

INSTITUTO CARLOS CHAGAS – FIOCRUZ/PR
MESTRADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA

CAROLINE DE MORAES DE SIQUEIRA

CARACTERIZAÇÃO DA HISTONA DESACETILASE 2 (TGHDAC2) DE
TOXOPLASMA GONDII

CURITIBA

2018



INSTITUTO CARLOS CHAGAS
Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia

CAROLINE DE MORAES DE SIQUEIRA

Caracterização da Histona Desacetilase 2 (TgHDAC2) de *Toxoplasma gondii*

Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto Carlos Chagas/Fiocruz-PR, como parte dos requisitos a obtenção título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientadora: Dr.^a Sheila Cristina Nardelli

CURITIBA/PR

2018

Siqueira, Caroline de Moraes de .

CARACTERIZAÇÃO DA HISTONA DESACETILASE 2 (TGHDAC2) DE TOXOPLASMA GONDII / Caroline de Moraes de Siqueira. - Curitiba, 2018.
109 f.; il.

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

Orientadora: Sheila Cristina Nardelli.

Bibliografia: f. 101-109

1. Toxoplasma gondii. 2. Epigenética. 3. Modificações em histonas. 4. HDACs. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Ata da sessão pública de exame de dissertação para obtenção do grau de
Mestre em Biociências e Biotecnologia



Ata da Sessão Pública de exame de dissertação para obtenção do grau de Mestre em
Biociências e Biotecnologia.

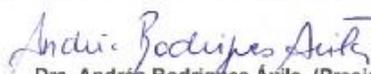
Aos 19 dias do mês de fevereiro de dois mil e dezoito, às 14 horas, nas dependências do Instituto Carlos Chagas/Fiocruz Paraná, reuniu-se a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, composta pelos Professores: Dra. Andréa Rodrigues Ávila, Dra. Letusa Albrecht e Dra. Giseli Klassen, com a finalidade de julgar a dissertação da candidata **Caroline de Moraes de Siqueira**, intitulada: "**Caracterização da histona desacetilase 2 (HDAC2) de *Toxoplasma gondii***", sob a orientação de Dra. Sheila Cristina Nardelli, **para** obtenção do grau de **Mestre** em Biociências e Biotecnologia. A candidata teve até 45 (quarenta e cinco) minutos para a apresentação, e cada examinador teve um tempo máximo de arguição de 30 (trinta) minutos, seguido de 30 (trinta) minutos para resposta do(a) candidato(a) ou de 60 (sessenta) minutos quando houve diálogo na arguição. O desenvolvimento dos trabalhos seguiu o roteiro de sessão de defesa, estabelecido pela Coordenação do Programa, com abertura, condução e encerramento da sessão solene de defesa feito pelo Presidente **Dra. Andréa Rodrigues Ávila**. Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros da banca examinadora deliberaram pela:

() Aprovação da dissertação por unanimidade

Aprovação somente após satisfazer as exigências de modificações no prazo fixado pela banca (não superior a noventa dias).

() Reprovação da dissertação

Na forma regulamentar foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da banca, na ordem acima determinada, e pela candidata.


Dra. Andréa Rodrigues Ávila (Presidente) - ICC /Fiocruz-Pr

Curitiba, 19 de fevereiro de 2018


Dra. Letusa Albrecht – ICC/Fiocruz-Pr


Dra. Giseli Klassen- UFPR


Candidato(a): Caroline de Moraes de Siqueira

+55(41)3316-3230

Rua Prof. Algacyr Munhoz Mader, 3775 - CIC 81350-010 Curitiba/PR, Brasil

*Dedico esta dissertação a minha mãe e
irmã, meus pilares na vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me fazer acreditar e confiar que tudo daria certo.

Agradeço a minha mãe Ana, que me apoiou, encorajou, ouviu meus desabafos e esteve ao meu lado quando precisei. Minha irmã, Ana Paula, por toda ajuda, apoio e amizade. Ao meu querido Elisson, que foi meu refúgio e também meu porto seguro em todos os momentos. Ao meu pai *in memoriam*, pois sempre me inspirou a dar o melhor de mim.

A minha orientadora Sheila, que além de me orientar da melhor forma possível, teve paciência, e dedicação e mais do que isso, gostaria de agradecer pela amizade sincera. A Tatiana Brasil, que me ajudou em todas as etapas do trabalho com a proteína, sempre presente e solícita.

Aos amigos que fiz no Laboratório de Regulação da Expressão Gênica, em especial a Mari e Vanessa, com quem eu sempre pude contar, além dos experimentos, quero agradecer pela amizade e companheirismo. A Sayuri, Rodrigo, Patrícia e Larissa pelas risadas e conversas estimulantes. A todos os colegas do laboratório que me ajudaram, sem dúvida todos foram parte importante para mim.

A Devânia por todo auxílio com cultivo de células. A equipe de preparo de materiais, pois foram essenciais na realização deste projeto. Também agradeço ao Laboratório e a Plataforma de Purificação de Proteínas, ao Laboratório de Biologia Básica de Células-Tronco, ao Laboratório de Biologia Molecular de Tripanossomatídeos e ao Instituto Carlos Chagas como um todo.

A Priscila Hiraiwa, da plataforma de citometria de fluxo, por toda dedicação, auxílio e cuidado com os experimentos de ciclo celular. A Beatriz Borges e Tabata Klimeck, da plataforma de microscopia, quero agradecer pelas lindas fotos tiradas ao microscópio e, por todo auxílio com o preparo das amostras.

Agradeço a Carol Elias do Instituto Butantan pela disponibilidade em contribuir para este trabalho e por me receber em seu grupo. A Loyze, Chris e Marcelo do Laboratório Especial de Ciclo Celular do Instituto Butantan pelo acolhimento, auxílio durante os experimentos e pelas valorosas discussões.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, as agências de fomento e a Raquel por todo o suporte, carinho e auxílio no decorrer desta jornada.

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram na conclusão deste trabalho.

Muito obrigada!

“Você nunca sabe que resultados virão da sua ação. Mas se você não fizer nada não existirão resultados” (Mahatma Gandhi)

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

CARACTERIZAÇÃO DA HISTONA DESACETILASE 2 (TgHDAC2) DE *TOXOPLASMA GONDII*

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Caroline de Moraes de Siqueira

A desacetilação de histonas é uma forma de regulação epigenética que está associada ao silenciamento gênico, uma vez que a remoção de grupos acetil por histona desacetilases (HDACs) resultam em uma cromatina mais condensada. Em *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) pouco se sabe sobre estas enzimas, mas acredita-se que elas são uma parte essencial da regulação da expressão gênica. *T. gondii* possui 7 HDACs, incluindo TgHDAC2, o objeto do nosso estudo. Embora seja considerada uma HDAC clássica de classe I, muito semelhante a outros eucariotos, a TgHDAC2 possui duas inserções aminoacídicas dentro do domínio HDAC característico, algo exclusivo de alguns membros do filo Apicomplexa, e cuja função permanece desconhecida. Além disso, resultados de RNA-seq depositados na base de dados de *T. gondii* mostram um aumento da expressão de TgHDAC2 durante a fase S do ciclo celular. Para caracterizá-la, obtivemos o nocaute de *tghdac2*, o qual foi substituído pelo gene *hxgprt* através de recombinação homóloga. Até o momento, observamos menor infectividade e taxa de proliferação de parasitas $\Delta tghdac2$, sugerindo um papel durante a progressão do ciclo celular, possivelmente durante a fase S. Também notamos que os parasitas $\Delta tghdac2$ se apresentavam desorganizados no vacúolo parasitóforo, possivelmente devido a defeitos no ciclo celular. Para confirmar estas hipóteses, foi feita uma análise de ciclo celular por citometria de fluxo, onde observamos enriquecimento de parasitas nocaute na fase S do ciclo celular, além de maior taxa de incorporação de EdU evidenciando algum defeito ou atraso nesta fase. Com o objetivo de analisar o nível de acetilação de histonas conservadas nos parasitas $\Delta tghdac2$, foram feitos ensaios de Western blot para histonas H3 e H4 acetiladas, porém não mostraram diferenças estatísticas nos níveis de acetilação na ausência de TgHDAC2, indicando que ela não é responsável por desacetilar estas histonas. Contudo, não podemos descartar que a TgHDAC2 possa ter outras histonas como alvo ou ainda outros substratos. Além disso, dados de dicroísmo circular foram realizados a fim de desvendar a estrutura secundária das inserções aminoacídicas presentes no domínio HDAC, e indicaram que ela é uma proteína enovelada, monomérica e estável até em altas temperaturas. O etiquetamento da proteína endógena não obteve sucesso, não sendo possível a detecção por Western Blot ou imunofluorescência. Entretanto, a superexpressão de TgHDAC2 mostrou uma localização celular nuclear em ensaios de imunofluorescência, contudo a fusão com a etiqueta de GFP não pode ser detectada por Western Blot. Apesar da necessidade de mais experimentos, nossos dados sugerem uma função na progressão do ciclo celular possivelmente na replicação do DNA.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*. Epigenética. Modificações em histonas. HDACs.

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

CARACTERIZAÇÃO DA HISTONA DESACETILASE 2 (TgHDAC2) DE *TOXOPLASMA GONDII*

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Caroline de Moraes de Siqueira

Histone deacetylation is a form of epigenetic regulation that is associated with gene silencing, since the removal of acetyl groups by histone deacetylases (HDACs) results in a more condensed chromatin. In *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) little is known about these enzymes, but they are believed to be an essential part of the regulation of gene expression. *T. gondii* has 7 HDACs, including TgHDAC2, the object of our study. Although TgHDAC2 is considered a classic class I HDAC, very similar to other eukaryotes, TgHDAC2 has two amino acid insertions within the characteristic HDAC domain, which is unique to some members of the Apicomplexa phylum and whose function remains unknown. In addition, available transcription expression data show an increase in TgHDAC2 expression during the S phase of the cell cycle. To characterize it, we obtained the knockout of *tghdac2*, which was replaced by the *hxgprt* gene by homologous recombination. To date, we have observed lower infectivity and proliferation rate of Δ *tghdac2* parasites, suggesting a role during cell cycle progression, possibly during S phase. We also noticed that Δ *tghdac2* parasites were disorganized in the parasitoid vacuole, possibly due to defects in the cell cycle. To confirm these hypotheses, a cell cycle analysis was performed by flow cytometry, where we observed enrichment of knockout parasites in the S phase of the cell cycle, in addition to a higher incorporation rate of EdU showing some defect or delay in this phase. In order to analyze the level of histone acetylation conserved in Δ *tghdac2* parasites, Western blot assays were performed for histone H3 and H4 acetylated, but did not show statistical differences in acetylation levels in the absence of TgHDAC2, indicating that it is not responsible for deacetylating these residues. However, we cannot rule out that TgHDAC2 may have other target histones or other substrates. In addition, circular dichroism analysis was performed on the recombinant TgHDAC2 in order to uncover the secondary structure of the amino acid inserts present in the HDAC domain, and indicated that it is a monomeric, enveloped protein and stable even at high temperatures. The tagging of the endogenous protein was not successful and it was not possible to detect by Western Blot or immunofluorescence. However, the overexpression of GFP-tagged TgHDAC2 showed a nuclear cell localization in immunofluorescence assays, however, it could not be detected by Western Blot. Although further experiments are undergoing in the lab, our preliminary data suggest a role in cell cycle progression, possibly by interfering in DNA replication.

Keywords: *Toxoplasma gondii*. Epigenetics. Histone modification. HDACs.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1.1 - Ultraestrutura do taquizoíta de <i>T. gondii</i>	19
FIGURA 1.2 - Soroprevalência da toxoplasmose no mundo.....	20
FIGURA 1.3 – Esquema ilustrativo do ciclo de vida do <i>T. gondii</i> nos hospedeiros definitivos (felinos) e intermediários (mamíferos e aves).	23
FIGURA 1.4 - Níveis de regulação gênica.	27
FIGURA 1.5 - Classificação das HDACs.....	32
FIGURA 1.6 - Modificações pós-traducionais encontradas em <i>T. gondii</i>	34
FIGURA 3.1 - Vetor pLIC.HA.HXGPRT.....	43
FIGURA 3.2 - Esquema de funcionamento da clonagem pela plataforma Gateway.	45
FIGURA 3.3 - Mapa do vetor pDest17.	46
FIGURA 3.4 – Vetor de superexpressão.....	47
FIGURA 3.5 - Representação da estratégia para o nocaute da <i>tghdac2</i> no genoma do parasita.....	56
FIGURA 4.1 - Expressão de TgHDAC2 ao longo do ciclo celular.	63
FIGURA 4.2 - Dados de transcriptoma durante a invasão	64
FIGURA 4.3 - Alinhamento das sequências.....	65
FIGURA 4.4 - Obtenção do cassete gênico para o nocaute.	67
FIGURA 4.5 – Esquema das PCRs utilizadas para confirmação da população transfectada.....	68
FIGURA 4.6 - Confirmação do nocaute gênico.	68
GRÁFICO 4.1 - Ensaio de formação de placa.....	70
FIGURA 4.7- Placas de lise formadas após invasão e replicação de células HFF por taquizoítas.....	71
GRÁFICO 4.2 – Ensaio de invasão.....	72
GRÁFICO 4.3 - Ensaio de replicação.....	72
FIGURA 4.8 - Análise de ciclo celular dos parasitas $\Delta tghdac2$	74
FIGURA 4.9 - Incorporação de EdU.....	76
GRÁFICO 4.5 - Intensidade de fluorescência de EdU	76
FIGURA 4.10 – Organização dos parasitas no vacúolo observados por MEV.....	77
FIGURA 4.11- Análise de Western blot para histonas H3 e H4 acetiladas.	78
GRÁFICO 4.6 – Histona H3 acetilada.	79
GRÁFICO 4.7 - Histona H4 acetilada.....	79

FIGURA 4.12 - Amplificação de parte do gene <i>tghdac2</i>	80
FIGURA 4.13 - Confirmação da clonagem para etiquetamento de <i>tghdac2</i>	81
FIGURA 4.14 - PCR para integração da etiqueta de HA.....	82
FIGURA 4.15 - Amplificação de <i>tghdac2</i> para superexpressão.	83
FIGURA 4.16 - Confirmação da clonagem para superexpressão.	83
FIGURA 4.17 – Superexpressão de TgHDAC2.....	84
FIGURA 4.18 - Amplificação de <i>tghdac2</i> para clonagem em sistema gateway.....	85
FIGURA 4.19 - Confirmação da clonagem e vetor pDonr 221	86
FIGURA 4.20 - PCR de colônia para confirmação da recombinação no vetor pDest17	86
FIGURA 4.21 - Teste de Expressão de TgHDAC2 recombinante.....	87
FIGURA 4.22 - TgHDAC2 após purificação por troca iônica.	88
GRÁFICO 4.8 - Análise da estrutura secundária de TgHDAC2 por dicroísmo circular.	90
GRÁFICO 4.9 - Estrutura secundária após desenovelamento térmico.	91
FIGURA 5.1 - Estrutura de TgHDAC2 feita por homologia de sequência	98

LISTA DE QUADROS

QUADRO 3.1 - <i>Primers</i> para clonagem no vetor pLIC.HA.HXGPRT.	41
QUADRO 3.2 - Sequência de <i>primers</i> utilizadas para clonagem na plataforma Gateway.	44
QUADRO 3.3 - Sequência de <i>primers</i> utilizados para clonagem no vetor de superexpressão.	48
QUADRO 3.4 - Endonucleases de restrição utilizadas.	50
QUADRO 3.5 - Lista de anticorpos primarios utilizados em Western Blot.	53
QUADRO 3.6 - Sequência de <i>primers</i> para PCR de fusão	56
QUADRO 3.7 - Sequência de <i>primers</i> para detecção do gene <i>hxgprt</i>	58
QUADRO 3.8 - Sequência de <i>primers</i> para confirmação do nocaute gênico.	58

LISTA DE SIGLAS

acetilCoA	- Acetyl Coenzima A
AP2	- Apetala 2
ATP	- Adenosina trifosfato
BrdU	- 5-bromo-2'-desoxiuridina
BSA	- Albumina do soro bovino
CDD	- <i>Conserved domain database</i>
CDK	- Ciclina dependente de quinase
cDNA	- DNA complementar
CRISPR-	- <i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats,</i>
Cas9	associado ao gene 9
DAPI	- 4'6'-diamidino-2-fenilindol
dCTP	- Desoxicitidina trifosfato
DD	- Domínio de desestabilização
dGTP	- Desoxiguanosina trifosfato
DMEM	- <i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DNMT	- Citosina-5 DNA metiltransferase
dNTP	- Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DTT	- 1,4-Dithiothreitol
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
EdU	- 5-ethinil-2'-desoxiuridina
EGTA	- Ácido etileno glicol tetra acético
FDA	- <i>US food and drug administration</i>
GFP	- Proteína verde fluorescente
GNAT	- GCN5 N-acetiltransferases
HA	- Hemaglutinina da influenza humana
HAT	- Histona acetiltransferase
HDAC	- Histona desacetilase
HEPES	- 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl] ethanesulfonic acid
HFF	- <i>Human foreskin-fibroblastos</i>
HIV	- Vírus da imunodeficiência humana
<i>hxpprt</i>	- Hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyl transferase

IBMP	- Instituto de biologia molecular do paraná
IFI	- Imunofluorescência indireta
IgG	- Imunoglobulina G
IMC	- Complexo interno de membrana
IMP	- Inosina monofosfato
IMPDH	- Inosine-5'-monofosfato desidrogenase
IPTG	- Isopropil β -D-1-thiogalactopyranoside
Kb	- Kilo bases
KD	- <i>Knock down</i>
kDa	- Kilo daltons
KO	- <i>Knock out</i>
LIC	- <i>Ligation independent cloning</i>
lncRNA	- Longos RNAs não codificantes
Meio LB	- Meio luria bertani
MEV	- Microscopia eletrônica de varredura
miRNAs	- Micro RNAs
MPT	- Modificação pós-traducional
mRNA	- RNA mensageiro
NAD ⁺	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NCBI	- <i>National center of biotechnology information</i>
NHEJ	- <i>Nonhomologous end joining</i>
pb	- Pares de base
PBS	- <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	- <i>Polymerase chain reaction</i>
PDTC	- Pyrrolidine dithiocarbamate
PFA	- Paraformaldeído
PMSF	- Phenylmethylsulfonyl fluoride
PRMT1	- Proteína arginina N-metiltransferase 1
RISC	- <i>RNA-induced silencing complex</i>
RNAi	- RNA de interferência
rpm	- Rotações por minuto
SAM	- S-adenil metionina
SFB	- Soro fetal bovino

SDS PAGE	- <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SIR2	- <i>Silent information regulator-2</i>
sRNAs	- <i>Small RNAs</i>
TA	- Tampão de Amostra
TBE	- Tris/Borato/EDTA
TrisHCl	- Trisaminometano ácido clorídrico
tRNA	- RNA transportador
U	- Unidade (de enzima)
UTR	- <i>Untranslated region</i>
V	- Volts
XMP	- Xantosina monofosfato

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	<i>TOXOPLASMA GONDII</i>	18
1.1.1	Toxoplasmose	20
1.1.2	Ciclo de Vida	22
1.1.3	Ciclo Celular	25
1.2	REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL EM EUCARIOTOS.....	26
1.2.1	Regulação Epigenética	28
1.3	REGULAÇÃO GÊNICA EM <i>T. gondii</i>	33
1.4	JUSTIFICATIVA.....	35
2	OBJETIVOS	37
2.1	GERAL:.....	37
2.2	ESPECÍFICOS:.....	37
3	MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1	CULTURA DE <i>TOXOPLASMA gondii</i>	38
3.2	EXTRAÇÃO DE DNA DE <i>T. gondii</i>	38
3.3	EXTRAÇÃO DE RNA E OBTENÇÃO DE DNA COMPLEMENTAR.....	38
3.4	ELETROFORESE	39
3.4.1	Eletroforese de DNA em gel de agarose	39
3.4.2	Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida	40
3.5	ANÁLISE COMPARATIVA DE SEQUÊNCIA.....	40
3.6	CLONAGENS	41
3.6.1	Clonagem em vetor pLIC.HA.HXGPRT	41
3.6.2	Clonagem em Vetor de clonagem pDONR™221 e de expressão pDEST™17	44
3.6.3	Superexpressão	47
3.7	TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA	49
3.8	SELEÇÃO DOS CLONES POSITIVOS	49
3.9	PRECIPITAÇÃO DE DNA.....	50
3.10	TRANSFEÇÃO EM <i>T. gondii</i>	51
3.11	ENSAIO DE IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA.....	51
3.12	WESTERN BLOT.....	52
3.13	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE	53

3.14	DICROÍSMO CIRCULAR E ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ.....	54
3.15	CARACTERIZAÇÃO DE PARASITAS $\Delta tghdac2$	55
3.15.1	Nocaute Gênico de <i>tghdac2</i>.....	55
3.15.2	Ensaio de formação de placa.....	59
3.15.3	Ensaio de replicação e invasão	60
3.15.4	Ciclo Celular por Citometria de fluxo	60
3.15.5	Ensaio de incorporação de EdU	61
3.15.6	Microscopia eletrônica de varredura.....	61
4	RESULTADOS	63
4.1	ANÁLISES <i>IN SILICO</i> DE TGHDAC2	63
4.2	CARACTERIZAÇÃO DE PARASITAS $\Delta tghdac2$	66
4.2.1	Construção de parasitas nocaute para o gene <i>tghdac2</i>.....	66
4.2.2	Análise do crescimento dos parasitas $\Delta tghdac2$ através de ensaio de formação de placas de lise.....	69
4.2.3	Avaliação do crescimento e invasão de parasitas $\Delta tghdac2$.....	71
4.2.4	Análise do ciclo celular através de citometria de fluxo e incorporação de EdU.....	73
4.2.5	Análise morfológica dos parasitas $\Delta tghdac2$ no interior dos vacúolos parasitóforos	76
4.2.6	Análise das acetilações das histonas H3 e H4.....	77
4.3	ETIQUETAMENTO DO GENE ENDÓGENO.....	79
4.3.1	Amplificação e confirmação de clones positivos	79
4.3.2	Confirmação de transfectantes expressando a etiqueta de HA.....	81
4.4	ANÁLISE DA SUPEREXPRESSÃO DE TGHDAC2	82
4.5	AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM NA PLATAFORMA GATEWAY	85
4.6	EXPRESSÃO DE TGHDAC2 EM SISTEMA BACTERIANO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	87
4.7	ANÁLISE DA ESTRUTURA DE TGHDAC2 RECOMBINANTE	89
5	DISCUSSÃO.....	92
6	CONCLUSÕES.....	100
	REFERÊNCIAS.....	101

1 INTRODUÇÃO

1.1 TOXOPLASMA GONDII

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) é um parasita intracelular obrigatório e o agente etiológico da toxoplasmose, uma doença cosmopolita que afeta cerca de ¼ da população mundial. *T. gondii* foi descrito há mais de 100 anos por dois grupos que trabalhavam com animais diferentes. Splendore (1908) identificou o parasita em coelhos no Brasil, enquanto que Nicolle e Manceaux (1908), descreveram o mesmo parasita no roedor *Ctenodactylus gundi*, no norte da África.

