jan 2005.

COTRIM, P. C. et al. Organization and expression of the gene encoding an immunodominant repetitive antigen associated to the cytoskeleton of *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 71, n. 1, p. 89-98, Apr 1995.

CROOKS, G. E. et al. WebLogo: a sequence logo generator. **Genome Res**, v. 14, n. 6, p. 1188-90, Jun 2004.

DAWE, H. R. et al. The hydrocephalus inducing gene product, Hydin, positions axonemal central pair microtubules. **BMC Biol**, v. 5, p. 33, 2007.

EL-SAYED, N. M. et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 409-15, Jul 15 2005a.

EL-SAYED, N. M. et al. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 404-9, Jul 15 2005b.

ERSFELD, K. Nuclear architecture, genome and chromatin organisation in *Trypanosoma brucei*. **Res Microbiol**, v. 162, n. 6, p. 626-36, Jul-Aug 2011.

ESSON, H. J. et al. Morphology of the trypanosome bilobe, a novel cytoskeletal structure. **Eukaryot Cell**, v. 11, n. 6, p. 761-72, Jun 2012.

FIELD, M. C.; CARRINGTON, M. The trypanosome flagellar pocket. **Nat Rev Microbiol**, v. 7, n. 11, p. 775-86, Nov 2009.

FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 806-11, Feb 19 1998.

FRANCO, J. R. et al. Epidemiology of human African trypanosomiasis. **Clin Epidemiol**, v. 6, p. 257-75, 2014.

GALETOVIC, A. et al. The repetitive cytoskeletal protein H49 of *Trypanosoma cruzi* is a calpain-like protein located at the flagellum attachment zone. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e27634, 2011.

GALLET, C. et al. A Protein Phosphatase 1 involved in correct nucleus positioning in trypanosomes. **Mol Biochem Parasitol**, v. 192, n. 1-2, p. 49-54, Nov-Dec 2013.

GARCIA, C. R.; ABRAHAMSON, P. A megadalton protein (Pc2500) is present during the intraerythrocytic development of *P. chabaudi*. **Biochem Mol Biol Int**, v. 36, n. 5, p. 983-9, Aug 1995.

GHEIRATMAND, L. et al. Biochemical characterization of the bi-lobe reveals a continuous structural network linking the bi-lobe to other single-copied organelles in *Trypanosoma brucei*. **J Biol Chem**, v. 288, n. 5, p. 3489-99, Feb 1 2013.

GRANZIER, H. L.; WANG, K. Gel electrophoresis of giant proteins: solubilization and silver-staining of titin and nebulin from single muscle fiber segments. **Electrophoresis**, v. 14, n. 1-2, p. 56-64, Jan-Feb 1993.

GULL, K. The cytoskeleton of trypanosomatid parasites. **Annu Rev Microbiol**, v. 53, p. 629-55, 1999.

HAMILTON, P. B. et al. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. **Int J Parasitol**, v. 34, n. 12, p. 1393-404, Nov 2004.

HAMMARTON, T. C. et al. Trypanosoma brucei MOB1 is required for accurate and efficient cytokinesis but not for exit from mitosis. **Mol Microbiol**, v. 56, n. 1, p. 104-16, Apr 2005.

HANNON, G. J. RNA interference. **Nature**, v. 418, n. 6894, p. 244-51, Jul 11 2002.

HAYES, P. et al. Modulation of a cytoskeletal calpain-like protein induces major transitions in trypanosome morphology. **J Cell Biol**, v. 206, n. 3, p. 377-84, Aug 4 2014.

HE, C. Y. et al. Golgi duplication in Trypanosoma brucei requires Centrin2. **Science**, v. 310, n. 5751, p. 1196-8, Nov 18 2005.

HERMAN, D. S. et al. Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy. **N Engl J Med**, v. 366, n. 7, p. 619-28, Feb 16 2012.

HIRUMI, H.; HIRUMI, K. Continuous cultivation of Trypanosoma brucei blood stream forms in a medium containing a low concentration of serum protein without feeder cell layers. **J Parasitol**, v. 75, n. 6, p. 985-9, Dec 1989.