T. gondii pertence ao filo Apicomplexa juntamente com outros parasitas de importância médica e veterinária, como *Plasmodium spp*, causador da malária e *Cryptosporidium spp*, que pode causar graves diarreias em indivíduos imunocomprometidos (SOUZA et al, 2010). O filo Apicomplexa está presente dentro do grande grupo Alveolata, ao qual também fazem parte ciliados e dinoflagelados (ARISUE; HASHIMOTO, 2015). Parasitas desse filo são caracterizados por possuírem o complexo apical, um conjunto de organelas que nomeiam o filo, além da presença de microporos em algum estágio de vida, cílios ausentes e ciclo sexuado por singamia (LEVINE et al, 1980).

Róptrias e micronemas (FIGURA 1.1) são organelas secretórias que fazem parte do complexo apical, e são responsáveis por secretar moléculas importantes para a invasão do parasita na célula hospedeira (SOUZA et al, 2010). Nos micronemas são encontradas proteínas básicas, com domínios adesivos, como integrinas e trombospondinas, importantes na interação entre o parasita e a célula hospedeira (SOUZA et al, 2010). As oito róptrias presentes em *T. gondii* também contém proteínas básicas, que são secretadas logo após as proteínas dos micronemas no processo de invasão (SOUZA et al, 2010). Além destas, o complexo apical de *T. gondii* também possui estruturas especializadas de citoesqueleto, como o conóide, um conjunto de fibras em espiral com função mecânica durante a invasão (HU et al, 2006; BLADER et al 2015) e os anéis polares, que servem como um centro de organização de microtúbulos.

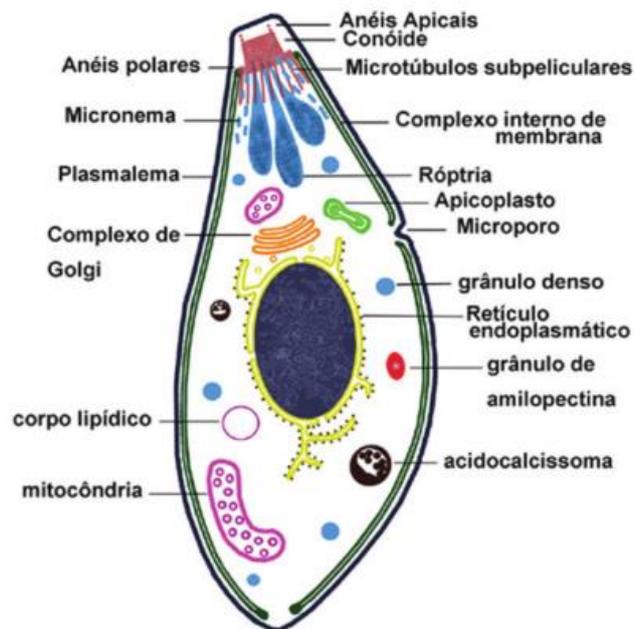


FIGURA 1.1 - ULTRAESTRUTURA DO TAQUIZOÍTA DE *T. GONDII*.

T. gondii possui as organelas secretórias, micronemas e róprias e estruturais, o conóide e os anéis polares, que fazem parte do complexo apical e desenvolvem papel importante durante a invasão à célula hospedeira. O apicoplasto é outra organela exclusiva de alguns membros do filo, onde acontece a síntese de diversos componentes de vias metabólicas, sendo essencial a sobrevivência do parasita.

FONTE: SOUZA et al. (2010)

Outra estrutura peculiar presente em *T. gondii* é o apicoplasto (em verde na FIGURA 1.1), um plastídio de origem endossimbiótica secundária, que ao contrário das organelas do complexo apical, não está presente em todos os membros do filo (KÖHLER, et al 1997; van DOOREN; STRIEPEN, 2013). O apicoplasto possui quatro membranas, o que sugere sua origem secundária, sendo que as duas membranas internas seriam do cloroplasto original, seguida da membrana de uma alga vermelha e por fim de um ancestral de Apicomplexa (DELWICHE; PALMER, 1997; SOUZA et al, 2010; van DOOREN; STRIEPEN, 2013). O apicoplasto também contém um DNA circular com 35 Kb, que codifica para proteínas de manutenção do apicoplasto, além de vias metabólicas essenciais para o parasita, como síntese de ácido graxos, isoprenóides e heme (LIM; MCFADDEN, 2010; van DOOREN; STRIEPEN, 2013).

T. gondii possui três principais formas de vida: os taquizoítas, que são formas invasivas e de rápida proliferação, presentes na fase aguda da doença; os bradizoítas, que pouco se replicam e estão presentes em cistos teciduais, formados

na fase crônica da toxoplasmose e os esporozoítos, presentes nos oocistos liberados no ambiente pelas fezes dos felinos (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

1.1.1 Toxoplasmose

A toxoplasmose é um problema de saúde pública mundial, pois em certas regiões do globo a soroprevalência pode chegar a mais de 60%, como é o caso do Brasil (PAPPAS, et al. 2009). As maiores incidências ocorrem nas regiões destacadas em vermelho na figura 1.2. A variação da incidência de *T. gondii* também pode ser afetada por fatores como hábitos alimentares, condição socioeconômica e qualidade sanitária (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

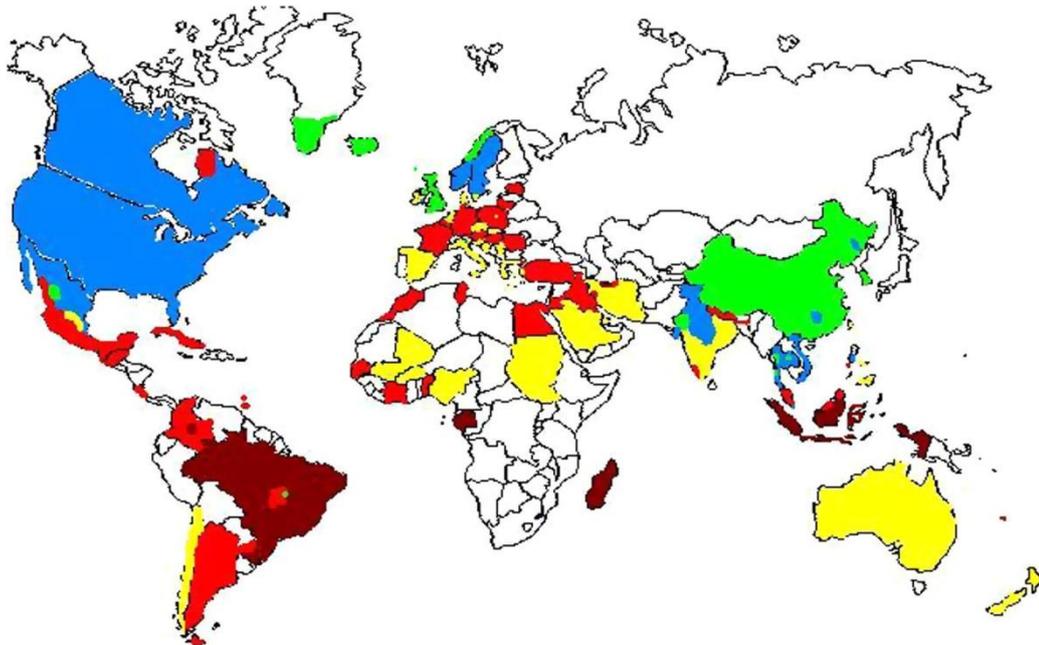


FIGURA 1.2 - SOROPREVALÊNCIA DA TOXOPLASMOSE NO MUNDO.

Vermelho escuro corresponde a prevalência igual ou acima de 60%, vermelho entre 40-60%, amarelo entre 20-40%, azul entre 10-20% e verde <10%. Os países em branco não apresentam dados disponíveis.

FONTE: PAPPAS, et al. (2009).

A transmissão da toxoplasmose para humanos ocorre principalmente pela ingestão de oocistos esporulados ou cistos teciduais, que são adquiridos através de carne, água ou alimentos contaminados, ou ainda através da transmissão transplacentária, transfusão sanguínea ou transplante de órgãos (MCAULEY, 2014). Cistos teciduais podem permanecer viáveis por até 11 dias sob refrigeração e só deixam de ser infectivos com o aquecimento acima de 67°C. Sendo assim, o

consumo de carne crua ou malcozida é uma das principais, senão a principal via de contaminação por *T. gondii* em diversos países (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

A toxoplasmose pode ser categorizada em quatro grupos, de acordo com o tipo de transmissão e manifestações clínicas que são importantes para o diagnóstico e tratamento: pacientes imunocompetentes, aquisição ou reativação em imunocomprometidos, toxoplasmose ocular e congênita (MCAULEY, 2014). Em indivíduos imunocompetentes, a toxoplasmose é geralmente assintomática, mas sintomas semelhantes a uma gripe podem ocorrer em cerca de 10% dos casos. Esses sintomas são normalmente contornados pelo sistema imune no decorrer de algumas semanas, fazendo com que o parasita fique latente em cistos teciduais, caracterizando a fase crônica (MCAULEY, 2014). Os cistos teciduais localizados especialmente no sistema nervoso, foram considerados por muitos anos inofensivos, mas atualmente têm sido relacionadas a outras doenças, como Alzheimer, esquizofrenia e outras desordens mentais ou comportamentais (KUSBECI, et al, 2011; ARIAS, et al, 2012).

Já em indivíduos imunodeficientes, a toxoplasmose costuma ser mais grave, apresentando miocardite, pneumonite ou encefalite. Além disso, a chance de reativação é maior nestes pacientes (GROOS; POHL, 1996; MCAULEY, 2014). A toxoplasmose ocular pode se desenvolver após aquisição congênita, ou como resultado de infecção aguda ou reativação. Os sintomas clínicos são lesões na retina, que podem levar a cegueira e em adultos é relacionada como manifestação tardia à infecção (MONTROYA; LISENFELD, 2004).

A toxoplasmose congênita é bastante grave, podendo trazer severas consequências ao feto. Sabe-se que quanto mais cedo (durante a gestação) ocorrer a infecção, mais grave pode ser ao feto, podendo levar inclusive a prematuridade ou ainda ao aborto espontâneo (MCAULEY, 2014). As manifestações clínicas mais comuns da toxoplasmose congênita são a coriorretinite (toxoplasmose ocular), calcificações intracranianas e hidrocefalia, sendo que em casos mais graves podem haver microcefalia, hepatoesplenomegalia, icterícia, convulsões e líquido cefalorraquidiano anormal (MCAULEY, 2014).

Gilbert et al (2008) comparou a severidade da toxoplasmose congênita em crianças brasileiras e europeias e concluiu que as crianças brasileiras têm cinco vezes mais chance de desenvolver toxoplasmose grave do que as crianças na

Europa, provavelmente devido à diversidade de cepas encontrados no Brasil. Enquanto que na Europa estão presentes principalmente as linhagens I, II e III, na América Central e do Sul são relatados genótipos atípicos, associadas com uma maior severidade da doença (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

O tratamento para toxoplasmose dura cerca de três semanas e consiste na administração de sulfadiazina e pirimetamina, associados também ao ácido fólico, que previne contra distúrbios hematológicos (NETO, 1982; ALDAY; DOGGET, 2017). Vale ressaltar que este tratamento é o mesmo há décadas, sendo eficiente apenas na fase aguda da doença. Além disso, o tratamento apresenta diversos efeitos colaterais, o que faz com que grande parte dos pacientes descontinuem o tratamento. Alguns compostos se mostraram promissões para o tratamento de cistos teciduais em camundongos (DOGGET et al, 2012; BENMERZOUGA et al, 2015), mas estudos pré-clínicos ainda não comprovaram a eficiência destes compostos.

Desta forma faz-se necessária a busca por novos alvos para um tratamento mais eficiente da toxoplasmose.

1.1.2 Ciclo de Vida

O ciclo de vida de *T. gondii* é complexo e alterna entre os hospedeiros definitivos, exclusivamente membros da família *Felidae*, onde ocorre a fase sexuada do ciclo e os hospedeiros intermediários, que podem ser aves e mamíferos, e onde acontece o ciclo assexuado (FIGURA 1.3) (BLACK; BOOTHROYD, 2000).

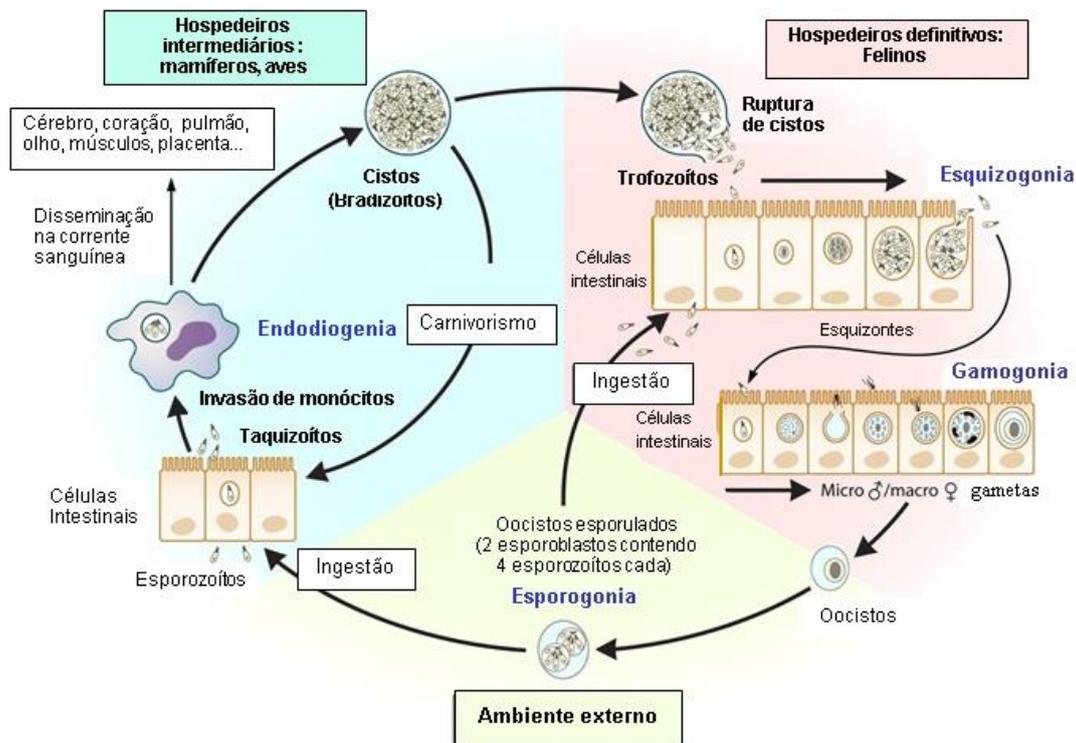


FIGURA 1.3 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DO CICLO DE VIDA DO *T. gondii* NOS HOSPEDEIROS DEFINITIVOS (FELINOS) E INTERMEDIÁRIOS (MAMÍFEROS E AVES).

FONTE: adaptado de ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012.

No hospedeiro definitivo, o ciclo se inicia quando um felino ingere normalmente formas bradizoítas (mas vale ressaltar que a infecção pode ocorrer no caso de ingestão de taquizoítas ou oocistos) de *T. gondii*. Ao caírem no sistema digestório, os cistos são dissolvidos pelo suco gástrico e os parasitas são liberados, onde invadem as células intestinais dando início a uma série de divisões celulares particulares, denominada esquizogonia (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Dentro do epitélio intestinal existem cinco fases de desenvolvimento pouco conhecidas, denominadas de A a E, seguidas da formação de gametas que acontece do terceiro até o décimo quinto dia após a ingestão dos cistos de bradizoítas (DUBEY, et al, 1998; DUBEY, 2010).

A gamogonia (formação de gametas) origina os macrogametas (feminino) e microgametas (masculino). Os microgametas são flagelados e vão em direção aos macrogametas para fazer a fertilização, dando origem ao zigoto (DUBEY, et al, 1998; DUBEY, 2010). Após a fertilização, uma bicamada proteica é formada em torno do zigoto, sendo denominado de oocisto (DUMÈTRE et al. 2013). O oocisto é

liberado nas fezes do animal para o meio ambiente, e após alguns dias começa o processo de esporogonia, um tipo especializado de meiose que leva a formação do cisto esporulado. Cada cisto esporulado contém dois esporoblastos, cada um contendo quatro esporozoítos haploides (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

Água, solo e alimentos podem ser contaminados pelos oocistos, e sua ingestão leva a infecção dos indivíduos. Quando os hospedeiros intermediários ingerem os oocistos, os esporozoítos são liberados e invadem o epitélio intestinal, onde se diferenciam em taquizoítas (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Os taquizoítas são formas de proliferação rápida, que se dividem por endodiogenia no interior do vacúolo parasitóforo, um processo onde as duas células-filhas emergem no interior da célula-mãe, que desaparece ao final da divisão. Cada etapa de divisão leva em média de 6 a 8 horas (*in vitro*), podendo chegar até a 128 parasitas por célula, quando é rompida liberando os parasitas para infectar as células adjacentes (BLACK; BOOTHROYD, 2000; DUBEY, 2010).

Entre 7 e 10 dias após a infecção, por pressão do sistema imune do hospedeiro, os taquizoítas se diferenciam em bradizoítas e formam cistos teciduais, localizados principalmente no sistema nervoso central e na musculatura esquelética e cardíaca (FERGUSON; HUTCHISON; SIIM, 1975; DUBEY, 2016). Os cistos são o estágio final do ciclo de vida de *T. gondii* nos hospedeiros intermediários, e podem permanecer latentes por toda a vida do hospedeiro (FERGUSON; HUTCHISON; SIIM, 1975; DUBEY, 2010).

Em alguns indivíduos pode ocorrer uma reativação espontânea e fazer com que os bradizoítas se diferenciem em taquizoítas, disseminando novamente a doença. Não se sabe ao certo como isso ocorre, mas indivíduos imunocomprometidos podem ter mais chance de ocorrência desse fenômeno (GROOS; POHL, 1996; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Shen e colaboradores (2016) em um estudo com camundongos, observaram que o aumento do estresse do hospedeiro leva a uma regulação negativa de citocinas, principalmente IL-12 e INF- γ , restringindo a infecção no estágio crônico, que poderia estar relacionado ao aumento da expressão de SAG-1 e outras proteínas do parasita que estariam associadas a interconversão de bradizoíta para taquizoíta.

1.1.3 Ciclo Celular

O ciclo celular de eucariotos compreende dois principais eventos: a duplicação do DNA (S) e a mitose (M), alternados com dois intervalos, chamados G1 e G2 (G = intervalo, do inglês *gap*). O ciclo celular é estritamente controlado e, portanto, em cada etapa existem pontos de checagem, assegurando que todos os eventos ocorram perfeitamente. Em *T. gondii* o ciclo celular é singular, compreendendo apenas as fases G1, S e M, sem qualquer evidência de que haja a fase G2 (RADKE et al, 2001; BLADER et al, 2015)

A fase G1 ocorre entre o final da fase M e início da fase S, sendo o momento em que há o crescimento da célula e duplicação das organelas para que a célula consiga se dividir sem comprometer o tamanho celular. Na maioria dos eucariotos há um ponto de checagem que avalia se o tamanho celular é apropriado e se o meio é favorável para prosseguir o ciclo celular. Experimentos utilizando PDTC (Pyrrolidine dithiocarbamate), um fármaco que aumenta a expressão de inibidores de CDKs (quinases dependentes de ciclinas), bloqueia o ciclo celular em G1 nas células de mamíferos, pois elas não atingem tamanho apropriado. Contudo, o mesmo não ocorre com *T. gondii*, visto que o ciclo prossegue e entra normalmente na fase S, indicando que neste parasita não existe este ponto de checagem (GUBBELS et al, 2008).