HOARE, C. A.; WALLACE, F. G. Developmental Stages of Trypanosomatid Flagellates - a New Terminology. **Nature**, v. 212, n. 5068, p. 1385-&, 1966.

HORN, D. Antigenic variation in African trypanosomes. **Mol Biochem Parasitol**, v. 195, n. 2, p. 123-9, Jul 2014.

HU, H. et al. SAS-4 Protein in Trypanosoma brucei Controls Life Cycle Transitions by Modulating the Length of the Flagellum Attachment Zone Filament. **J Biol Chem**, v. 290, n. 51, p. 30453-63, Dec 18 2015.

INOUE, N. et al. Tetracycline-regulated RNA interference in Trypanosoma congolense. **Mol Biochem Parasitol**, v. 120, n. 2, p. 309-13, Apr 9 2002.

IVENS, A. C. et al. The genome of the kinetoplastid parasite, Leishmania major. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 436-42, Jul 15 2005.

JAMONNEAU, V. et al. Untreated Human Infections by *Trypanosoma brucei* gambiense Are Not 100% Fatal. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 6, Jun 2012.

KALL, L. et al. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. **J Mol Biol**, v. 338, n. 5, p. 1027-36, May 14 2004.

KAZYUMBA, G. et al. Expression of the B cell repertoire and autoantibodies in human African trypanosomiasis. **Clin Exp Immunol**, v. 65, n. 1, p. 10-8, Jul 1986.

KENNEDY, P. G. Diagnostic and neuropathogenesis issues in human African trypanosomiasis. **Int J Parasitol**, v. 36, n. 5, p. 505-12, May 1 2006.

_____. Clinical features, diagnosis, and treatment of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). **Lancet Neurol**, v. 12, n. 2, p. 186-94, Feb 2013.

KOHL, L. et al. Assembly of the paraflagellar rod and the flagellum attachment zone complex during the *Trypanosoma brucei* cell cycle. **J Eukaryot Microbiol**, v. 46, n. 2, p. 105-9, Mar-Apr 1999.

KONTROGIANNI-KONSTANTOPOULOS, A.; BLOCH, R. J. Obscurin: a multitasking muscle giant. **J Muscle Res Cell Motil**, v. 26, n. 6-8, p. 419-26, 2005.

KOSTER, S. et al. Intermediate filament mechanics in vitro and in the cell: from coiled coils to filaments, fibers and networks. **Curr Opin Cell Biol**, v. 32, p. 82-91, Feb 2015.

LABEIT, S.; KOLMERER, B. Titins - Giant Proteins in Charge of Muscle Ultrastructure and Elasticity. **Science**, v. 270, n. 5234, p. 293-296, Oct 13 1995.

LACOMBLE, S. et al. A *Trypanosoma brucei* protein required for maintenance of the flagellum attachment zone and flagellar pocket ER domains. **Protist**, v. 163, n. 4, p. 602-15, Jul 2012.

LACOUNT, D. J. et al. *Trypanosoma brucei* FLA1 is required for flagellum attachment and cytokinesis. **J Biol Chem**, v. 277, n. 20, p. 17580-8, May 17 2002.

LANGOUSIS, G.; HILL, K. L. Motility and more: the flagellum of *Trypanosoma brucei*. **Nat Rev Microbiol**, v. 12, n. 7, p. 505-18, Jul 2014.

LEJON, V. et al. Human African trypanosomiasis. **Handb Clin Neurol**, v. 114, p. 169-81, 2013.

LUPAS, A. et al. Predicting coiled coils from protein sequences. **Science**, v. 252, n. 5009, p. 1162-4, May 24 1991.

MANABE, T. et al. Connectin, giant elastic protein, in giant sarcomeres of crayfish claw muscle. **J Muscle Res Cell Motil**, v. 14, n. 6, p. 654-65, Dec 1993.

MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure. **Nucleic Acids Res**, v. 41, n. Database issue, p. D348-52, Jan 2013.

MASLOV, D. A. et al. Phylogeny of trypanosomes as inferred from the small and large subunit rRNAs: Implications for the evolution of parasitism in the trypanosomatid protozoa. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 75, n. 2, p. 197-205, Jan 1996.