Outra característica interessante desta fase, é que ela é mais longa em *T. gondii* do que nos demais eucariotos, envolvendo cerca de 50 a 70% do tempo de divisão (RADKE et al, 2001). Além disso, Gaji et al (2011) observou que é nessa fase do ciclo que o parasita é mais invasivo e o egresso é mais eficiente.

Durante a fase S ocorre a duplicação do DNA, que inicia em locais específicos, denominadas origens de replicação (*ori*), que estão distribuídas ao longo da cadeia de DNA e possuem diferentes tempos de início (FERGUSON, et al, 1991; PRIOLEAU; McALPINE, 2016). As origens de replicação são reconhecidas pelo complexo de reconhecimento de origem, ORC (do inglês, *origin recognition complex*) (LEMAN; NOGUCHI, 2013; FRAGKOS et al, 2015; PRIOLEAU; McALPINE, 2016). Em muitos eucariotos as origens não possuem uma sequência consenso, sendo difícil identificá-las.

No final da fase G1, as proteínas Cdt1 e Cdc6, que estão associadas as oris, recrutam 6 membros da família de proteínas Mcm (2-7), formando o complexo de

pré-replicação, que para iniciar a replicação do DNA ainda devem recrutar outro conjunto de proteínas, as S-CDKs, dependentes da ciclina E, e Cdc7, já na fase S (TANAKA; KNAPP; NASMYTH, 1997; PRIOLEAU; McALPINE, 2016). Após múltiplos eventos de fosforilação e o recrutamento de todos os componentes do replissomo incluindo a DNA polimerase, há o início da replicação do DNA que é semiconservativa, indo da direção 5' para 3' em ambas as fitas, gerando os fragmentos de Okasaki na fita descontínua (FRAGKOS, et al, 2015).

Sabe-se que a progressão no ciclo celular é coordenada pelas CDKs e ciclinas. Em *T. gondii* foram encontradas ciclinas do tipo P, H, L e Y, enquanto que as ciclinas canônicas, essenciais para muitos eucariotos, não foram identificadas (ALVAREZ; SUVOROVA, 2017). As CDKs de *T. gondii* são chamadas Crks (do inglês, *Cdk-related kinases*) e também atuam no controle do ciclo em pontos de checagem, dos quais três são conservados com eucariotos, enquanto que outros dois são específicos do parasita (ALVAREZ; SUVOROVA, 2017).

A fase S de *T. gondii* possui peculiaridades, principalmente em sua distribuição. Sugere-se que a distribuição da fase S seja bimodal, uma vez que a quantidade de parasitas em S inicial (quantidade de DNA < 1,7n) é muito menor do que em S tardio (quantidade de DNA > 1,7n). Sendo assim, acredita-se que na fase S tardia (1,8n), a taxa de replicação do DNA é mais lenta (RADKE et al, 2001; BLADER et al, 2015), e interessantemente é neste momento que a célula filha começa o brotamento (HU et al., 2004; BLADER et al, 2015). Gubbels et al. (2008) propõe um ponto de checagem nesta fase, que asseguraria o tempo adequado de brotamento. Radke et al (2001) também confirmaram que a citocinese nem sempre ocorre após a conclusão da mitose e pode começar ainda na fase S.

O parasita é capaz de se dividir de 5 a 6 vezes dentro da célula hospedeira e completar o ciclo fora dela (HU et al., 2004), mas não consegue iniciar um novo ciclo se não estiver dentro do vacúolo parasitóforo, na célula hospedeira (GAJI et al, 2011).

1.2 REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL EM EUCARIOTOS

Em eucariotos, a expressão gênica é controlada em seis níveis, que vão desde o controle da transcrição no núcleo, até a inativação de proteínas no citoplasma (FIGURA 1.4), sendo muito organizado e envolvendo diversos elementos (ALBERTS et al, 2010). Dentre os vários mecanismos de regulação gênica, o

controle da transcrição é um dos mais interessantes, pois impede que o RNA seja transcrito e conseqüentemente que a proteína seja produzida, evitando gastos de energia.

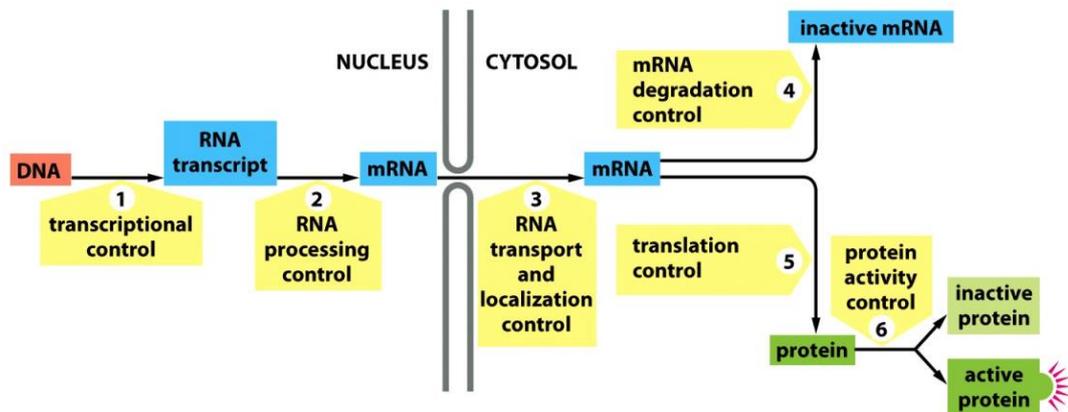


FIGURA 1.4- NÍVEIS DE REGULAÇÃO GÊNICA.

Todo o processo de expressão de genes é regulado, desde a transcrição, passando pelo processamento de RNA, transporte, controle da tradução e até inativação da proteína. Todas essas etapas são muito importantes para que a célula só expresse as proteínas necessárias.

FONTE: ALBERTS et al (2010).

A transcrição é um ponto fundamental de regulação da expressão gênica, e é controlado por proteínas que se ligam em seqüências regulatórias específicas, modulando a atividade da RNA polimerase (ALBERTS, et al, 2010). Tanto em bactérias quanto em eucariotos, os promotores contêm um sítio de iniciação, que é uma seqüência de cerca de 50 nucleotídeos, necessários para a ligação da RNA-polimerase ao promotor. A RNA polimerase II possui dois elementos principais no promotor, a seqüência TATA-box e as seqüências Inr, que são importantes para a ligação dos fatores gerais de transcrição (GRIFFITHS et al, 1999; COOPER, 2000; JUVEN-GERSHON; KADONAGA, 2010). Além do promotor, a maioria dos genes eucarióticos possuem seqüências regulatórias de DNA, importantes para ativação e desativação destes genes (LODISH et al, 1999; GRIFFITHS et al, 1999; SAINSBURY; BERNECKY; CRAMER, 2015).

Estas seqüências regulatórias podem ser muito extensas em eucariotos, e para serem funcionais ainda necessitam ser reconhecidas por proteínas denominadas de reguladores transcricionais, que se ligam a essas seqüências de DNA através de pontes de hidrogênio, ligações iônicas ou interações hidrofóbicas. Como estas seqüências são em geral longas, as várias interações DNA-proteína tornam a interação resultante altamente específica e forte (GRIFFITHS, et al, 1999; COOPER, 2000). Embora estas interações tenham sua especificidade, alguns

motivos de ligação ao DNA são encontrados em muitos reguladores transcricionais, como homeodomínio, dedo-de-zinco e zíper-de-leucina (COOPER, 2000).

Em eucariotos, as proteínas ativadoras da transcrição se ligam ao DNA a milhares de pares de bases do promotor, em sítios de ligação denominados estimuladores. A ligação de ativadores recruta a RNA-polimerase, fatores gerais de transcrição e o mediador, formando um complexo de início de transcrição (GRIFFITHS et al, 1999; LODISH et al, 1999; JUVEN-GERSHON; KADONAGA, 2010).

Além destes, as proteínas reguladoras da transcrição também atraem remodeladores de cromatina, afetando o acesso ao promotor pelos fatores gerais de transcrição (COOPER, 2000). A cromatina funciona como um bloqueio físico na ativação da transcrição, sendo que para Alberts et al (p.279, 2010) “tal empacotamento da cromatina pode ter evoluído em parte para impedir a expressão gênica vazante”. Muitas proteínas ativadoras da transcrição podem atrair histonas acetiltransferases, que ao transferir um grupo acetil para as lisinas das histonas, tornam a cromatina menos compactada e dessa forma auxiliam na ativação da transcrição, além de que alguns fatores gerais de transcrição reconhecem a acetilação (ALBERTS et al, 2010).

1.2.1 Regulação Epigenética

A regulação epigenética é definida como modificações herdáveis na expressão gênica que não envolvem alterações na sequência de DNA (EGGER et al, 2004). São conhecidos três mecanismos de regulação epigenética: metilação de DNA, silenciamento dependente de RNA e modificações pós traducionais em histonas (ALLIS; JENUWEIN, 2016).

A metilação do DNA e sua relação com a expressão gênica foi proposta há muitas décadas, e sua importância no desenvolvimento de diversos organismos já foi relatada. Além disso, está envolvida em diversas funções importantes, como o *imprinting* genômico, inativação do cromossomo X, entre outros (JIN et al, 2011; CHEN et al, 2017). A metilação do DNA nada mais é do que a adição covalente de grupos metil (CH₃), em citosinas, pela ação da citosina-5 DNA metiltransferase (DNMT), que transfere um grupamento metil da S-adenosil metionina (SAM) ao carbono 5 da citosina (5-metilcitosina) (GISSOT; KIM, 2008; CHEN et al, 2016).

Em muitos eucariotos sRNAs (*small RNA*) e lnc-RNAs (do inglês, *long coding RNA*) são peças fundamentais na regulação da estrutura da cromatina e regulação da expressão gênica, além de terem funções associadas a degradação e repressão da tradução (MOAZED, 2009; REINHART; BARTEL, 2002). Os lnc-RNAs são reguladores da estrutura da cromatina por recrutarem enzimas modificadoras de histonas, independentemente da via de RNA de interferência e, em mamíferos estão envolvidos na inativação do cromossomo X. Já os sRNAs tem funções semelhantes, mas atuam via RNA de interferência, entretanto estes e os lnc-RNAs podem agir em conjunto através de *RNA scaffolds*, modificando a estrutura da cromatina e silenciando genes (HOLOCH; MOAZED, 2015).

A via de RNA de interferência inicia com o processamento de micro RNAs (miRNA) precursores pela enzima Dicer, que serão associados ao complexo RISC (do inglês *RNA-induced silencing complexes*), um complexo de nucleases que utiliza miRNA simples fita como guia para clivar o mRNA de interesse (HANNON, 2002; MEISTER; TUSCHL, 2004). Esse mecanismo regula a expressão gênica por degradar o RNA mensageiro, reprimir a tradução ou modificar a estrutura da cromatina, além de proteger a integridade do genoma contra ácidos nucleicos invasores, como vírus e transposons (BRAUN et al, 2010).

Por fim, outro mecanismo de regulação epigenética concentra-se nas modificações pós traducionais (MPT) em histonas. As histonas já foram consideradas apenas por sua função estrutural, porém hoje se sabe que são componentes ativos e dinâmicos no que se refere à regulação da expressão gênica e outros processos dependentes de DNA (STRAHL; ALLIS, 2000; ALLIS; JENUWEIN, 2016).

Histonas são proteínas básicas, pequenas, com domínio globular, que juntamente com o DNA compõe os nucleossomos, que são a unidade fundamental da cromatina. Os nucleossomos são formados por 147 pares de base (pb) de DNA ao redor de um octâmero de histonas, composto por dois pares das histonas H2A, H2B, H3 e H4 (KHORASANIZADEH, 2004; PETERSON; LANIEL, 2004; HENIKOFF, 2008; ALLIS; JENUWEIN, 2016). Cada nucleossomo é separado por cerca de 10 a 60 pb envolvidos pela histona *linker* H1. Além das histonas canônicas, existem as histonas variantes, que diferem em poucos ou muitos aminoácidos, e por consequência desempenham funções distintas. A H2A.Z por exemplo, é encontrada predominantemente em regiões intergênicas, enquanto que a CENP-A, se localiza

especificamente nos centrômeros. Além da localização, estas proteínas possuem funções especializadas que regulam a estrutura dinâmica da cromatina (KAMAKAKA; BIGGINS, 2005; CHEN et al, 2016).

Atualmente, mais de 20 MPTs em histonas foram descritas, que incluem acetilação, fosforilação, metilação, ubiquitinação, entre outras. Essas modificações podem afetar a arquitetura da cromatina, pois as caudas N-terminais das histonas se projetam para fora dos nucleossomos e uma vez que as MPTs são adicionadas, podem afetar as interações nucleossômicas, o que interfere diretamente na expressão gênica (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011; CHEN et al, 2016). Alterações na estrutura da cromatina podem torná-la mais acessível (eucromatina) ou menos acessível (heterocromatina) para transcrição (CROKEN et al, 2012). Bannister e Kouzarides (2011) ainda defendem que além da transcrição, as MPTs em histonas também afetam outros processos como replicação do DNA, reparo e recombinação, além de recrutar enzimas remodeladoras de cromatina.

As diversas modificações podem ser entendidas como um linguagem ou “código das histonas”, como foi proposto por Strahl e Allis (2000). O código das histonas propõe que cada modificação pode atuar sozinha, em conjunto ou sequencialmente, resultando na ativação ou bloqueio de determinado processo biológico. Esses padrões são “escritos” por proteínas denominadas *writers* e interpretados por proteínas chamadas *readers* (leitores) (ALLIS; JENUWEIN, 2016).

Entre as várias MPTs, a acetilação de histonas é umas das mais estudadas, podendo ter várias funções na regulação da expressão gênica, especialmente na ativação da transcrição (KHORASANIZADEH, 2004; BANNISTER; KOUZARIDES, 2011; ALLIS; JENUWEIN, 2016). A acetilação favorece a expressão gênica, pois neutraliza as cargas positivas das lisinas, e conseqüentemente, diminui a interação das histonas com o DNA, o tornando menos condensado e promovendo o acesso a ativadores de transcrição. A desacetilação de histonas causa o efeito contrário, tornando a cromatina mais condensada e reprimindo a expressão gênica (KHORASANIZADEH, 2004; CHEN et al, 2016). O balanço acetilação/desacetilação é feito pelas histonas acetiltransferases (HATs) e histonas desacetilases (HDACs), assim denominadas por terem sido primeiramente descritas tendo como alvo justamente as histonas. Vale destacar, no entanto, que podem atuar em proteínas não-histonas, o que não será explorado nesse caso.

As HATs catalisam a reação reversível de acetilação, utilizando acetil-CoA como cofator para adição de um grupamento acetil nas lisinas presentes principalmente na porção N-terminal das histonas (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011). Existem dois tipos de HATs: A e B. As HATs tipo A são nucleares e mais heterogêneas que as de tipo B, e podem ser classificadas em três famílias: GNAT, MYST e p300/CBP (MARMORSTEIN, 2007; MARMORSTEIN; ZHOU, 2014). As proteínas dessas famílias são responsáveis pela acetilação de histonas nos nucleossomos (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011). As de tipo B são citoplasmáticas e estão envolvidas, principalmente na acetilação de histonas recém-sintetizadas, especificamente nas lisinas 5 e 12 da histona H4, pois este é um padrão importante para deposição de novas histonas ao DNA recém-sintetizado (PARTHUN, et al, 2007).

As 18 histonas desacetilases identificadas em mamíferos são divididas em quatro classes distintas, de acordo com o domínio, cofator e similaridade de sequência com as proteínas de levedura, que foram primeiramente caracterizadas (SETO; YOSHIDA, 2014). As HDACs classe I possuem domínio HDAC clássico, necessitam de Zn^{2+} como cofator, são homólogas à Rpd3 de levedura, e são majoritariamente nucleares. Já as de classe II, podem transitar entre o núcleo e o citoplasma, são homólogas à Hdal de levedura, possuem domínio HDAC clássico, mas ainda podem ter outros domínios, como inositol fosfato quinase (FIGURA 1.5). Na classe III estão as sirtuínas, que possuem domínio e homologia à Sir2 de levedura, e são consideradas não clássicas por possuírem dependência de NAD^+ para sua atividade. E por fim, a classe IV possui apenas um representante em mamíferos, a HDAC11, que possui características mistas entre as classes I e II.

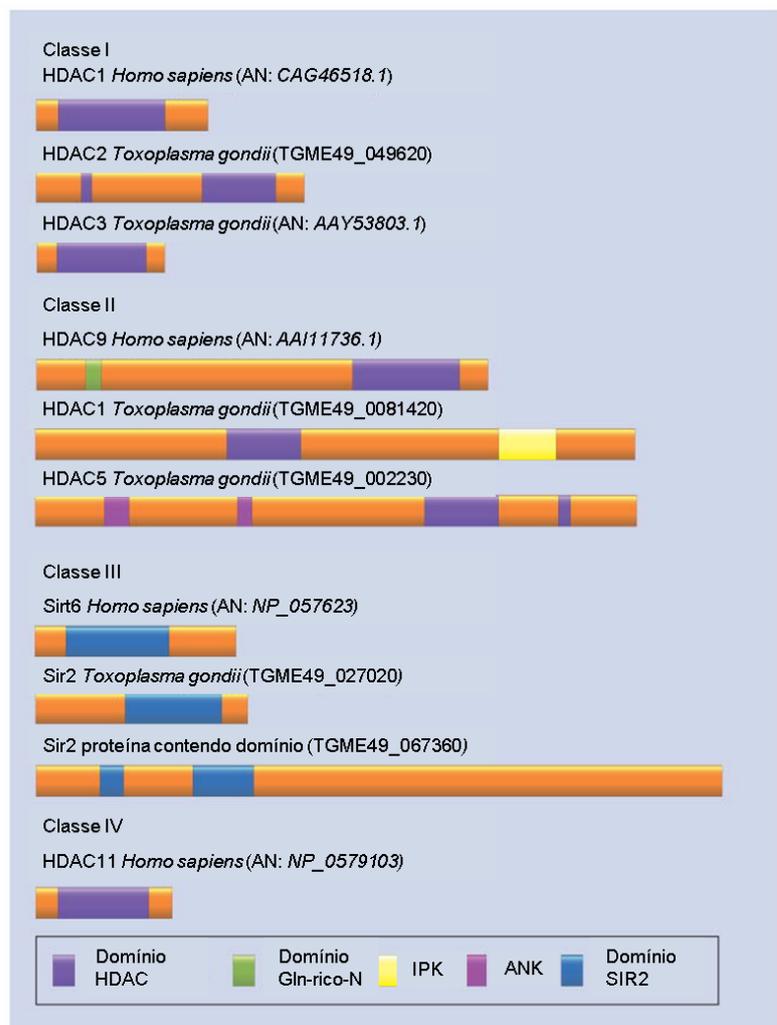


FIGURA 1.5 - CLASSIFICAÇÃO DAS HDACS

Na figura são mostradas as HDACs de *Toxoplasma* e suas homólogas em humanos. São mostrados os números de acesso (AN – *accession number*) ou identificação do gene. Os Gln-rico-N (N-terminal rico em glicina), Inositol fosfato quinase (IPK), ANK, histona deacetilase e *silent information regulator-2* (SIR2) são evidenciados.

FONTE: adaptado de VANAGAS et al (2012)

As HDACs clássicas (I, II e IV) possuem domínio catalítico com oito folhas- β paralelas centrais e 16 α -hélices formando a estrutura principal, que é semelhante ao domínio arginase (FINNIN et al, 1999). Estas proteínas podem ser redundantes, ou seja, na ausência (por nocaute ou *knockdown*) de alguma HDAC clássica, outra HDAC de mesma classe ou até de outra classe pode compensar sua falta (SETO; YOSHIDA, 2014).

Além do papel na regulação da expressão gênica, a acetilação de histonas, tem sido relacionada com a progressão de diversas doenças, como o câncer, Alzheimer, Parkinson, esquizofrenia, e até mesmo a memória e cognição (FISCHER

et al, 2007; FALKENBERG; JOHNSTONE, 2014). Neste sentido, o uso de inibidores de HDACs (HDACi) tem sido cada vez mais utilizados para reverter a progressão de certas doenças, especialmente o câncer (FISCHER et al, 2010; ECKSCHLAGER et al, 2017).

1.3 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM *T. gondii*

Durante a mudança de formas taquizoítas para bradizoítas, *T. gondii* passa por profundas mudanças na expressão de seus genes, sendo que em estudo de transcriptoma, foi demonstrado que 18% dos mRNAs são estágio-específicos, revelando refinado controle transcricional neste parasita (RADKE et al, 2005).