MASLOV, D. A. et al. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed. **Trends Parasitol**, v. 29, n. 1, p. 43-52, Jan 2013.

MATTEI, D. et al. Pfl I-I and Pf332: two giant proteins synthesized in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. **Parasitol Today**, v. 8, n. 12, p. 426-8, Dec 1992.

MATTHEWS, K. R. The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. **J Cell Sci**, v. 118, n. Pt 2, p. 283-90, Jan 15 2005.

MAY, S. F. et al. The *Trypanosoma brucei* AIR9-like protein is cytoskeleton-associated and is required for nucleus positioning and accurate cleavage furrow placement. **Mol Microbiol**, v. 84, n. 1, p. 77-92, Apr 2012.

MCALLASTER, M. R. et al. Proteomic identification of novel cytoskeletal proteins associated with TbPLK, an essential regulator of cell morphogenesis in *Trypanosoma brucei*. **Mol Biol Cell**, v. 26, n. 17, p. 3013-29, Sep 1 2015.

MONNERAT, S. et al. Searching for novel cell cycle regulators in *Trypanosoma brucei* with an RNA interference screen. **BMC Res Notes**, v. 2, p. 46, 2009.

MOREIRA, B. P. et al. **Giant FAZ10 is required for flagellum attachment zone stabilization and cleavage furrow positioning in trypanosome**: Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo 2016. Sob revisão.

MOREIRA, J. E. et al. Accumulation and localization of two adult acinar cell secretory proteins during development of the rat submandibular gland. **Am J Anat**, v. 191, n. 2, p. 167-84, Jun 1991.

MORRISWOOD, B. et al. Novel bilobe components in *Trypanosoma brucei* identified using proximity-dependent biotinylation. **Eukaryot Cell**, v. 12, n. 2, p. 356-67, Feb 2013.

MORRISWOOD, B. et al. The bilobe structure of *Trypanosoma brucei* contains a MORN-repeat protein. **Mol Biochem Parasitol**, v. 167, n. 2, p. 95-103, Oct 2009.

MULLER, N. et al. Identification and characterization of two repetitive non-variable antigens from African trypanosomes which are recognized early during infection. **Parasitology**, v. 104 Pt 1, p. 111-20, Feb 1992.

NAPOLI, C. et al. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. **Plant Cell**, v. 2, n. 4, p. 279-289, Apr 1990.

NGO, H. et al. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 25, p. 14687-92, Dec 8 1998.

NOZAKI, T. et al. Characterization of the *Trypanosoma brucei* homologue of a *Trypanosoma cruzi* flagellum-adhesion glycoprotein. **Mol Biochem Parasitol**, v. 82, n. 2, p. 245-55, Nov 25 1996.

OBERHOLZER, M. et al. Independent analysis of the flagellum surface and matrix proteomes provides insight into flagellum signaling in mammalian-infectious *Trypanosoma brucei*. **Mol Cell Proteomics**, v. 10, n. 10, p. M111 010538, Oct 2011.

OGBADOYI, E. O. et al. A high-order trans-membrane structural linkage is responsible for mitochondrial genome positioning and segregation by flagellar basal bodies in trypanosomes. **Mol Biol Cell**, v. 14, n. 5, p. 1769-79, May 2003.

OVERATH, P.; ENGSTLER, M. Endocytosis, membrane recycling and sorting of GPI-anchored proteins: *Trypanosoma brucei* as a model system. **Mol Microbiol**, v. 53, n. 3, p. 735-44, Aug 2004.

PADMAKUMAR, V. C. et al. Enaptin, a giant actin-binding protein, is an element of the nuclear membrane and the actin cytoskeleton. **Exp Cell Res**, v. 295, n. 2, p. 330-9, May 1 2004.

PAL, A. et al. Differential endocytic functions of *Trypanosoma brucei* Rab5 isoforms reveal a glycosylphosphatidylinositol-specific endosomal pathway. **J Biol Chem**, v. 277, n. 11, p. 9529-39, Mar 15 2002.