Inicialmente, acreditava-se que a regulação da expressão gênica em parasitas do filo Apicomplexa seria semelhante aos demais eucariotos, porém a escassez de fatores de transcrição específicos ou domínio de ligação ao DNA conservados indicaram que a regulação gênica destes parasitas possui peculiaridades.

Muito embora tenha-se encontrado poucos fatores de transcrição específicos nestes organismos, foi descoberta uma grande família de proteínas de ligação ao DNA, denominadas de ApiAP2. Essas proteínas possuem homologia com os fatores de transcrição de plantas que também possuem domínio AP2 (Apetala2), indicando que estas proteínas poderiam funcionar como fatores de transcrição em Apicomplexa (BALAJI et al. 2005). Apesar da escassez de fatores de transcrição específicos, foi encontrado um vasto repertório de enzimas remodeladoras da cromatina, o que chamou a atenção de diversos grupos para estudos de regulação epigenética neste organismo.

Em *T. gondii* foram encontradas duas DNA metiltransferases, denominadas DNMTa e DNMTb (GISSOT et al. 2008). Apesar da descoberta dessas proteínas, nenhuma evidencia de metilação de DNA havia sido relatada em formas taquizoítas de *T. gondii*. No entanto, Wei e colaboradores (2017) mostraram que as formas bradizoítas possuem metilação de DNA, que está principalmente envolvida com metabolismo e resistência ao sistema imune do hospedeiro. Outros Apicomplexa também possuem metilação de DNA, mas assim como *T. gondii*, este não parece ser o principal mecanismo de regulação da expressão gênica, ao menos nas formas analisadas (CROKEN et al, 2012).

T. gondii também possui um conjunto de enzimas da via de silenciamento mediada por RNA. Braun e colaboradores (2010) identificaram as proteínas participantes da via, e também relataram uma grande complexidade, não apenas devido a grande diversidade de sRNAs encontrado, mas também pela combinação e natureza destes componentes.

No que se refere as histonas, as quatro canônicas foram encontradas em *T. gondii*, sendo que as histonas H3 e H4 são altamente conservadas com demais organismos, diferentemente de H2A e H2B, que são mais divergentes, principalmente em suas porções N-terminais (NARDELLI et al, 2013). A histona H2B possui duas isoformas, que são diferencialmente expressas durante o ciclo de vida do parasita, sendo que H2Ba é mais expressa nas formas taquizoítas, enquanto que H2Bb é expressa nas formas de reprodução sexuada (DALMASSO et al, 2006). Também foram identificadas cinco histonas variantes, CenH3, H3.3, H2A.X, H2A.Z e H2Bv, sendo que esta última é específica de protozoários (DALMASSO, et al, 2009). Segundo Nardelli et al (2013) *T. gondii* possui tanto MPTs conservadas quanto únicas, sugerindo um código de histonas específico para *Toxoplasma*.

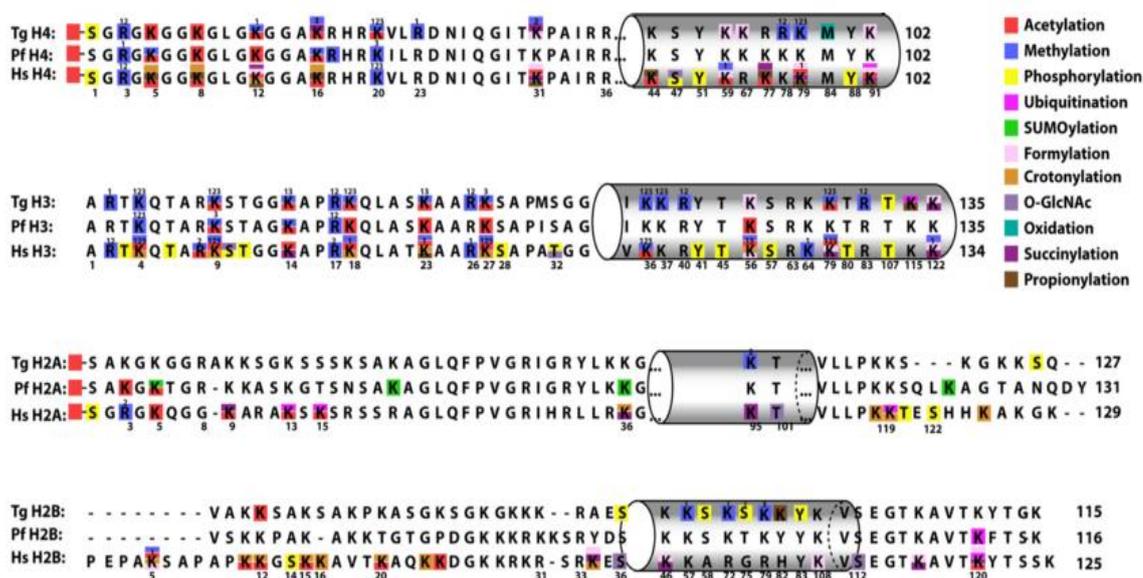


FIGURA 1.6 - MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS ENCONTRADAS EM *T. gondii*.

Modificações em histonas de *T. gondii* em comparação com *P. falciparum* (Pf) e *H. sapiens* (Hs). Os cilindros cinzas representam a região aproximada do domínio globular. Muitas MPTs são únicas de *T. gondii*.

FONTE: NARDELLI et al (2013).

Toxoplasma possui membros das famílias GNAT e MYST de histonas acetiltransferases, mas não p300/CBP, uma vez que esta família está presente

apenas em metazoários (DIXON et al, 2010). Da família GNAT foram identificadas duas proteínas, GCN5A e B, que possuem diferentes perfis de acetilação (BHATTI et al, 2006). GCN5A não é essencial para a sobrevivência do parasita, mas é importante na resposta ao estresse alcalino e induz a diferenciação taqui-bradi. Já para GCN5B não é possível realizar o nocaute, sugerindo que essa é uma proteína essencial (VANAGAS et al, 2013). A família MYST é representada por duas proteínas, também denominadas por A e B, que possuem domínios CHD (cromodomínio) e dedo-de-zinco. MYST-A é mais expressa em taquizoítas, já a B está envolvida com o recrutamento de serina/treonina quinase, uma proteína importante para progressão no ciclo celular e reparo de DNA (VONLAUFEN et al, 2010).

Por outro lado, pouco se sabe sobre as HDACs de *T. gondii*. Até o momento a única HDAC caracterizada é a TgHDAC3, que está relacionada ao ciclo celular e diferenciação de taquizoíta para bradizoítas, além de regular a transcrição de diversos genes estágio-específicos (BOUGDOUR et al, 2009). O genoma do parasita codifica para sete HDACs sendo cinco desacetilases clássicas e duas sirtuínas. Há ao menos um representante de cada classe, sendo que as HDACs classe I são representadas pelas HDACs 2 e 3, as HDACs de classe II, por 1 e 5 e a TgHDAC4 é de classe IV e o que se sabe sobre elas, diz respeito a informações de sequenciamento de mRNA e microarranjo presentes no banco de dados.

1.4 JUSTIFICATIVA

T. gondii é o parasita causador da toxoplasmose, uma doença que afeta milhões de pessoas sendo considerada a principal infecção em indivíduos imunocomprometidos, como HIV-positivos. Também é extremamente severa para o feto, em gestantes, podendo trazer graves consequências, inclusive levar ao aborto. Os fármacos utilizados atualmente são eficientes apenas quando a doença é detectada ainda na fase aguda, o que não é trivial, sendo que a doença é geralmente assintomática. Uma vez que a doença atinge a fase crônica, não há cura. Portanto, estudos sobre a biologia e expressão gênica do parasita pode levar ao descobrimento de novos alvos, para o desenvolvimento de fármacos mais eficientes contra a toxoplasmose.

O interesse do nosso grupo pelas HDACs de *T. gondii* se deu inicialmente, devido ao seu papel central na progressão do câncer e outras doenças. As HDACs

de mamíferos já são bem caracterizadas e seu envolvimento com o silenciamento gênico é muito bem relatado. Mas recentemente, elas têm sido utilizadas como alvo para o desenvolvimento de fármacos, sendo que algumas delas, como por exemplo: Vorinostat, Romidepsin, Belinostat e Panobinostat já foram aprovadas pela FDA (*U.S. Food and Drug Administration*), órgão americano responsável pelo controle e supervisão de novos medicamentos, e têm sido muito eficientes no tratamento do câncer e outras doenças.

Por outro lado, pouco se sabe sobre o papel das HDACs em *Toxoplasma*, sendo que a única caracterizada até o momento é a TgHDAC3, que está envolvida com a diferenciação. Além disso, inibidores específicos destas proteínas tem se mostrado eficientes contra parasitas, como é o caso da apicidina, um inibidor de HDACs em *Plasmodium*, que foi eficiente na inibição do crescimento do parasita (DARKIN-RATTRAY et al, 1996). Em *T. gondii* o composto FR235222, inibidor específico da TgHDAC3 alterou a expressão gênica do parasita, ativando diversos genes envolvidos com a diferenciação e, portanto, induziu a diferenciação de taquizoítas para bradizoítas, confirmando que o estudo de fatores epigenéticos é altamente relevante neste parasita (BOUGDOUR et al, 2009).

T. gondii é considerado um ótimo modelo de estudo, pois possui diversas ferramentas de genética reversa disponíveis, e é facilmente cultivável em laboratório. Nosso grupo tem interesse em entender qual é o envolvimento das desacetilases de histona em processos biológicos essenciais para o parasita, como por exemplo a replicação e o ciclo celular.

A escolha de TgHDAC2 de *T. gondii*, por sua vez, ocorreu por ser a única HDAC com expressão aumentada na fase S do ciclo celular, o que pode sugerir uma função na replicação do DNA, um processo pouco compreendido nesse parasita. Além disso, essa proteína possui um domínio HDAC peculiar, com duas inserções aminoacídicas dentro do domínio, presentes em apenas alguns membros do filo e que não tem estrutura e função conhecidas.

O estudo desta proteína iniciou ainda durante a iniciação científica da autora, com as construções das ferramentas de genética reversa para o nocaute gênico e etiquetamento do gene endógeno, aqui, apresentamos a confirmação e caracterização de parasitas nocaute, onde realizamos uma primeira caracterização desta proteína neste organismo. Desta forma, esperamos contribuir para o entendimento da função desta proteína em *T. gondii*.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL:

Caracterizar a histona desacetilase-2 de *Toxoplasma gondii* (TgHDAC2) funcional e estruturalmente, procurando elucidar sua função no ciclo celular, bem como em processos que dependem de DNA, como a transcrição e a replicação.

2.2 ESPECÍFICOS:

- Determinar a localização celular da TgHDAC2 por microscopia de fluorescência;
- Caracterizar parasitas $\Delta tghdac2$;
- Definir a função de TgHDAC2 no ciclo celular do parasita por ensaio de replicação, utilizando cepas nocaute do parasita;
- Analisar estruturalmente o domínio de TgHDAC2 através de difração de raios X.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CULTURA DE TOXOPLASMA GONDII

Nesse trabalho utilizamos formas taquizoítas de *T. gondii* da cepa RH, uma cepa do tipo I, caracterizada por ser mais virulenta e de baixa diferenciação para as formas bradizoítas. Mais especificamente, utilizamos dois mutantes da cepa RH, denominados RH Δ *hxgp*rt e RH Δ *hxgp*rt Δ *ku80*. O gene *hxgp*rt codifica para a proteína HXGPRT (*hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyl transferase*), que participa da via de síntese de purinas e é utilizado como marcador de seleção. Já a segunda cepa utilizada, além do nocaute para HXGPRT, também não possui o gene que codifica para a proteína Ku80, que está envolvida com a via de reparo por recombinação não homóloga (NHEJ-*Nonhomologous end joining*) (HUYNH e CARRUTHERS, 2009; FOX, et al, 2009; UPADHYA, et al, 2011). Dessa forma, garantimos que a recombinação ocorra no local desejado, pela via de reparo por recombinação homóloga.

Como se tratam de parasitas intracelulares obrigatórios, eles foram cultivados por infecção de fibroblastos provenientes de prepúcio humano (HFF-*human foreskin fibroblasts*), numa razão de 3 a 5 taquizoítas por célula. As células HFF possuem ampla área para a replicação do parasita e são resistentes às drogas de seleção, por isso foram ideais para o desenvolvimento desse projeto. Células e parasitas foram cultivados em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 100 µg/mL de penicilina/streptomicina e mantidos a 37°C com 5% de CO₂.

3.2 EXTRAÇÃO DE DNA DE *T. gondii*

O DNA genômico foi extraído de *T. gondii* cepa RH Δ *hxgp*rt Δ *ku80*, através da lise com tampão TELT (50 mM Tris-HCl, pH 8; 62,5 mM EDTA, pH 9; 2,5 M LiCl; 4% (v/v) Triton X-100), seguido de extração com Fenol-Clorofórmio (SAMBROOK; FRISTSCH; MANIATIS, 1989).

3.3 EXTRAÇÃO DE RNA E OBTENÇÃO DE DNA COMPLEMENTAR

Para extrair o RNA foi utilizado o RNeasy Mini Kit (Qiagen), conforme descrição do fabricante. Primeiramente, aproximadamente 5 x 10⁸ parasitas foram

centrifugados a uma velocidade de 500 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e ao precipitado de parasitas foi adicionado uma mistura com 350 µL de tampão RLT, acrescido de 3,5 µL de β-mercaptoetanol e seguiram-se as instruções do fabricante. O tratamento com *DNase* foi feito diretamente na coluna de acordo com as instruções do fabricante.

Do RNA extraído, foi retirado 3 µL (1 µg) e diluído em 5,6 µL de água livre de *RNase* e acrescentado 1 µL de oligodT (10 mM), para amplificação somente dos RNAs mensageiros. Esta mistura foi incubada a 70°C por 5 minutos, seguida de incubação em gelo por mais 5 minutos. Após este tempo, foi acrescido 4 µL do respectivo tampão da enzima (5X), 2,4 µL de MgCl₂ (25 mM), 1 µL de dNTP (10 mM), 1 µL de enzima *RNase Out* (40 U/µL) e 1 µL da enzima *Improm II RT* (Promega). A reação para obtenção do DNA complementar (cDNA) foi feita em termociclador, seguindo um ciclo de 25°C por 5 minutos, 42°C por 60 minutos (2 vezes) e 70°C por 15 minutos. 2 µL deste cDNA foi usado como molde para uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR-*Polymerase Chain Reaction*) convencional, utilizando os *primers* para amplificação da região codificante de *tghdac2* (itens 3.6.2 e 3.6.3).

3.4 ELETROFORESE

3.4.1 Eletroforese de DNA em gel de agarose

O sucesso da amplificação foi conferido por meio de eletroforese em gel de agarose 1% (1 g de agarose para 100 mL de TBE-Tris-base 89 mM; Ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM pH 8). Foram utilizados 5 µL da reação de PCR em tampão de amostra para DNA (25% de Ficoll, 0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xileno cianol). O gel de agarose com a amostra de PCR e o marcador de massa molecular (1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen) foi submetido a um campo elétrico de 100 V por 40 minutos, submerso em tampão TBE. Após a eletroforese, o gel foi visualizado em um transiluminador com luz ultravioleta. Para visualização do DNA, foi utilizado o corante fluorescente GelRed (Biotium Inc.), conforme instruções do fabricante, ou submerso em solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por 20 minutos. Quando necessário, os produtos de PCR foram purificados com o kit QIAquick® PCR Purification (Qiagen), seguindo instruções do fabricante.

3.4.2 Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida

As amostras proteicas foram ressuspensas em tampão de amostra (TA) 4X (40 mM de Tris-HCl pH 6,8, 1 % de SDS, 2,5 % de β -mercaptoetanol, 6 % de glicerol e 0,005% de azul de bromofenol) na proporção de 3:1 de amostra e TA. As amostras foram submetidas a aquecimento a 95°C para desnaturação das proteínas, seguido de agitação vigorosa para quebra de DNA e uma breve centrifugação a 15000 x g.

As proteínas foram separadas em gel SDS-PAGE 10%, 13% ou 15% dependendo da proteína analisada (LAEMMLI, 1970), em tampão de eletroforese apropriado, contendo 25 mM de TRIS-base, 192 mM de glicina e 0,1% de SDS. Como marcador de massa molecular foi utilizado PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Para visualização das bandas correspondentes as proteínas, os géis foram submersos em solução de coloração (Azul de Coomassie R-250 0,1%; Metanol 45%; Ácido Acético 10%), por cerca de 15 minutos. Após o tempo de coloração, os géis foram fervidos em água para retirada do excesso de corante.

3.5 ANÁLISE COMPARATIVA DE SEQUÊNCIA

Com o objetivo de comparar a sequência proteica de TgHDAC2 com outros organismos, foi feita uma análise comparativa de sequência, utilizando a proteína TGME49_249620 anotada no banco de dados de *Toxoplasma* como HDAC2 (toxodb.org¹). Para tanto, foi feito uma busca de proteínas semelhantes, com o algoritmo BLASTp² (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), que realiza uma busca em banco de dados de proteínas não redundantes de diversos organismos, gerando resultados baseados em homologia de sequência e presença de domínios conservados (CDD- *Conserved Domain Database*). As proteínas com maior identidade foram selecionadas para realizar o alinhamento múltiplo de sequência. Adicionalmente, foram selecionadas também as HDACs de *Plasmodium falciparum*, *Homo sapiens*, a RPD3 de *Saccharomyces cerevisiae* e visto que houve semelhança com várias proteínas de plantas, a HDAC6 de *Arabidopsis thaliana* também foi selecionada.

¹ GAJRIA, B. et al. ToxoDB: an integrated *Toxoplasma gondii* database resource. **Nucleic Acids Res.**, November 14, 2007; (2007) gkm981v1.

² ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. "Basic local alignment search tool." *J. Mol. Biol.* (1990) 215:403-410.

Todas as sequências foram obtidas do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Depois de baixar todas as sequencias de interesse, elas foram alinhadas utilizando o *software* ClustalW³, no programa MegaAlign 5.08 (DNASStar). O alinhamento foi editado no programa GeneDoc, disponível gratuitamente online (<http://genedoc.software.informer.com/>).

3.6 CLONAGENS

3.6.1 Clonagem em vetor pLIC.HA.HXGPRT

Para o etiquetamento da proteína endógena, foi necessário à amplificação de uma região de aproximadamente 1000 pares de base (pb) da porção final do gene, excluindo o códon de terminação. Para tanto, os seguintes *primers* foram desenhados, baseados em resultados de sequenciamento presentes em banco de dados (toxodb.org), de modo a amplificar 1002 pb da porção final de *tghdac2*.

QUADRO 3.1 - PRIMERS PARA CLONAGEM NO VETOR pLIC.HA.HXGPRT.

Primer	Sequência
Hdac2 tag F	TACTTCCAATCCAATTTAATGCGAAGTAAAGAGTCTGCAAAGAGGC
Hdac2 tag R	TCCTCCACTTCCAATTTTAGCCCCACGATTCCTGTTCGA

Sequências dos *primers* utilizados para amplificar 1002 pb do gene *tghdac2*. As sequências LIC estão sublinhadas.

FONTE: a autora (2018)

Nestes *primers* foram adicionadas as sequências LIC (de *Ligation Independent Cloning*) (sublinhadas no quadro 3.1), que são complementares às sequências LIC presentes no vetor de etiquetamento (pLIC.HA.HXGPRT) (HUYNH; CARRUTHERS, 2009).

Esta região foi então amplificada por PCR, utilizando 100 ng de DNA genômico, extraído de *T. gondii* conforme descrito no item 3.2. Ao DNA foi adicionado tampão apropriado para a enzima diluído dez vezes, 0,2 mM de dNTP, 1,5 mM de MgSO₄, 10 pmol de cada *primer* e 1 unidade da enzima de alta fidelidade *Platinum Taq HiFi DNA Polymerase* (Invitrogen), para uma reação final de 50 µL. A reação iniciou-se com uma etapa de desnaturação por 5 minutos a 95°C, seguida de

³ LARKIN, M.A; et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, 23, 2947-2948, 2007

30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 57°C durante 30 segundos e extensão a 68°C por 1 minuto e 30 segundos, além de extensão final a 68°C por 10 minutos.

Nesse trabalho, utilizamos vetor para etiquetamento independentes de ligação (*LIC-Ligation Independent Cloning*), que não necessita de digestão com enzimas de restrição, tampouco ligação com *DNA ligase* (HUYNH; CARRUTHERS, 2009). Em contrapartida, este vetor possui as sequências LIC, sequências de aproximadamente 20 nucleotídeos, também adicionadas aos *primers* para a amplificação do gene de interesse, de modo a obter extremidades complementares entre vetor e inserto. O vetor contém ainda os genes para seleção na bactéria e no parasita (ampicilina e HXGPRT, respectivamente) e a sequência da etiqueta de HA (pequeno peptídeo presente na proteína hemaglutinina do vírus Influenza), repetida três vezes (peptídeo YPYDVPDYA) em tandem. O mapa do vetor pode ser visto na Figura 3.1.

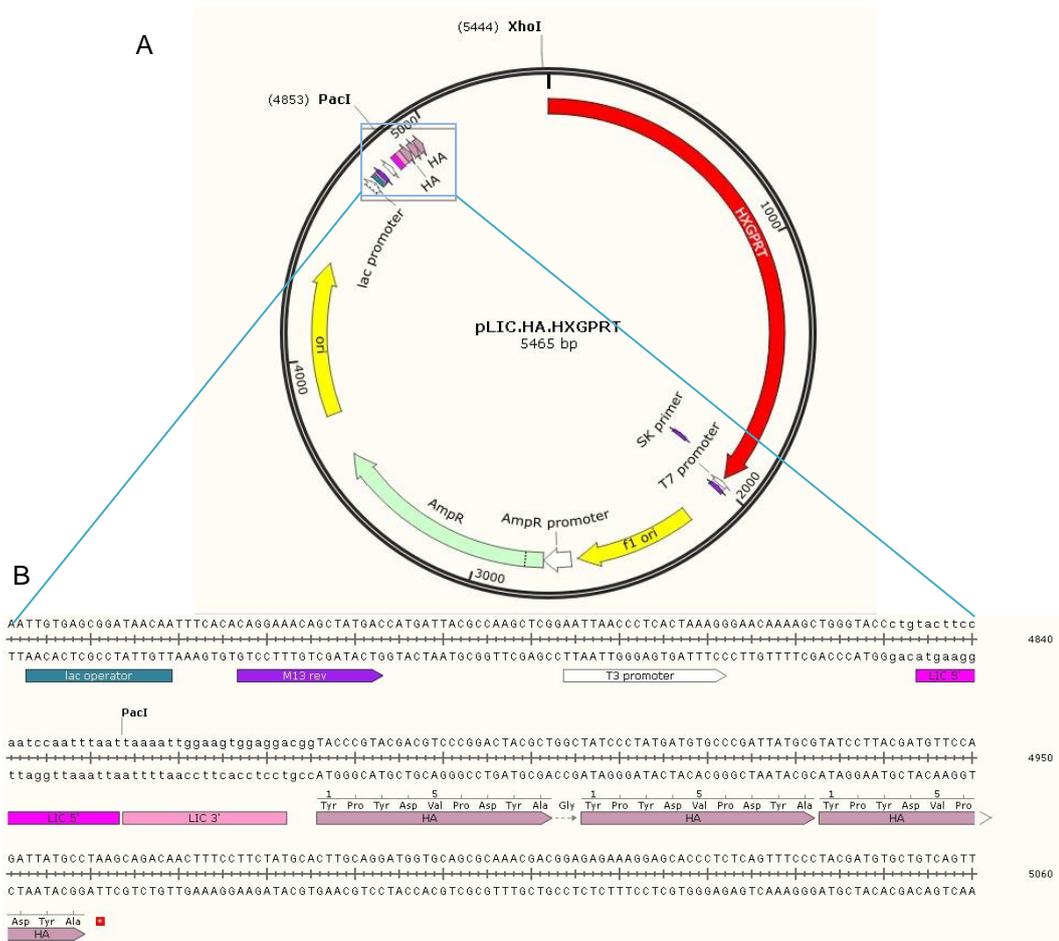


FIGURA 3.1 - VETOR pLIC.HA.HXGPRT.

(A) mapa do vetor pLIC.HA.HXGPRT evidenciando os dois genes de resistência, AmpR (ampicilina) em verde e HXGPRT (*hipoxantina xantina guanina fosforibosiltransferase*) em vermelho e as origens de replicação (ori) em amarelo. (B) Sequências LIC (*Ligation Independent Cloning*) 5' e 3' flanqueadas pelo sítio de *PacI* e as três sequências em tandem do peptídeo HA.

FONTE: SIQUEIRA (2015)

Essa metodologia de clonagem, utiliza a dupla função da enzima *T4 DNA polimerase*, que além de atuar como polimerase, possui atividade 3' → 5' exonuclease, que cliva e remove os nucleotídeos da sequência LIC, presentes tanto no vetor, quanto no inserto, gerando extremidades complementares. Isto requer extremidades simples-fita, que no caso do vetor ocorre após o vetor ser linearizado com a enzima *PacI*. O anelamento entre vetor e inserto ocorrerá então por complementariedade de sequências, através do sistema de reparo da própria bactéria utilizada na transformação, o que resulta em alta eficiência de clonagem, de acordo com dados na literatura. Conforme essa metodologia, tratamos vetor e inserto com a enzima *T4 DNA polymerase* (Novagen LIC qualified).

O tratamento do inserto consistiu em 2 µl de tampão para *T4 DNA Polimerase* 5X, 1 µl de DTT (100 mM), 0,8 µl de **dCTP** (100 mM), 0,5 µl da enzima *T4 DNA polimerase* (Novagen LIC qualified), 10,7 µl de água e 5 µl da amostra (a 0,2 pmol/µl). A reação foi incubada a 22°C durante 30 minutos e em seguida a 75°C por 20 minutos. O tratamento do vetor seguiu o mesmo princípio. Após a linearização do vetor com a enzima *PacI* (para gerar extremidades simples-fita), o mesmo foi tratado com *T4 DNA Polimerase* na seguinte reação: 12 µl do tampão 5X, 3 µl DTT (100 mM), 2,4 µl **dGTP** (100mM), 1,5 µl *T4 DNA polimerase* (Novagen LIC qualified), 35,1µl dH2O e 6µl do vetor linearizado (a 200-300 ηg/µl). Da mesma forma que o inserto, esta reação foi incubada a 22°C por 30 minutos, e depois a 75°C por 20 minutos. O anelamento entre vetor e inserto ocorreu por complementariedade de sequências ao misturá-los numa proporção de 1:6, por 10 minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida com 2 µL de EDTA 25 mM. A ligação entre vetor e inserto ocorreu através da via de reparo da própria bactéria. A transformação foi feita em bactérias *E. coli*, cepa DH5α, pelo método de choque térmico (descrito no item 3.7).

3.6.2 Clonagem em Vetor de clonagem pDONR™221 e de expressão pDEST™17

Para realizar a clonagem da região codificante de *tghdac2* para obtenção da proteína recombinante, foram utilizados os vetores pDONR™221 e pDEST™17, da plataforma Gateway (Invitrogen). Aos *primers* foram adicionados as sequencias *attB* (sublinhadas no quadro 3.2), que são necessárias para recombinação no vetor pDONR™221 que por sua vez, possui as sequencias *attP* para recombinação.

QUADRO 3.2 - SEQUÊNCIA DE *PRIMERS* UTILIZADAS PARA CLONAGEM NA PLATAFORMA GATEWAY.

Primer	Sequência
Hdac2 cds F	GGGG <u>ACAAGTTTGTACA</u> AAAAAGCAGGCTGCATGGGGAGGAGGAAGAGCGTTCT
Hdac2 cds R	GGGG <u>ACCACTTTGTACA</u> AAGAAAGCTGGGTCCCACGATTC CTGTTTCGAGATCT

Sequência de *primers* utilizadas para amplificação da região codificante do gene *tghdac2*. Os sítios *attB* para recombinação estão sublinhados.

FONTE: a autora (2018)

A região codificante de *tghdac2* foi amplificada a partir de 2 µL do cDNA de *T. gondii* utilizando a enzima *Platinum® Pfx DNA Polymerase* (Thermo Fisher

Scientific). A reação contemplou as etapas de desnaturação inicial (94°C, 5 minutos) seguido de 30 ciclos (94°C, 15 segundos; 57°C, 30 segundos; 68°C 2 minutos e 30 segundos) e extensão final (68°C, 10 minutos), seguindo as demais instruções do fabricante.

Os amplicons foram purificados com o *kit* de purificação de produtos de PCR (QIAquick PCR Purification Kit-QIAGEN), seguindo-se as instruções do fabricante. Após a purificação, 50 fmol do produto de PCR purificado, foi recombinado em 150 ng do vetor pDONR™221 (Invitrogen), adicionando-se 2 µL da mistura da enzima *BP Clonase*™ (Invitrogen) e mantido a 25°C por 18 horas. 3 µL da reação de recombinação foi transformado em *E. coli* DH5α através de choque térmico, como descrito posteriormente no item 3.7, adicionando kanamicina para seleção. Quando ocorre a recombinação entre os sitio *attB* do amplicon e *attP* do vetor, este plasmídeo contendo o inserto possuirá, então um novo sítio para recombinação denominado *attL*, que poderá ser recombinado em qualquer vetor de destino do sistema Gateway de clonagem que contenha o sítio *attR* para recombinação. Neste caso foi usado o vetor de expressão pDEST™17 (Invitrogen) (FIGURA 3.2).

Gateway cloning system

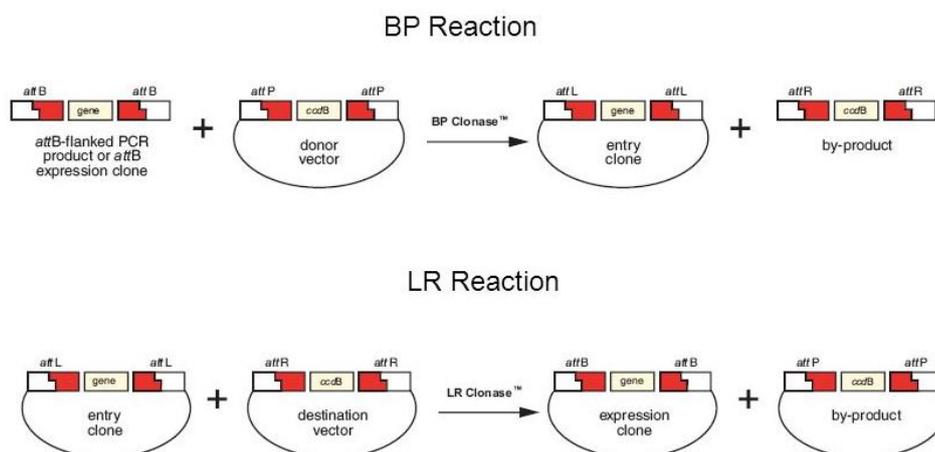


FIGURA 3.2 - ESQUEMA DE FUNCIONAMENTO DA CLONAGEM PELA PLATAFORMA GATEWAY.

Este sistema de clonagem é baseado em recombinações, onde a região de interesse deve estar flanqueada pelos sítios *attB* para recombinação, pela reação da enzima *BP clonase*, com os sítios *attP* do vetor de clonagem. O vetor de clonagem que possui inserto contém os sítios *attL* para recombinação em qualquer vetor de destino que contenha os sítios *attR*, e esta reação é feita pela enzima *LR clonase*.

FONTE: GATEWAY TECHNOLOGY (2018)

Uma vez confirmados, os plasmídeos foram extraídos. 150 ng do clone de entrada foram recombinados em 150 ng do vetor de expressão pDESTTM17 (Invitrogen), com adição de 2 µL da mistura da enzima *LR Clonase*TM (Invitrogen), a 25°C por 3 horas. Este vetor possui o promotor T7, que é um promotor muito forte proveniente do bacteriófago T7, que garantirá altos níveis de expressão da proteína. Este vetor também adiciona uma etiqueta de 6X histidina na porção N-terminal (FIGURA 3.3), permitindo a purificação da proteína em uma coluna de níquel, uma vez que a histidina tem afinidade por este metal.

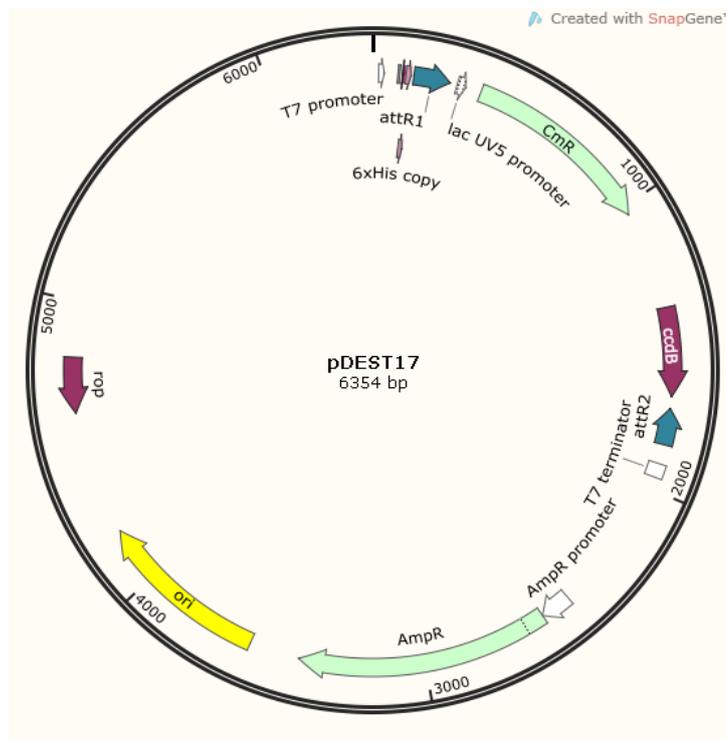


FIGURA 3.3- MAPA DO VETOR pDEST17.

Vetor de expressão pDest17, com os sítios de recombinação (*attR*), o promotor T7 e a etiqueta de 6X histidina.

FONTE: a autora (2018) (criado com SnapGene)

O produto da recombinação foi transformado em bactérias *E. coli*, cepa DH5 α , através do choque térmico (item 3.7). Após a confirmação por PCR de colônia e digestão enzimática, os plasmídeos foram extraídos e transformados na cepa bacteriana de *E. coli* Rosetta-gamiTM 2 (DE3) pLysS (Novagen). Esta cepa já possui o gene da *T7 RNA polimerase*, que é compatível com o promotor cujo gene de interesse está sob regulação, e está controlado pelo promotor *lac*, e desta forma, para indução da *T7 RNA polimerase* deve-se adicionar IPTG (Isopropil β -D-1-

tiogalactopiranosida), um análogo da alolactose, ao meio de cultura. Nesta bactéria também está contido o plasmídeo pLysS que codifica para T7 lisozima, que irá controlar os níveis basais da T7 RNA polimerase. Além disso, essa cepa aumenta a formação de pontes dissulfeto, e possui o plasmídeo pRARE2 que fornece sete RNAs transportadores raros, aumentando a eficiência na tradução de proteínas que tem preferência por esses tRNAs. Dessa forma, para obtenção da expressão da proteína foi adicionado 1 mM de IPTG (item 3.13).

3.6.3 Superexpressão

Para a superexpressão de TgHDAC2 em *T. gondii*, foi utilizado o vetor p5RT70ddmycGFPPfMyoAtailTy-HX (HETTMANN et al., 2000), (FIGURA 3.4) que também adiciona uma etiqueta de GFP (Proteína Verde Fluorescente- *Green Fluorescent Protein*). Além disso, a superexpressão da proteína está condicionada a um domínio de desestabilização (*Destabilization Domain-DD*). Este vetor também possui o gene *hxgprt* para seleção no parasita.

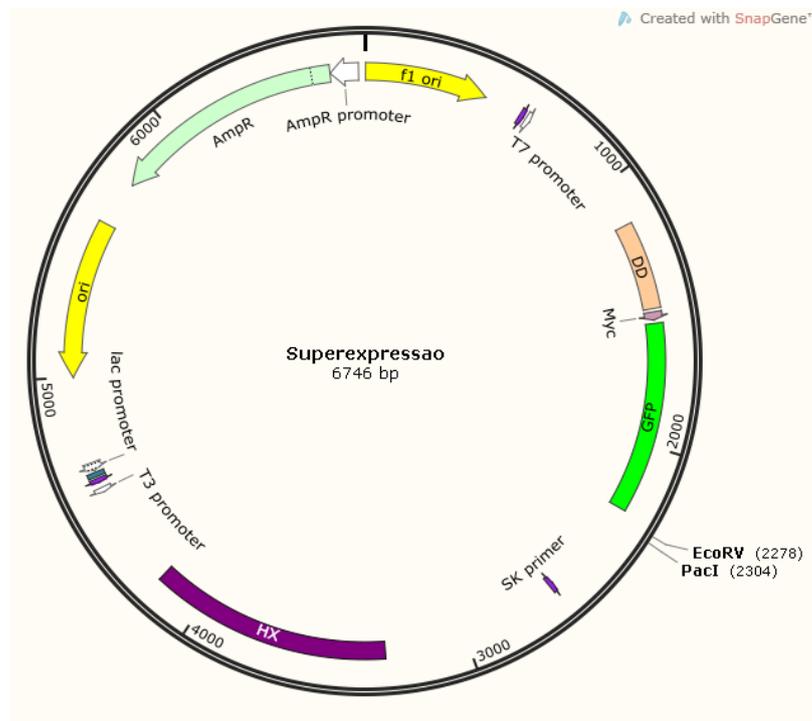


FIGURA 3.4 – VETOR DE SUPEREXPRESSÃO.

O vetor de superexpressão possui etiqueta de GFP, domínio de estabilização (DD), o gene de seleção no parasita (HX) e as enzimas de restrição, *EcoRV* e *PacI*.

FONTE: a autora (2018) (criado com SnapGene)

Para a clonagem de TgHDAC2, a região codificante, ou seja, apenas os éxons, foi amplificada a partir de 2 µL do cDNA de *T. gondii*, com adição de 1% de formamida, utilizando a enzima *Platinum® Pfx DNA Polimerase* (Thermo Fisher Scientific). A reação ocorreu com desnaturação inicial (94°C, 5 minutos), seguida de 50 ciclos (94°C, 15 segundos; 50°C, 30 segundos; 68°C, 2 minutos e 30 segundos), além de extensão final (68°C, 10 minutos), seguindo instruções do fabricante da enzima.

QUADRO 3.3 - SEQUÊNCIA DE *PRIMERS* UTILIZADOS PARA CLONAGEM NO VETOR DE SUPEREXPRESSION

<i>Primer</i>	Sequência
Hdac2 O.E. F	GGGATATCATGGGGAGGAGGAAGAGC
Hdac2 O.E. R	GGTTAATTAATTACCCACGATTCTGTTTCG

Sequência de *primers* utilizados para amplificação da região codificante do gene *tghdac2*. Os sítios de restrição das enzimas *EcoRV* e *PacI* foram adicionados e estão sublinhados.

FONTE: A autora (2018)

Aos *primers* foram adicionados os sítios de restrição das enzimas *EcoRV* (New England BioLabs) e *PacI* (New England BioLabs) (sublinhado no quadro 3.3). O produto de PCR e 10 µg de vetor foram digeridos com as endonucleases acima citadas, utilizando, 1U de enzima por µg de DNA em tampão 2.1 (New England BioLabs), a 37°C por 3 horas. O inserto foi purificado com um *kit* de purificação de produtos de PCR (QIAquick PCR Purification Kit- QIAGEN), seguindo instruções do fabricante, enquanto que o vetor foi submetido a eletroforese em gel de agarose 0,8%, para excisão da banda correspondente ao vetor linearizado. O DNA foi extraído do gel solubilizando a agarose em tampão de solubilização (Tris-HCl 100 mM pH 8, NaCl 250 mM, EDTA 1 mM pH 8) a 80°C sob agitação por 20 minutos. Após este tempo, foi adicionado 1 volume de fenol-clorofórmio, misturado vigorosamente e centrifugado a 13100 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi precipitado com 2 volumes de etanol 100% e 1/10 do volume de acetato de sódio 3M, pH 5,2.

10 µg de vetor e 3,5 µg de inserto foram ligados pela ação da *T4 DNA ligase* (Promega) a 16°C por 18 horas. Esta reação foi transformada em bactérias *E. coli* cepa DH5α, através de choque térmico, conforme descrito abaixo.

Após a confirmação dos clones por PCR de colônia e digestão enzimática, 20 µg de plasmídeo foram linearizados com a enzima *Kpn1* (New England BioLabs), precipitados e transfectados em *T. gondii* RHΔ*hxgprt*, onde o plasmídeo foi integrado no genoma aleatoriamente.

Para induzir a superexpressão de TgHDAC2, foi adicionado 1 µM de Shield-1, um análogo da rapamicina, ao meio de cultura, por 24 horas.

3.7 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

A transformação dos produtos das clonagens descritas no item 3.6 foi feita em bactérias *E. coli*, cepa DH5α ou Rosetta-gami™ 2 (DE3) pLysS cálcio-competentes, adicionando esse produto a 50 µL de bactérias. As bactérias adquiriram os plasmídeos por choque térmico, ao serem deixadas em gelo por 30 minutos, em seguida a 42°C por 2 minutos e novamente em gelo por mais 2 minutos. Foi adicionado 1 mL de meio LB (Luria-Bertani: triptona 1%, NaCl 0,5%, extrato de levedura 1%) ao tubo e colocado em estufa à 37°C durante 1 hora, sob agitação, para recuperação das bactérias recém transformadas. Decorrido este tempo, as bactérias foram semeadas em placa contendo LB sólido e ampicilina (100 µg/mL) ou kanamicina (50 µg/mL) como antibiótico de resistência.

3.8 SELEÇÃO DOS CLONES POSITIVOS

As colônias crescidas em placa após a transformação, foram submetidas a PCR de colônia, utilizando os *primers* específicos para detecção do inserto. Para tanto, foi retirada uma pequena quantidade das colônias escolhidas, com o auxílio de um palito, que foram colocadas diretamente em um microtubo de 0,2 mL, onde foram colocados os demais reagentes para reação de PCR (150 µM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 10 µmol de cada *primer*, 1 U da enzima *Taq DNA Polimerase*). Nesse caso, a *Taq DNA Polimerase* utilizada foi a recombinante, produzida e doada pelo Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP), uma vez que não era necessária alta fidelidade nesse caso. Vale mencionar, que ao mesmo tempo em que a colônia foi aplicada no tubo ela foi semeada em placa de LB/ampicilina ou kanamicina, dependendo do gene de resistência do plasmídeo, de modo a manter uma “placa-mãe” como estoque das colônias.