PAYS, E. The variant surface glycoprotein as a tool for adaptation in African trypanosomes. **Microbes Infect**, v. 8, n. 3, p. 930-7, Mar 2006.

PELIN, K. et al. Mutations in the nebulin gene associated with autosomal recessive nemaline myopathy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 5, p. 2305-10, Mar 2 1999.

PETERSEN, C. et al. The gene product of the *Plasmodium falciparum* 11.1 locus is a protein larger than one megadalton. **Mol Biochem Parasitol**, v. 42, n. 2, p. 189-95, Sep-Oct 1990.

PODLIPAEV, S. A. Catalogue of the world fauna of protozoa of the family Trypanosomatidae. **Trudy Zoologicheskii Institut, Akademii Nauk**, n. 217, 1990.

PORTMAN, N.; GULL, K. The paraflagellar rod of kinetoplastid parasites: from structure to components and function. **Int J Parasitol**, v. 40, n. 2, p. 135-48, Feb 2010.

QIAO, X. et al. Sorting signals required for trafficking of the cysteine-rich acidic repetitive transmembrane protein in *Trypanosoma brucei*. **Eukaryot Cell**, v. 5, n. 8, p. 1229-42, Aug 2006.

RALSTON, K. S. et al. Flagellar motility contributes to cytokinesis in *Trypanosoma brucei* and is modulated by an evolutionarily conserved dynein regulatory system. **Eukaryot Cell**, v. 5, n. 4, p. 696-711, Apr 2006.

RAPER, J. et al. Characterization of a novel trypanosome lytic factor from human serum. **Infect Immun**, v. 67, n. 4, p. 1910-6, Apr 1999.

RAUCH, A. et al. Computational Proteomics Analysis System (CPAS): an extensible, open-source analytic system for evaluating and publishing proteomic data and high throughput biological experiments. **J Proteome Res**, v. 5, n. 1, p. 112-21, Jan 2006.

REDMOND, S. et al. RNAit: an automated web-based tool for the selection of RNAi targets in *Trypanosoma brucei*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 128, n. 1, p. 115-8, Apr 25 2003.

REY, L. **Parasitologia**. 4a ed. 2008. 930.

RIFKIN, M. R. Identification of the trypanocidal factor in normal human serum: high density lipoprotein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 75, n. 7, p. 3450-4, Jul 1978.

ROBINSON, D. R.; GULL, K. Basal body movements as a mechanism for mitochondrial genome segregation in the trypanosome cell cycle. **Nature**, v. 352, n. 6337, p. 731-3, Aug 22 1991.

ROBINSON, D. R. et al. Microtubule polarity and dynamics in the control of organelle positioning, segregation, and cytokinesis in the trypanosome cell cycle. **J Cell Biol**, v. 128, n. 6, p. 1163-72, Mar 1995.

ROTUREAU, B. et al. Flagellar adhesion in *Trypanosoma brucei* relies on interactions between different skeletal structures in the flagellum and cell body. **J Cell Sci**, v. 127, n. Pt 1, p. 204-15, Jan 1 2014.

ROTUREAU, B. et al. Molecular bases of cytoskeleton plasticity during the *Trypanosoma brucei* parasite cycle. **Cell Microbiol**, v. 13, n. 5, p. 705-16, May 2011.

RUIZ-MORENO, L. et al. *Trypanosoma cruzi*: monoclonal antibody to cytoskeleton recognizes giant proteins of the flagellar attachment zone. **Exp Parasitol**, v. 80, n. 4, p. 605-15, Jun 1995.

SAIDE, J. D. Identification of a connecting filament protein in insect fibrillar flight muscle. **J Mol Biol**, v. 153, n. 3, p. 661-79, Dec 15 1981.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning, a laboratory manual**. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

SANT'ANNA, C. et al. Improvement on the visualization of cytoskeletal structures of protozoan parasites using high-resolution field emission scanning electron microscopy (FESEM). **Histochem Cell Biol**, v. 124, n. 1, p. 87-95, Jul 2005.

SELVAPANDIYAN, A. et al. Centrin1 is required for organelle segregation and cytokinesis in *Trypanosoma brucei*. **Mol Biol Cell**, v. 18, n. 9, p. 3290-301, Sep 2007.