O próprio ciclo de temperatura da PCR é suficiente para romper a membrana das bactérias e expor o molde para a reação. Entretanto é feita uma extensão inicial mais longa (94°C, 10 minutos), seguido de 30 ciclos (94°C, 30 segundos; temperatura de anelamento a depender do conjunto de *primers*, por 30 segundos; 72°C, calculando-se 1 minuto a cada 1000 pb) e extensão final (72°C, 10 minutos). Após a reação de PCR os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, conforme descrito anteriormente no item 3.4.1.

As colônias positivas foram expandidas em meio líquido LB, com adição do antibiótico de resistência, a 37°C, durante a noite. Após o crescimento, os plasmídeos foram purificados por meio de *kit* QIAprep® Miniprep (QIAGEN), seguindo as instruções do fabricante. Adicionalmente, os clones foram novamente confirmados por digestão enzimática, conforme o quadro abaixo.

QUADRO 3.4 - ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO UTILIZADAS.

Plasmídeo	Enzimas	Tampão	Temperatura	Tempo
pLIC.HA.HXGPRT.Tghdac2 (confirmação)	<i>NheI</i> + <i>XhoI</i>	CutSmart® (New England Biolabs)	37°C	1 hora
pLIC.HA.HXGPRT.Tghdac2 (linearização)	<i>NheI</i>	NEBuffer 2.1 (New England Biolabs)	37°C	4 horas
pDONR221.Tghdac2	<i>EcoRV</i> + <i>Sall</i>	NEBuffer 3.1 (New England Biolabs)	37°C	1 hora
pDEST17.Tghdac2	<i>PvuII</i> + <i>XhoI</i>	NEBuffer 3.1 (New England Biolabs)	37°C	1 hora
p5RT70ddmycGFPPfMyoAtailT y-HX.Tghdac2 (confirmação)	<i>XhoI</i>	CutSmart® (New England Biolabs)	37°C	1 hora
p5RT70ddmycGFPPfMyoAtailT y-HX.Tghdac2 (linearização)	<i>KpnI</i>	NEBuffer 1.1 (New England Biolabs)	37°C	3 horas

As enzimas acima foram utilizadas para confirmação de clones ou linearização para transfecção. Para confirmações das clonagens foi utilizado 1 µg de DNA, enquanto que para linearização foi utilizado 20 µg de DNA para transfecção em *T. gondii*.

FONTE: a autora (2018)

3.9 PRECIPITAÇÃO DE DNA

Para a transfecção, os plasmídeos foram linearizados com enzimas específicas (QUADRO 3.4) e precipitadas, adicionando-se 2 volumes de etanol

absoluto e 1/10 do volume inicial de acetato de sódio 3 M pH 5,2 ou cloreto de sódio 200 mM. A precipitação ocorreu durante a noite a -20°C ou por 20 minutos, em gelo seco.

3.10 TRANSFEÇÃO EM *T. gondii*

Formas taquizoítas de *T. gondii* recém-saídas das células hospedeiras (10^7 por transfeção) foram centrifugadas por 10 min a 500 x g, lavadas uma vez com tampão CYTOMIX pH 7,6 (120 mM KCl, 0,15 mM CaCl₂, 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 25 mM HEPES 7,6, 2 mM EGTA, 5 mM MgCl₂) e ressuspendidas em 0,3 ml de CYTOMIX por transfeção, adicionando-se 2 mM de ATP.

Aos 0,3 mL desta suspensão, foram adicionados cerca de 5 µg (PCR de fusão para nocaute) ou 20 µg de plasmídeo previamente linearizado com a enzima correspondente para cada plasmídeo. A mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação de 2 mm de *gap* (Lonza), mantida em gelo, seguida de um pulso utilizando o programa T-16 do eletroporador Nucleofector™ (Lonza). Após o pulso, os parasitas foram transferidos para placas de 6 poços contendo fibroblastos confluentes. Vinte e quatro horas depois, adicionou-se ao meio 25 µg/ml de ácido micofenólico e 50 µg/ml de xantina para a seleção dos plasmídeos que possuem o gene *hxgpri* como gene de seleção.

Toxoplasma possui duas vias para síntese de purinas. Uma delas envolve a enzima *IMP desidrogenase* (IMPDH), que converte IMP em XMP. A outra envolve a enzima HXGPRT. O parasita utilizado nesse trabalho teve o gene que codifica para HXGPRT deletado, o que deixa o parasita somente com a IMPDH como via de síntese de purinas. Quando adicionamos ácido micofenólico, bloqueamos especificamente esta via, levando o parasita à morte, a menos que no mesmo tenha sido reinserido o gene *hxgpri* pelo cassete de fusão ou vetor de interesse. A xantina nesse caso, é também adicionada e funciona como substrato para a HXGPRT sintetizar purinas. Após a seleção as populações foram confirmadas por Western blot e imunofluorescência.

3.11 ENSAIO DE IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA

Para ensaios de imunofluorescência, utilizamos cerca de 10^6 formas taquizoítas de *T. gondii* para infectar fibroblastos confluentes, que foram

previamente crescidos em lâminulas, que por sua vez foram adicionadas aos poços de uma placa de 24 poços. Após cerca de 24 horas, foi retirado o meio de cultura e adicionado paraformaldeído 4% para fixar as células, por 20 minutos. Com as células já fixadas, elas foram permeabilizadas com PBS/Triton X-100 0,25% por 10 minutos, seguido de lavagem com PBS 1X (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄.2H₂O 9,1 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 7,4). O bloqueio foi feito com PBS/BSA 1% por 15 minutos. Após o bloqueio, adicionamos o anticorpo primário anti-HA (Clone 3F10-Roche), na diluição 1:200 para localização celular da proteína. Além desse, utilizamos anti-IMC (1:1000-Cedido gentilmente pelo Dr. Markus Meissner, University of Munich), e anti-GFP (Invitrogen, diluição 1:100). As incubações com anticorpo primário ocorreram por 1 hora. Passado esse período, as células foram novamente lavadas 3 vezes com PBS 1X. As lâminas foram incubadas com anti-IgG de coelho ou camundongo, conjugado a Alexa fluor na diluição 1:600 (488 e 594) por 40 minutos em PBS/BSA 1%. Em seguida, as lâminas foram lavadas e incubadas com 10 µM de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) por 10 min. As lâminas foram montadas com N-propil galacto, para preservar a fluorescência e analisadas em microscópio de fluorescência Nikon eclipse 80i ou invertido Leica DMI6000 B.

3.12 WESTERN BLOT

Para preparação de amostras proteicas, utilizamos formas taquizoítas de culturas cujos fibroblastos foram totalmente lisados. Os parasitas foram sedimentados a 500 x g por 10 minutos, seguido de uma lavagem em PBS 1X. Os parasitas foram ressuspensos em tampão de amostra para proteínas e as proteínas foram separadas em gel SDS-PAGE conforme descrito no item 3.4.2

Para cada amostra foi calculado a aplicação de aproximadamente 10⁷ parasitas por poço. Após a corrida eletroforética, as amostras do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, em cuba semi-seca (Semi-Dry-BIORAD), por 1 hora a 20 V, em tampão com 25 mM de Tris-base, 192 mM de glicina e 20% de metanol. O sucesso da transferência foi confirmado por coloração reversível com 0,5% de Ponceau S e 1% de ácido acético. Esta membrana foi lavada em água corrente deionizada e bloqueada em PBS/leite desnatado 5%, sob agitação, por uma hora. Após o bloqueio, o anticorpo primário foi incubado também na presença de 5% de leite, por uma hora. Passado o tempo de incubação do anticorpo primário (QUADRO 3.5), a membrana foi lavada com PBS/Tween 0,05% e

incubado com o anticorpo secundário, anti-camundongo (1:10000), anti-rato (1:500) ou anti-coelho (1:10000), por igual período, sob agitação. O anticorpo secundário utilizado, estava conjugado à peroxidase e foi revelado por quimioluminescência com o fotodocumentador para membranas L-Pix chemi express (Loccus).

QUADRO 3.5 - LISTA DE ANTICORPOS PRIMÁRIOS UTILIZADOS EM WESTERN BLOT.

Anticorpo	Marca	Diluição
Anti-H3 acetilada	Milipore	1:500
Anti-H4 acetilada	Abcam	1:500
Anti-HÁ	Clone 3F10-Roche	1:500
Anti-GFP	Invitrogen	1:1000
Anti- β -tubulina	Abcam	1:1000

FONTE: a autora (2018)

3.13 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

O plasmídeo pDest17 com a sequência da região codificante de TgHDAC2 foi transformado em bactérias *E. coli* Rosetta-gamiTM 2 (DE3) pLysS, conforme descrito anteriormente (item 3.7). Para expressão da proteína recombinante, as bactérias foram crescidas durante a noite, a 37°C sob agitação de 200 r.p.m., em inóculo contendo meio LB com adição dos antibióticos ampicilina (100 μ g/mL), tetraciclina (5 μ g/mL) e cloranfenicol (34 μ g/mL). Após 18 horas, 15 mL do pré-inóculo foram adicionados a 485 mL de meio LB com ampicilina, e deixados em agitador sob as mesmas condições anteriormente citadas. A massa de bactérias foi medida por D.O. (Densidade Óptica), com comprimento de onda de 600 nm. Quando a cultura atingiu D.O. entre 0,6 e 0,8, foi adicionado 1 mM de IPTG ao meio e novamente as culturas foram colocadas a 37°C sob agitação constante durante 4 horas. Após o tempo de expressão da proteína, a cultura foi centrifugada a 6000 x g por 10 minutos a 4°C. O meio foi retirado e o *pellet* foi congelado a -20°C.

O *pellet* foi ressuspendido em 5 mL de tampão para sonicação (fosfato de sódio 20 mM pH 7,5 e NaCl 180 mM), com inibidores de proteases, PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride) 0,1 M e benzamidina 0,5 M, além de lisozima 10 μ g/mL, para auxiliar na lise das células, e incubado por 30 minutos em gelo. Decorrido o tempo de incubação, a suspensão bacteriana foi submetida à lise por sonicação, com 5 pulsos de 15 segundos, seguido de 30 segundos em gelo, na

potência 5, no sonicador Ultrasonic Homogenizer 4710 Series (Cole-Parmer Scientific experts). Depois deste processo foi realizada centrifugação a 25000 x g por 30 minutos. O sobrenadante foi desprezado, uma vez que a proteína se encontrava na fração insolúvel. O *pellet* foi ressuspendido em 5 mL de tampão para sonicação suplementado com ureia 8 M.

A purificação foi realizada no cromatógrafo AKTA Purifier (GE Healthcare Life Sciences), com a coluna HisTrap HP (*Histidine-tagged Protein Purification*, GE Healthcare Life Sciences), utilizando os tampões A (fosfato de sódio 20 mM pH 7,5, NaCl 500 mM) e B (fosfato de sódio 20 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, imidazol 1M). Após a purificação por afinidade, verificou-se que a proteína ainda continha contaminantes, de modo que foi necessário realizar a purificação por troca iônica.

Para a purificação por troca iônica foram utilizadas as frações cuja proteína estava presente, e então diluído 10 vezes em tampão Tris HCl 20 mM pH 7. A escolha desse pH permite que a proteína adote uma carga total negativa, visto que seu ponto isoelétrico teórico que é 5,44. Assim, para a cromatografia de troca iônica utilizamos a coluna Hitrap Q (GE Healthcare Life Sciences), que possui carga positiva. Para eluição, utilizamos Tris HCl 20 mM pH 7, NaCl 1 M. Após a cromatografia, observou-se um grau de pureza aceitável da amostra e desta forma foi armazenada a 4°C.

3.14 DICROÍSMO CIRCULAR E ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ

Para realizar os experimentos de dicróismo circular e espalhamento dinâmico de luz, a proteína purificada foi submetida a diálise em membrana SnakeSkin Dialysis Tubing (Thermo Scientific), banhada por tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5, sob agitação durante a noite em câmara fria. Após a diálise a concentração da proteína foi estimada em 0,53 mg/mL pelo NanoDrop 2000c spectrophotometer (Thermo Scientific)).

Para o dicróismo circular, cerca de 200 μ L (0,53 mg/mL) da proteína foi colocada em uma cubeta com caminho ótico de 1 mm no equipamento Jasco J-815 CD Spectrometer, que possui o software Spectra Measure para aquisição dos espectros. Foi medido o comprimento de onda de 190 a 260 nanômetros (nm). As medidas em comprimentos de onda inferiores à 200 nm são importantes para estimativas de regiões desenoveladas (*coil*), já as medidas nos comprimentos de onda de 208 e 222 nm são importantes para as estimativas do conteúdo de estrutura

de α -hélice e em 215 nm as folhas- β , dessa forma é possível estimar o conteúdo de estrutura secundária da proteína e se ela não está desnaturada.

Neste equipamento também é possível realizar a desnaturação térmica da proteína, para saber sobre sua estabilidade em diferentes temperaturas. Para tanto, a temperatura foi elevada gradualmente de 20°C a 90°C, e o sinal de dicroísmo circular nos comprimentos de onda de 205, 208, 215 e 222 nm foram avaliados a cada elevação de 5°C. Após atingir 90°C, um espectro contínuo entre os comprimentos de onda de 190 e 260 nm foi coletado.

A análise dos resultados do dicroísmo circular foi feita com o software Microsoft Excel 2010, onde avaliou-se a porcentagem de desnaturação térmica e o espectro obtido nos diferentes comprimentos de onda.

O espalhamento dinâmico de luz, que avalia a estrutura quaternária da proteína através da detecção do espalhamento da luz incidida na amostra, foi medido no equipamento DynaPro NanoStar (Wyatt). O software que o equipamento utiliza é o Dynamics 7.17. Cerca de 4 μ L da amostra (0,53 mg/mL) foi colocada na cubeta apropriada para o equipamento, que retornou resultados a respeito da homogeneidade, massa molecular e se ela se encontrava agregada ou em monômeros.

3.15 CARACTERIZAÇÃO DE PARASITAS Δ TGHDAC2

3.15.1 Nocaute Gênico de *tghdac2*

Para realizar o nocaute gênico de TgHDAC2, na cepa de *T. gondii* RH Δ *hxgprt* Δ *ku80*, utilizamos o método de PCR de fusão, no qual foram amplificadas as regiões 3' e 5' não traduzidas (UTR-*Untranslated region*) a 1000 pb do gene *tghdac2*, que foi fusionada ao gene *hxgprt* (em verde na figura 3.5), utilizado como marcador de seleção. Para que a fusão entre as UTRs e o gene *hxgprt* ocorra, foram adicionados aos *primers reverse* da 5'-UTR e *forward* da 3'-UTR, uma pequena região que é complementar ao gene *hxgprt*. Como mencionado anteriormente, este gene foi deletado na cepa RH e pode ser utilizado como marcador de seleção, pela adição de ácido micofenólico e xantina (PFEFFERKORN e BOROTZ, 1994).

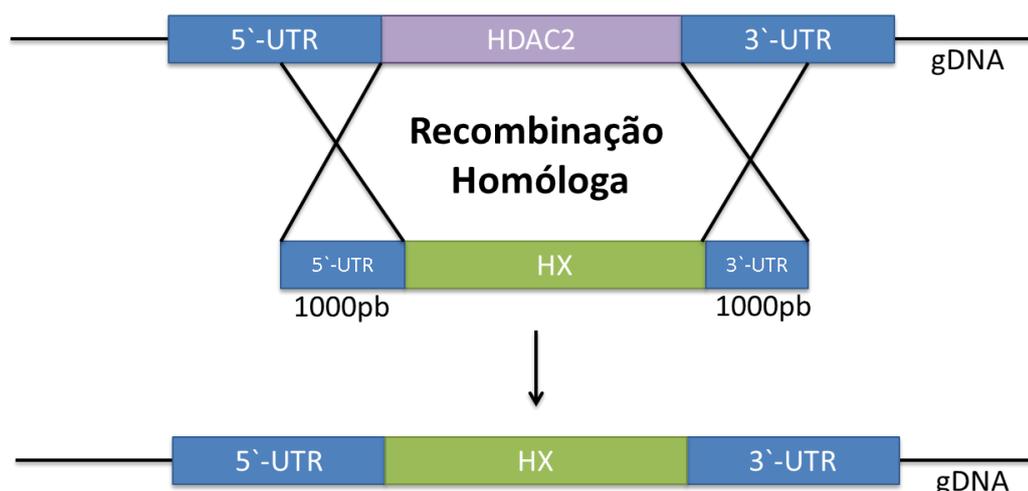


FIGURA 3.5 - REPRESENTAÇÃO DA ESTRATÉGIA PARA O NOCAUTE DE *tghdac2* NO GENOMA DO PARASITA.

FONTE: a autora (2018)

A PCR de fusão foi feita em três etapas. Primeiramente amplificamos 1011 pb da 5' UTR e 924 pb da 3' UTR do gene de *tghdac2*, utilizando os *primers* relacionados no quadro 3.6 (as regiões complementares ao gene *hxgprt* estão sublinhadas).

QUADRO 3.6 - SEQUÊNCIA DE *PRIMERS* PARA PCR DE FUSÃO

<i>Primer</i>	Sequência
5'1000F	AGCCTCGAGGGGGAGGTC
5'R	<u>CCGCGGGCGGGTTTGAATGCAAGGTTTCGTGCTGGGCAGCCGACCCTGACAAC</u>
3'1000F	<u>GTTCTGGCAGGCTACAGTGACACCGCGGTGGAGAACGGAAGGAGACGAAGAAAAAC</u>
3'R	CAGACAGAGGCAAAGGTAGGTAATG

Sequência de *primers* utilizados para amplificação das regiões 5' e 3' UTR do gene *tghdac2*

FONTE: a autora (2018)

A reação de PCR ocorreu pela adição de 100 ng de DNA genômico da cepa RH Δ *hxgprt* Δ *ku80*, com 150 μ M de MgCl₂, 200 μ M de dNTPs, 10 μ mol de cada *primer* e 1 U da enzima *Taq DNA Polimerase* (IBMP). A reação ocorreu a 94°C por 5 min para desnaturação do DNA, seguido de 30 ciclos de 94°C de desnaturação por 30 segundos, 57°C por 30 segundos para anelamento dos *primers* e 72°C por 2 minutos e 15 segundos para extensão, terminando com 10 min a 72°C para extensão do fragmento. Os produtos da PCR foram purificados com o *kit* de

purificação de produtos de PCR QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN), seguindo instruções do fabricante.

Como molde para amplificação de *hxgprt*, utilizamos 50 ng do vetor pLIC-HA-HXGPRT, 150 µM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 10 pmol de cada *primer*, 1 U da enzima *Taq DNA Polimerase* (IBMP), amplificando a região pela reação que compreendeu as seguintes etapas: 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 57°C durante 30 segundos, 72°C por 2 minutos, além de 10 minutos de extensão final a 72°C.

O produto desta PCR juntamente com as UTRs purificadas, foram submetidas a uma reação de PCR, porém sem a adição de *primers*. Essa primeira reação aumenta a eficiência da PCR de fusão, uma vez que permite o correto posicionamento e pareamento das sequências na região que sobrepõe o gene *hxgprt*. Para esta reação foi utilizada uma proporção de 10 vezes mais moléculas ($3,8 \times 10^{10}$) das regiões intergênicas (5' e 3' UTR) do que do gene de seleção, de acordo com o cálculo: nº de moléculas (pmol) = 0,66 X tamanho (pb)/ ng. Nesta reação, também, adicionou-se 150 µM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 1U da enzima *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase* (New England BioLabs), além do tampão apropriado para a enzima (GC). A reação ocorreu nas seguintes etapas: 98°C durante 5 minutos, seguindo 20 ciclos de 98°C por 30 segundos, 50°C durante 30 segundos, 72°C por 3 minutos e uma extensão final a 72°C por 8 minutos.

Dois microlitros desta reação foram usados como molde para uma segunda PCR, desta vez com os *primers* específicos (*primer* 5'1000 F + *primer* 3'R) e conforme já descrito, utilizando a seguinte reação PCR: 98°C por 30 segundos, 30 ciclos de 98°C durante 10 segundos, 58°C por 30 segundos, 72°C por 2 minutos e 30 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos. Nesta PCR também foi utilizado 1U da enzima *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase* (New England BioLabs).

O produto da reação de PCR foi analisado em gel de agarose 1% conforme descrito no item 3.4.1. Diversas bandas inespecíficas foram detectadas, de modo que a banda de 4 kb, referente ao cassete UTRs fusionadas a *hxgprt*, foi excisada do gel e purificada com o *kit* Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), conforme instruções do fabricante.

Cerca de 5 µg do cassete purificado foram utilizados para transfectar formas taquizoítas, conforme indicado no item 3.10. Por meio de recombinação homóloga, o gene *tghdac2* é substituído pelo gene de seleção *hxgprt*.

Após a transfecção e seleção dos transfectantes, o DNA genômico da população transfectante e controle (RH Δ *hxgprt* Δ *ku80*) foi extraída (conforme descrito no item 3.2) e confirmado por PCR. Para tanto, verificamos se gene *hxgprt* estava presente na população, utilizando os *primers*:

QUADRO 3.7 - Sequência de *primers* para detecção do gene *hxgprt*.

Primer	Sequência
HX detection F	CCAAACCCATTGAAGACTAC
HX detection R	GAAAAGAGAGGAAAACGAGAGA

FONTE: a autora (2018)

Essa reação amplifica produto de 737 pb. A reação foi realizada com DNA genômico da população transfectante e com *T. gondii* cepa RH Δ *hxgprt* Δ *ku80*. Para esta PCR foi utilizado 1U da enzima *Taq DNA polimerase* (IBMP), em tampão específico com 150 µM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs. A reação de PCR ocorreu iniciando com uma desnaturação (94°C, 5 minutos), seguindo-se 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 57°C como temperatura de anelamento por 30 segundos e 1 minuto de extensão a 72°C, além de extensão fina a 72°C por 10 minutos, de acordo com as instruções do fabricante.

Adicionalmente, foi verificado se o cassete estava inserido no local correto, utilizando *primer reverse* que parecia dentro do gene de seleção (HX integration R) e *primers foward* desenhados a 1011 pb a montante do gene *tghdac2* (utilizado para construção do cassete (5'1000 F), e 1970 pb a montante do gene (5'2000 F), resultando em amplicons de 1251 pb e 2210 pb, respectivamente:

QUADRO 3.8 - Sequência de *primers* para confirmação do nocaute gênico

Primer	Sequência
HX integration R	CCCGAGAAAAAGAAACGAACAGA
5'1000 F	AGCCTCGAGGGGGAGGTC
5'2000 F	CTTCTTGAACCAAAGTCCGACG

FONTE: a autora (2018)

Em ambas as PCRs (com *primer* 5'1000 F ou 5'2000 F) utilizou-se 1U da enzima *Taq DNA polimerase* (IBMP), em tampão específico com 150 μ M de $MgCl_2$, 200 μ M de dNTPs. Essa reação ocorreu com um ciclo de 94°C por 5 minutos e mais 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos e 2 minutos de extensão a 72°C, e por fim um último ciclo de 72°C durante 10 minutos para extensão final dos fragmentos de acordo com as instruções do fabricante.

Adicionalmente, utilizamos os *primers* utilizados para amplificação de cerca de 1000 pb da porção final do gene *hdac2* (*primers* *hdac2 tag F* e *hdac2 tag R*), conforme descrito no item 3.6.1, para confirmar que o gene foi nocauteado.

Todas as PCRs foram visualizadas após eletroforese em gel de agarose 1%, como descrito no item 3.4.1.

Após a confirmação dos mutantes, eles foram submetidos a clonagem por diluição limitante em placa de 96 poços onde foi colocado um parasita por poço, conforme descrito por Pfefferkorn e Pfefferkorn (1976).

3.15.2 Ensaio de formação de placa

Para analisar se há alguma alteração no crescimento de parasitas *Δtghdac2*, foi utilizado o ensaio de formação de placas de lise. Para tanto, parasitas intracelulares das cepas nocaute e controle (*RHΔhxgprtΔku80*) foram lisados manualmente, com auxílio de seringas com agulha de 24G e contados em câmara de Neubauer. Os parasitas foram diluídos de forma a adicionar apenas 500 parasitas por poço, em placas de 6 poços com células HFF confluentes. Depois de 5 dias, o meio de cultura foi retirado e lavado 3 vezes com PBS 1X e, então, foram fixadas com metanol 100% gelado, por 5 minutos. O metanol foi retirado e quando as placas estavam completamente secas, as células foram coradas com Giemsa, diluído em 3 gotas por mL de água, por 10 minutos e posteriormente lavadas em água deionizada para retirar o excesso de corante. Quando as placas secaram, o número de placas de lise de três experimentos independentes foi contado manualmente a olho nu e os resultados foram submetidos a análise estatística por teste T no software GraphPad Prism versão 7 disponível em www.graphpad.com.

3.15.3 Ensaio de replicação e invasão

Para os ensaios de replicação e invasão, as cepas nocaute e controle (RH Δ hxgp Δ ku80) foram lisados manualmente com auxílio de seringa, conforme descrito no item acima, e contados em câmara de Neubauer. Os parasitas foram colocados em placas de 24 poços com células HFF previamente crescidas sobre lamínulas, e deixados para invadir por 1 hora. Após o tempo de invasão, o meio foi retirado, os poços foram lavados 3 vezes com PBS 1X e então adicionado meio novo. 24 horas depois, as células foram submetidas a fixação, permeabilização e bloqueio como já descrito no item 3.11, seguido de incubação utilizando anticorpo α -IMC (1:1000), que marca o complexo interno de membranas de *T. gondii*, para facilitar a contagem de parasitas por vacúolo no caso do ensaio de replicação e vacúolos por célula para o ensaio de invasão.

Para o ensaio de replicação foram utilizados 10^5 parasitas por poço, enquanto que para o ensaio de invasão foram utilizados 10^6 parasitas por poço.

3.15.4 Ciclo Celular por citometria de fluxo

A fim de analisar o perfil de ciclo celular dos parasitas *Atghdac2* em diferentes tempos, 10^6 parasitas, tanto nocaute quanto controle (RH Δ hxgp Δ ku80), foram colocados para infectar células HFF confluentes durante 24 horas e 72 horas. Decorrido esse tempo de replicação, os parasitas foram lisados da célula hospedeira manualmente com seringa, para preservar as diferentes fases do ciclo desses parasitas e então, centrifugados a $500 \times g$ por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e os parasitas foram lavados com PBS 1X e centrifugados novamente na mesma condição. Após a lavagem, os parasitas foram ressuspensos em 5 mL de PBS 1X e purificados em membrana de policarbonato de $3 \mu\text{m}$ (Whatman® Nuclepore Track-Etched Membranes), afim de eliminar *debris* da célula hospedeira. Os parasitas purificados foram novamente centrifugados, o PBS foi retirado e os parasitas foram fixados em 5 mL de etanol 70% por, no mínimo, 18 horas. Após a fixação, os parasitas foram centrifugados a $3000 \times g$ por 5 minutos, o etanol foi retirado e os parasitas foram ressuspensos em $100 \mu\text{L}$ de PBS 1X, onde adicionou-se $200 \mu\text{L}$ de solução contendo iodeto de propídio ($10 \mu\text{g/mL}$), RNase A ($100 \mu\text{g/mL}$) e Triton X-100 (0,1%) e incubadas por 30 minutos no escuro. As amostras foram lidas pelo citômetro de fluxo FACSAria™ (BD). As *gates* foram

selecionadas excluindo-se *debris* e grumos celulares. O ciclo celular obtido foi analisado pelo software FlowJo.

3.15.5 Ensaio de incorporação de EdU

Para analisar se a ausência de TgHDAC2 em *T. gondii* afeta a fase S do ciclo celular, foi feito um ensaio de incorporação de EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine), um análogo de timidina. O EdU é incorporado durante a síntese da nova fita de DNA, e possui vantagens por ser uma molécula pequena que é facilmente detectada pela azida marcada, evitando os passos de desnaturação de DNA que a marcação com BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) exige. Para tanto, células HFF confluentes, previamente crescidas sob lamínula, foram infectadas com 5×10^5 parasitas *Δtghdac2* ou controle (RH*ΔhxxgprtΔku80*) por 24 horas. Após esse período, o meio foi retirado e as células foram lavadas três vezes com PBS 1X, e adicionado meio novo com adição de 500 μM de EdU por 2 horas. Após o tempo de incorporação, as células foram novamente lavadas com PBS 1X e fixadas com paraformaldeído 4% durante 20 minutos, quando foram lavadas novamente e incubadas em solução para marcação de EdU (CuSO₄ 100 mM, ácido ascórbico 500 mM, azida-alexa 488) por 1 hora. As lamínulas foram seladas com Vectashield (Vector Laboratories), que já contém DAPI para marcação do núcleo e visualizadas no microscópio de fluorescência (a metodologia de marcação com EdU, foi realizada no Instituto Butantan, em colaboração com a Dra. Maria Carolina Elias-Sabbaga)

3.15.6 Microscopia eletrônica de varredura

Para realizar a microscopia eletrônica de varredura, células HFF, previamente crescidas sobre lamínula, foram incubadas com as cepas *Δtghdac2* e controle (RH*ΔhxxgprtΔku80*) durante 24 horas para que ocorresse a infecção e replicação dentro do vacúolo. Decorrido esse tempo, as células foram fixadas durante 30 minutos com tampão de fixação (glutaraldeído 2,5%, PFA 4% diluídos em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2) e lavados duas vezes de 5 a 10 minutos com o mesmo tampão. A seguir, foi adicionado 1% de OsO₄, diluído em tampão cacodilato 0,1 M por 1 hora. Após a incubação as amostras foram lavadas 3 vezes no mesmo tampão e então, desidratado por 10 minutos em concentrações crescentes de acetona (30%-100%).

Foi feito o ponto crítico nas amostras antes de metalizar com ouro e então a superfície das células foi destacada com auxílio de uma fita adesiva.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISES *IN SILICO* DE TGHDAC2

No banco de dados de *T. gondii* são encontradas diversas informações a respeito dos genes e das respectivas proteínas do parasita, depositadas pelos pesquisadores que trabalham com esse modelo. Dentre os dados disponíveis referente a TgHDAC2 (TGME49_249620), os que mais chamaram atenção foram os dados de expressão gênica obtidos através de hibridação em microarranjo, que contém sondas representando todos os genes preditos de *T. gondii* (Affymetrix). TgHDAC2 tem expressão constante nas diferentes formas do ciclo vida analisadas (taquizoítas, bradizoítas e oocistos) (FRITZ et al, 2012), no entanto, apresenta um pico de expressão durante a fase S do ciclo celular (FIGURA 4.1), ou seja, a fase de síntese do DNA, o que sugere alguma função relacionada a esse processo (BEHNKE et al, 2010).

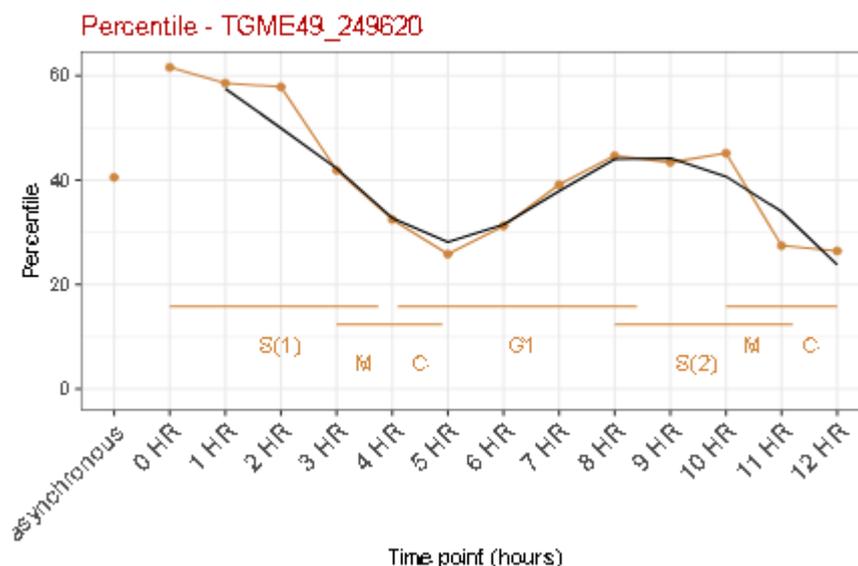


FIGURA 4.1 - EXPRESSÃO DE TGHDAC2 AO LONGO DO CICLO CELULAR.

Dados de hibridação em microarranjo de DNA, onde as diferentes fases do ciclo celular de formas taquizoítas foram analisadas, mostrando que TgHDAC2 possui um pico de expressão na fase S do ciclo celular (Behnke et al, 2010).

FONTE: ToxoDB

Além disso, dados de transcriptoma durante a invasão de taquizoítas, também presentes no banco de dados de *T. gondii*, revelaram que a TgHDAC2 tem menor nível de expressão logo após a invasão da célula hospedeira, aumentando sua expressão 2 horas pós infecção, quando o parasita aumenta a expressão de genes

relacionados a reparo de DNA e replicação. O maior nível de expressão é atingido quando o parasita está fora da célula hospedeira, no meio extracelular, quando os genes de invasão, transcrição e tradução são mais expressos (GAJI, et al 2011). Estes dados podem indicar alguma função especializada de TgHDAC2 tanto durante a invasão quanto durante a replicação (FIGURA 4.2).

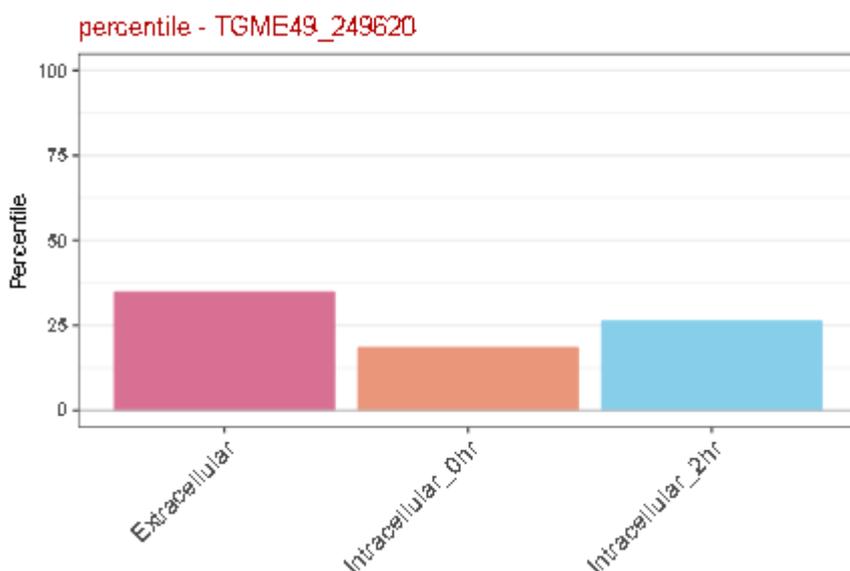


FIGURA 4.2 - DADOS DE TRANSCRIPTOMA DURANTE A INVASÃO

Análises de microarranjo realizadas por Gaji et al (2011), depositados no banco de dados de *T. gondii* indicam que TgHDAC2 tem maior nível de expressão em parasitas extracelulares e intracelulares 2 horas pós invasão, quando comparados a parasitas que recém invadiram as células hospedeiras.

FONTE: Toxodb

A fim de verificar proteínas similares a TgHDAC2, foi realizada uma busca com o algoritmo BLASTp, que analisa a homologia de sequência com outras proteínas depositadas em bancos de dados. Com a lista de proteínas mais próximas em sequência de aminoácidos, realizamos um alinhamento utilizando o programa MegaAlign, do pacote DNASTar, que emprega o algoritmo ClustalW, que permite alinhamento de múltiplas sequências. As sequencias foram editadas no programa GeneDoc, disponível gratuitamente online (<http://genedoc.software.informer.com/>) (FIGURA 4.3).

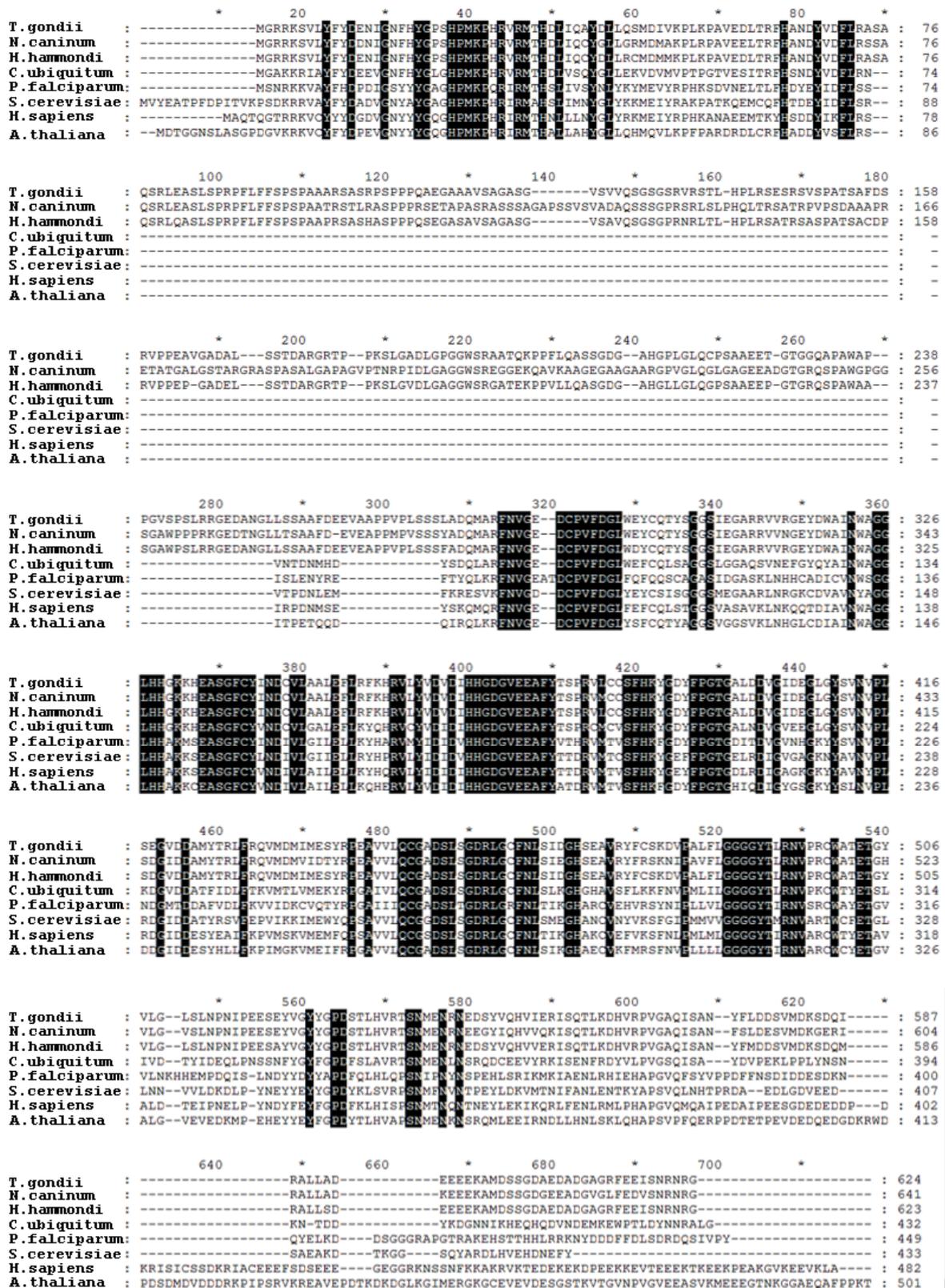


FIGURA 4.3- ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS.

Alinhamento de sequências proteicas de TgHDAC2 de *T. gondii* com as desacetilases de histonas mais semelhantes dos seguintes organismos: *Neospora caninum* (HDAC putativa-[XP_003886178.1](#)), *Hammondia hammondi* (HDAC2-[XP_00888601.1](#)), *Plasmodium falciparum* (HDAC1-[PF3D7_0925700](#)), *Cryptosporidium ubiquitum* (HDAC putativa-[OII73032.1](#)), *Homo sapiens* (HDAC1-CAG46518.1), *Arabidopsis thaliana* (HDAC6-AED97705.1) e *Saccharomyces cerevisiae* (Rpd3-

AAB20328.1). Estas sequências foram selecionadas com base no resultado do Blastp, onde se procurou escolher as proteínas mais parecidas de membros do filo Apicomplexa, bem como de organismos modelo. Em preto estão destacados os aminoácidos idênticos para todas as sequências analisadas.

FONTE: a autora (2018)

Dentro do resultado obtido pelo BLASTp, foram escolhidas proteínas semelhantes de organismos modelo, como *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) e *Homo sapiens* (*H. sapiens*). Também foram incluídos desacetilases de outros organismos do filo Apicomplexa, como *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), *Hammondia hammondi* (*H. hammondi*), *Neospora caninum* (*N. caninum*) e *Cryptosporidium ubiquitum* (*C. ubiquitum*).

As HDACs de *H. hammondi* e *N. caninum* são bastante semelhantes à TgHDAC2 de *T. gondii*, pois assim como esta, também possuem inserções aminoacídicas dentro do domínio HDAC (que podem ser observadas a partir do aminoácido 74, na figura 4.3). Apesar de *C. ubiquitum* também possuir inserções no domínio HDAC, estas não são tão semelhantes à *T. gondii*. Por outro lado, apesar de *P. falciparum* fazer parte do filo Apicomplexa, sua histona desacetilase é muito divergente quando comparada com a HDAC2 de *T. gondii*. E também podemos concluir que a TgHDAC2 é, de fato, uma histona desacetilase classe I, pois possui homologia com a RPD3 de levedura, uma das características dos membros pertencentes a essa classe.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DE PARASITAS Δ TGHDAC2

4.2.1 Construção de parasitas nocaute para o gene *tghdac2*

Para iniciar a caracterização de TgHDAC2, escolhemos a abordagem do nocaute gênico, o que poderia fornecer um indicio sobre sua função no parasita. Para tanto, realizamos a construção de um cassete contendo as regiões não traduzidas de *tghdac2* fusionadas ao gene *hxgprt*, que substituiu *tghdac2* no genoma e atuou como marcador de seleção.