SELVAPANDIYAN, A. et al. Role of centrins 2 and 3 in organelle segregation and cytokinesis in *Trypanosoma brucei*. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e45288, 2012.

SHAPIRO, T. A.; ENGLUND, P. T. The structure and replication of kinetoplast DNA. **Annu Rev Microbiol**, v. 49, p. 117-43, 1995.

SHERWIN, T.; GULL, K. The cell division cycle of *Trypanosoma brucei brucei*: timing of event markers and cytoskeletal modulations. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 323, n. 1218, p. 573-88, Jun 12 1989.

SHI, J. et al. Centrin4 coordinates cell and nuclear division in *T. brucei*. **J Cell Sci**, v. 121, n. Pt 18, p. 3062-70, Sep 15 2008.

SIEVERS, F. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Mol Syst Biol**, v. 7, p. 539, 2011.

SIMPSON, A. G.; ROGER, A. J. Protein phylogenies robustly resolve the deep-level relationships within Euglenozoa. **Mol Phylogenet Evol**, v. 30, n. 1, p. 201-12, Jan 2004.

SIMPSON, L. The Kinetoplast of Hemoflagellates. **International Review of Cytology**, v. 32, p. 9, 1972.

SPRINGER, A. L. et al. Silencing of a putative inner arm dynein heavy chain results in flagellar immotility in *Trypanosoma brucei*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 175, n. 1, p. 68-75, Jan 2011.

STEVERDING, D. et al. Transferrin-binding protein complex is the receptor for transferrin uptake in *Trypanosoma brucei*. **J Cell Biol**, v. 131, n. 5, p. 1173-82, Dec 1995.

SUBOTA, I. et al. Proteomic analysis of intact flagella of procyclic *Trypanosoma brucei* cells identifies novel flagellar proteins with unique sub-localization and dynamics. **Mol Cell Proteomics**, v. 13, n. 7, p. 1769-86, Jul 2014.

SUN, S. Y. et al. An intracellular membrane junction consisting of flagellum adhesion glycoproteins links flagellum biogenesis to cell morphogenesis in *Trypanosoma brucei*. **J Cell Sci**, v. 126, n. Pt 2, p. 520-31, Jan 15 2013.

SUNTER, J. D. et al. Modulation of flagellum attachment zone protein FLAM3 and regulation of the cell shape in *Trypanosoma brucei* life cycle transitions. **J Cell Sci**, v. 128, n. 16, p. 3117-30, Aug 15 2015a.

SUNTER, J. D.; GULL, K. The Flagellum Attachment Zone: 'The Cellular Ruler' of Trypanosome Morphology. **Trends Parasitol**, v. 32, n. 4, p. 309-24, Apr 2016.

SUNTER, J. D. et al. A dynamic coordination of flagellum and cytoplasmic cytoskeleton assembly specifies cell morphogenesis in trypanosomes. **J Cell Sci**, v. 128, n. 8, p. 1580-94, Apr 15 2015b.

SVITKINA, T. M. et al. Plectin sidearms mediate interaction of intermediate filaments with microtubules and other components of the cytoskeleton. **J Cell Biol**, v. 135, n. 4, p. 991-1007, Nov 1996.

TAMURA, K. et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol Biol Evol**, v. 24, n. 8, p. 1596-9, Aug 2007.

URBANIAK, M. D. et al. Comparative SILAC proteomic analysis of *Trypanosoma brucei* bloodstream and procyclic lifecycle stages. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e36619, 2012.

VANHAMME, L. et al. Apolipoprotein L-I is the trypanosome lytic factor of human serum. **Nature**, v. 422, n. 6927, p. 83-7, Mar 6 2003.

VANHOLLEBEKE, B. et al. A haptoglobin-hemoglobin receptor conveys innate immunity to *Trypanosoma brucei* in humans. **Science**, v. 320, n. 5876, p. 677-81, May 2 2008.

VAUGHAN, S. et al. A repetitive protein essential for the flagellum attachment zone filament structure and function in *Trypanosoma brucei*. **Protist**, v. 159, n. 1, p. 127-36, Jan 2008.

VICKERMAN, K. The mechanism of cyclical development in trypanosomes of the *Trypanosoma brucei* sub-group: an hypothesis based on ultrastructural observations. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 56, p. 487-95, Nov 1962.

VOTYPKA, J. et al. New Approaches to Systematics of Trypanosomatidae: Criteria for Taxonomic (Re)description. **Trends Parasitol**, v. 31, n. 10, p. 460-9, Oct 2015.

WANG, K. Purification of titin and nebulin. **Methods Enzymol**, v. 85 Pt B, p. 264-74, 1982.

_____. Cytoskeletal matrix in striated muscle: the role of titin, nebulin and intermediate filaments. **Adv Exp Med Biol**, v. 170, p. 285-305, 1984.

WANG, K. et al. Titin: major myofibrillar components of striated muscle. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 76, n. 8, p. 3698-702, Aug 1979.

WANG, K.; WILLIAMSON, C. L. Identification of an N2 line protein of striated muscle. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 77, n. 6, p. 3254-8, Jun 1980.

WANG, M. et al. An interplay between Centrin2 and Centrin4 on the bi-lobed structure in *Trypanosoma brucei*. **Mol Microbiol**, v. 83, n. 6, p. 1153-61, Mar 2012.

WEI, Y. et al. Centrin3 in trypanosomes maintains the stability of a flagellar inner-arm dynein for cell motility. **Nat Commun**, v. 5, p. 4060, 2014.

WHEELER, R. J. et al. Flagellar pocket restructuring through the *Leishmania* life cycle involves a discrete flagellum attachment zone. **J Cell Sci**, v. 129, n. 4, p. 854-67, Feb 15 2016.

WHO. Control and surveillance of African trypanosomiasis. Report of a WHO Expert Committee. **World Health Organ Tech Rep Ser**, v. 881, p. I-VI, 1-114, 1998.

_____. Human African trypanosomiasis (sleeping sickness): epidemiological update. **Wkly Epidemiol Rec**, v. 81, n. 8, p. 71-80, Feb 24 2006.

_____. Control and surveillance of human African trypanosomiasis. **World Health Organ Tech Rep Ser**, n. 984, p. 1-237, 2013.

WICKSTEAD, B. et al. Targeting of a tetracycline-inducible expression system to the transcriptionally silent minichromosomes of *Trypanosoma brucei*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 125, n. 1-2, p. 211-6, Nov-Dec 2002.

WIRTZ, E. et al. A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 99, n. 1, p. 89-101, Mar 15 1999.

WITT, C. C. et al. Nebulin regulates thin filament length, contractility, and Z-disk structure in vivo. **EMBO J**, v. 25, n. 16, p. 3843-55, Aug 23 2006.

WOODS, K. et al. Identification and characterization of a stage specific membrane protein involved in flagellar attachment in *Trypanosoma brucei*. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e52846, 2013.

ZHANG, Q. et al. The nesprins are giant actin-binding proteins, orthologous to *Drosophila melanogaster* muscle protein MSP-300. **Genomics**, v. 80, n. 5, p. 473-81, Nov 2002.

ZHOU, Q. et al. A comparative proteomic analysis reveals a new bi-lobe protein required for bi-lobe duplication and cell division in *Trypanosoma brucei*. **PLoS One**, v. 5, n. 3, p. e9660, 2010.

ZHOU, Q. et al. Assembly and maintenance of the flagellum attachment zone filament in *Trypanosoma brucei*. **J Cell Sci**, v. 128, n. 13, p. 2361-72, Jul 1 2015.

ZHOU, Q. et al. An EF-hand-containing Protein in *Trypanosoma brucei* Regulates Cytokinesis Initiation by Maintaining the Stability of the Cytokinesis Initiation Factor C1F1. **J Biol Chem**, v. 291, n. 28, p. 14395-409, Jul 8 2016.

ZHOU, Q. et al. A coiled-coil- and C2-domain-containing protein is required for FAZ assembly and cell morphology in *Trypanosoma brucei*. **J Cell Sci**, v. 124, n. Pt 22, p. 3848-58, Nov 15 2011.