Primeiramente, porções de 1011 pb da 5'UTR e 924 pb da 3'UTR do gene *tghdac2* foram amplificadas e fusionadas ao gene *hxgprt*. A fusão foi confirmada por meio de uma corrida eletroforética em gel de agarose, seguindo os princípios já mencionados. A análise do gel (FIGURA 4.4) mostrou que a fusão ocorreu conforme o esperado, resultando em uma banda de aproximadamente 4 kb, correspondendo à

fusão dos três fragmentos (924 pb da 3' UTR + 1011 pb da 5' UTR + 1800 pb do gene *hxgprrt*)

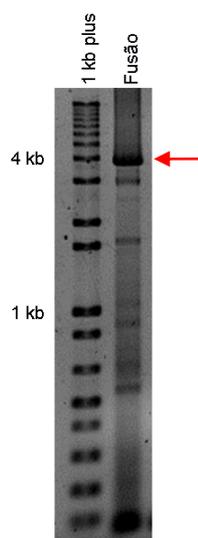


FIGURA 4.4- OBTENÇÃO DO CASSETE GÊNICO PARA O NOCAUTE.

Aproximadamente 1000 pb das regiões 5' e 3' UTR de *tghdac2* foram amplificadas e fusionadas ao gene *hxgprrt*. O produto da PCR de fusão foi analisado em gel de agarose 1%, revelando a banda do tamanho esperado em torno de 4 kb, além de bandas inespecíficas.

FONTE: a autora (2018)

Como pode ser observado na figura acima, diversas bandas inespecíficas foram detectadas, fazendo-se necessário excisão e purificação da banda do gel do tamanho correspondente ao cassete de nocaute. Após a purificação, o cassete foi submetido a reações de PCR utilizando *primers* internos, a fim de cobrir uma maior quantidade da sequência e verificar a correta fusão. Os *primers* internos foram desenhados com intuito de apanhar a região do gene de seleção e as regiões de recombinação, no caso, as UTRs. Os *amplicons* foram enviados para sequenciamento.

Após a confirmação que o cassete continha as sequências corretas, o transfectamos em formas taquizoítas de *T. gondii*, cepa RH Δ *hxgprrt* Δ *ku80*. A seleção durou cerca de duas semanas, e baseou-se na síntese de purinas pela reativação da via dependente de HXGPRT (conforme descrito no item 3.15.1 de material e métodos). Para confirmar se os parasitas selecionados são de fato nocautes para TgHDAC2, o DNA genômico da população transfectada, bem como da cepa RH Δ *hxgprrt* Δ *ku80*, foram extraídos e utilizados como molde para reações de PCR de modo a confirmar a inserção correta do cassete. Quatro PCRs foram realizadas: as duas primeiras utilizaram *primers* que pareiam no interior do gene *hxgprrt* e na região

5'UTR, amplificando cerca de 1200 ou 2200 pb (PCRs 1 e 2, respectivamente); a terceira utilizou *primers* para detecção apenas do gene *hxgprt*, já que o gene foi reinserido no genoma; a última utilizou *primers* para detecção do gene *tghdac2* (FIGURA 4.5 e 4.6).

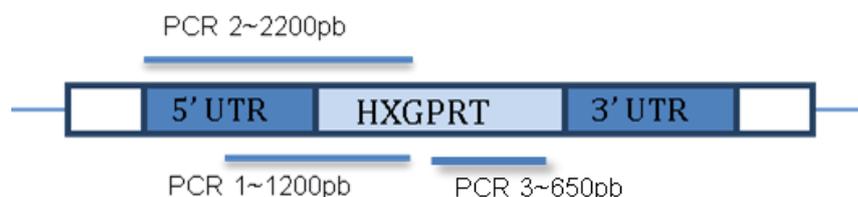


FIGURA 4.5 – ESQUEMA DAS PCRS UTILIZADAS PARA CONFIRMAÇÃO DA POPULAÇÃO TRANSFECTADA.

A PCR 1 amplifica uma região interna ao gene de seleção *hxgprt* e uma região de 1000 pb da 5'UTR do gene *tghdac2*. Já a PCR 2 amplifica uma região mais externa, de 2000 pb, na 5'UTR e a mesma região interna ao gene de seleção. A PCR 3 amplifica aproximadamente 650 pb do gene *hxgprt*.

FONTE: a autora (2018).

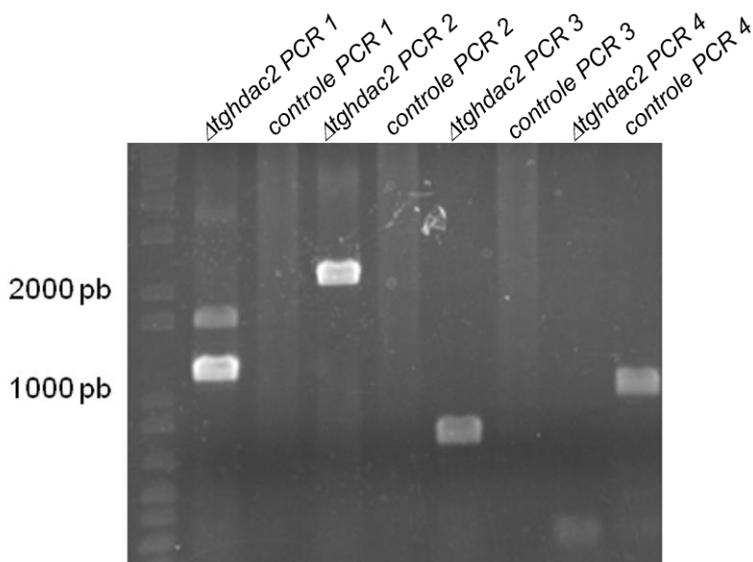


FIGURA 4.6- CONFIRMAÇÃO DO NOCAUTE GÊNICO.

A primeira canaleta de cada par de PCR se refere aos parasitas $\Delta tghdac2$ (nocaute), enquanto que a segunda foi feita a partir do DNA genômico de parasitas RH $\Delta hxgprt\Delta ku80$ (controle). Foram feitas quatro PCRs para confirmação: a PCR 1 compreende uma região de 1011 pb da UTR do gene e uma região interna ao gene *hxgprt*, a PCR 2 abrange uma região de 1970 pb da UTR e e uma região interna ao gene *hxgprt*. Em ambos, há amplificação de produto de tamanho esperado apenas nos parasitas $\Delta tghdac2$. A terceira PCR (hx det.) foi utilizado para detecção do gene de resistência *hxgprt*, compreendendo uma região interna a esse gene, o qual houve amplificação apenas em $\Delta tghdac2$. A última PCR foi feita para confirmar a presença do gene *tghdac2* e não houve amplificação nos parasitas $\Delta tghdac2$, confirmando a depleção.

FONTE: a autora (2018)

Após confirmar que a população era nocaute para o gene *tghdac2* (FIGURA 4.6), foi feita a clonagem por diluição limitante em placa de 96 poços. Doze clones

foram selecionados para confirmação, novamente por PCR, dos quais todos foram positivos. Sendo assim, três clones (denominados A7, G1 e H8) foram mantidos para as análises posteriores. Em todas as análises apresentadas nessa dissertação, foi utilizado o clone A7.

4.2.2 Análise do crescimento dos parasitas $\Delta tghdac2$ através de ensaio de formação de placas de lise

O ensaio de formação de placa é um ensaio utilizado para avaliar se há diferença de crescimento dos parasitas transfectados, baseado nas etapas de lise e reinfeção da célula hospedeira sucessivamente, de modo a formar placas de lise visíveis a olho nu. Essa diferença no número ou tamanho das placas de lise podem estar relacionadas a replicação do parasita (divisão celular), invasão da célula hospedeira ou egresso (saída da célula hospedeira), sendo utilizado por muitos autores como primeiro teste para avaliação de parasitas geneticamente modificados. Portanto, utilizamos este ensaio para avaliação do crescimento da cepa nocaute para *tghdac2*, utilizando como controle a cepa $RH\Delta hxgprt\Delta ku80$. Como pode ser observado no gráfico 4.1, há uma notável diferença entre os parasitas $\Delta tghdac2$ e o controle $RH\Delta hxgprt\Delta ku80$.

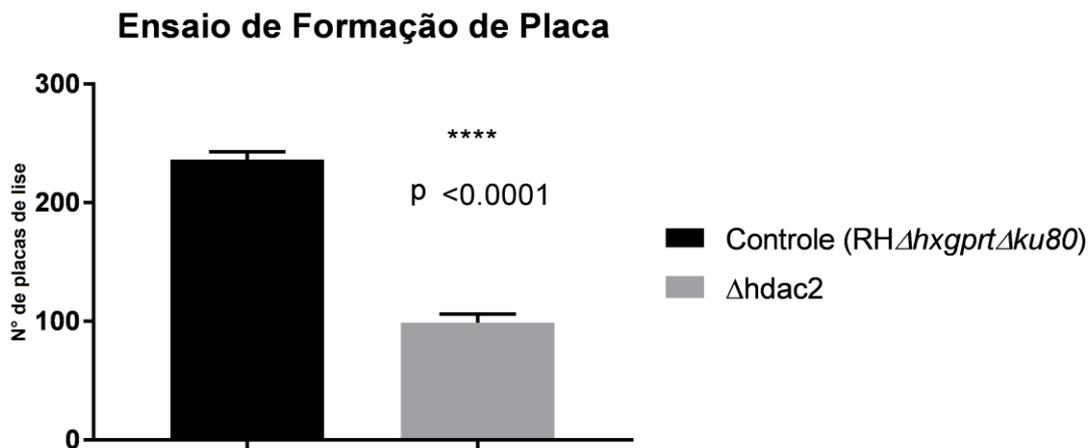


GRÁFICO 4.1 - ENSAIO DE FORMAÇÃO DE PLACA.

Células HFF confluentes, previamente crescidas em placa de seis poços até obter confluência, foram infectadas com 500 parasitas por poço. Após seis dias foram fixadas e coradas com Giemsa. A quantidade de placas de lise em três experimentos independentes foi contada manualmente a olho nu e submetidos a análise estatística por Teste T. O teste T foi feito usando GraphPad Prism versão 7.

FONTE: a autora (2018)

Estes resultados representam uma média de três experimentos independentes. Observamos uma média de 98 placas de lise em comparação com 236 placas no controle (GRÁFICO 4.1), sendo significativo a 0,05 graus de liberdade. Embora esse dado indique que o nocaute afeta a invasão da célula hospedeira, também observamos que as placas de lise eram menores, quando comparado com o controle (FIGURA 4.7), o que normalmente reflete um atraso na proliferação celular. Apesar disso, pode haver ainda um problema no egresso e invasão de novas células, o que resultaria em placas menores.

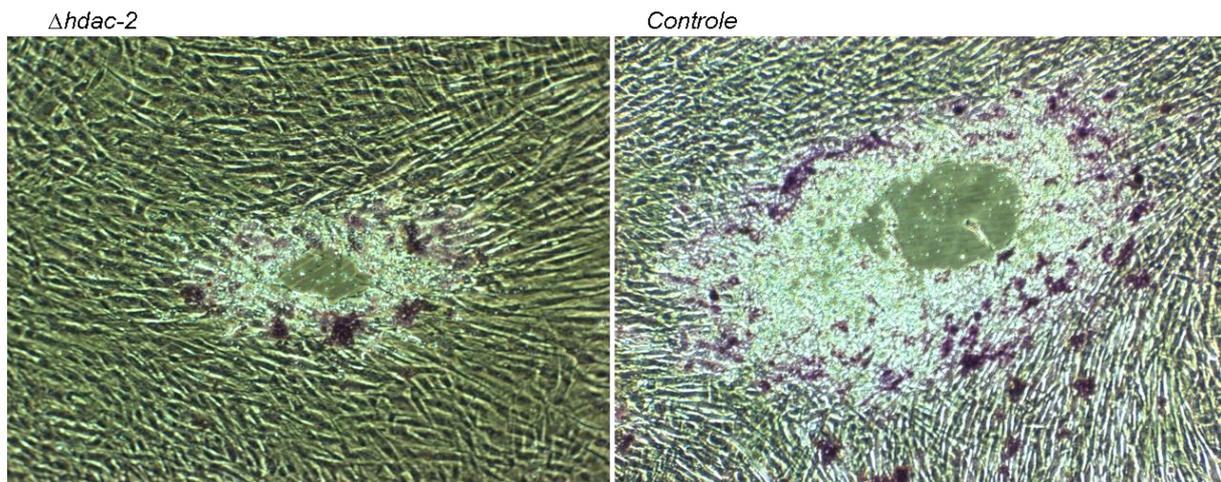


FIGURA 4.7- PLACAS DE LISE FORMADAS APÓS INVASÃO E REPLICAÇÃO DE CÉLULAS HFF POR TAQUIZOÍTAS

Imagens representativas de placas de lise visualizadas ao microscópio óptico após coloração com Giemsa, ambas no aumento de 40x. É possível perceber que as placas de lise formadas por parasitas *Δtghdac2* são menores quando comparadas ao controle (*RHΔhxgprtΔku80*).

FONTE: a autora (2018)

4.2.3 Avaliação do crescimento e invasão de parasitas *Δtghdac2*

O ensaio de placa apresentou um panorama geral do efeito do nocaute do gene *tghdac2* nos processos de invasão, replicação e egresso do parasita. Uma vez que foi observado que os parasitas *Δtghdac2* possuem menos e menores placas de lise, partimos para realização de ensaios de invasão e replicação, de forma a analisar esses processos independentemente.

Para tanto, os parasitas foram submetidos a invasão de células HFF, seguida de 24 horas para replicação celular. Os parasitas foram então marcados com anti-IMC, que reconhece uma proteína do complexo de membranas interno, o que facilita a contagem no microscópio. Tanto o número de vacúolos por célula, quanto o número de parasitas por vacúolo foi contado, refletindo na capacidade de invasão do parasita, e ou na replicação, respectivamente.

No ensaio de invasão, observamos um menor número de vacúolos por fibroblasto na cepa *Δtghdac2*. Foi detectado uma média de 1 vacúolo por célula na cepa *Δtghdac2* enquanto que a cepa controle (*RHΔhxgprtΔku80*) apresentava uma média de 4 vacúolos por célula, o que sugere que esses parasitas possuem algum atraso ou defeito durante a invasão à célula hospedeira, corroborando os dados observados no ensaio de placa (GRÁFICO 4.2).

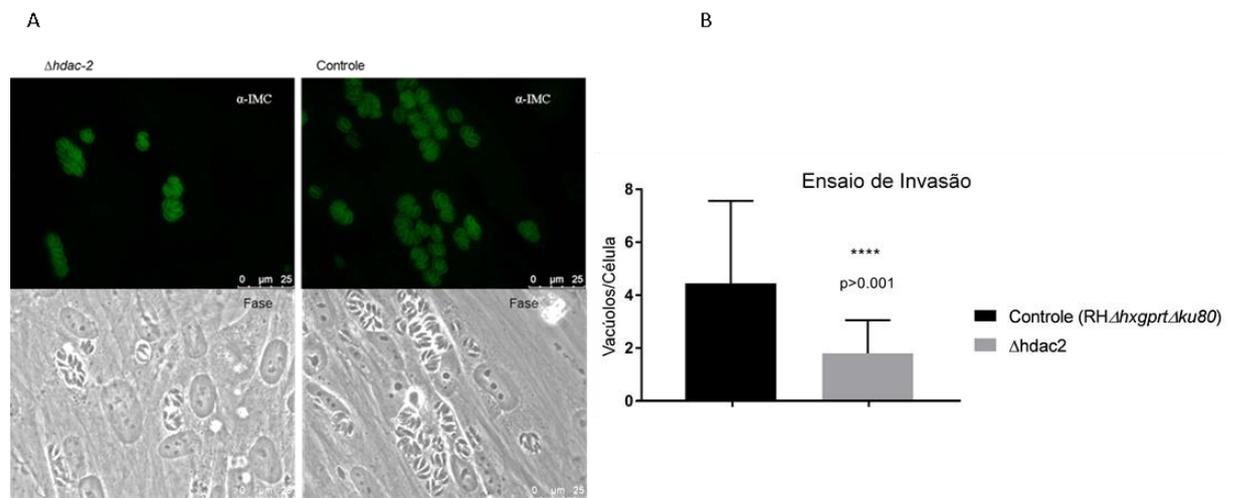


GRÁFICO 4.2 – ENSAIO DE INVASÃO.

10^6 parasitas ($\Delta tghdac2$ e controle) foram submetidos a invasão de células HFF durante 1 hora. Após o tempo de invasão, o meio foi retirado e as células foram lavadas com PBS 1X, e adicionado meio novo, onde os parasitas replicaram por mais 24 horas seguida de fixação e marcação com anti-IMC (A). Neste ensaio o número de vacúolos por célula foi contado em 3 replicatas técnicas (B). A análise estatística foi feita utilizando o Teste T, que mostrou médias significativamente diferentes. Para realização do teste T, foi utilizado GraphPad Prism versão 7.

FONTE: a autora (2018)

Da mesma forma, o ensaio de replicação, também mostrou redução nos parasitas nocaute, ou seja, os vacúolos contendo parasitas $\Delta tghdac2$ apresentaram uma média de 8 parasitas, enquanto que os vacúolos dos parasitas controle (RH $\Delta hxgp rt\Delta ku80$) possuíam 16 parasitas em média (GRÁFICO 4.3). O resultado indica um atraso ou defeito na progressão do ciclo celular, e sugere uma possível função de TgHDAC2 durante a replicação, uma vez que é nessa fase do ciclo que a expressão de *tghdac2* está aumentada.

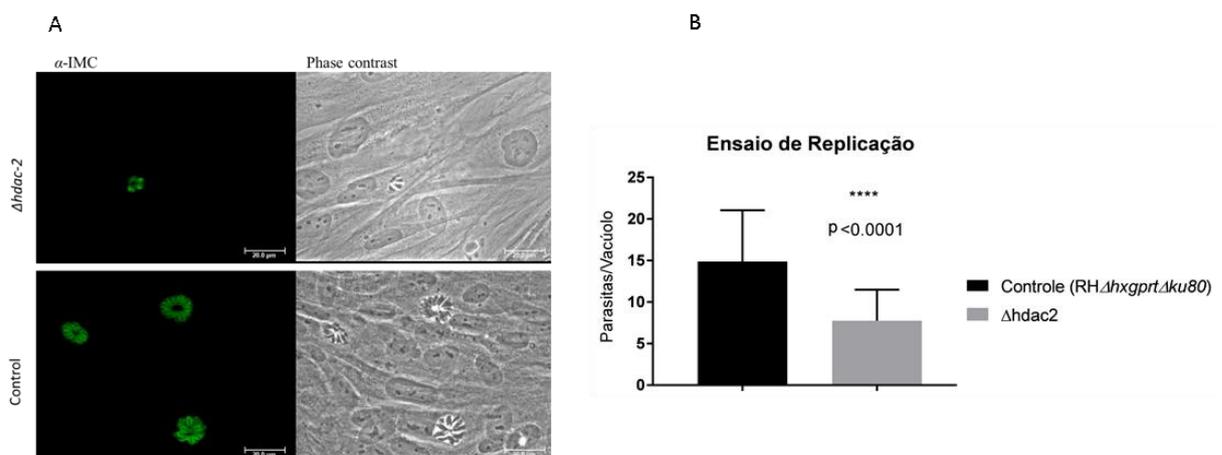


GRÁFICO 4.3 - ENSAIO DE REPLICAÇÃO.

10⁵ parasitas infectaram células HFF confluentes por 1 hora, quando o meio foi retirado e as células foram lavadas com PBS 1X. Após adição de meio novo os parasitas replicaram por mais 24 horas quando foram fixados (A) imunofluorescência indireta para o complexo interno de membranas (IMC) do parasita. (B) O número de parasitas por vacúolo foi contado em 2 replicatas técnicas e 2 replicatas biológicas e as médias foram analisadas por Teste T. O teste T foi feito usando GraphPad Prism versão 7.

FONTE: a autora (2018)

Ambos os ensaios mostraram que as médias são significativamente diferentes entre os parasitas *Δtghdac2* e controle a 0,001 graus de liberdade, que confirmam que a deleção do gene *tghdac2* afeta tanto a replicação quanto a invasão de *T. gondii*, sugerindo a função da proteína nestes dois eventos.

4.2.4 Análise do ciclo celular através de citometria de fluxo e incorporação de EdU.

Uma vez que houve diferença significativa na replicação dos parasitas *Δtghdac2*, foi avaliado o ciclo celular destes parasitas, com o objetivo de saber se haveria alguma diferença significativa em uma das fases especificamente. As análises foram feitas por citometria de fluxo, onde avaliou-se a quantidade de DNA após marcação com iodeto de propídeo em populações de taquizoítas, 24 e 72 horas após a infecção (FIGURA 4.8).

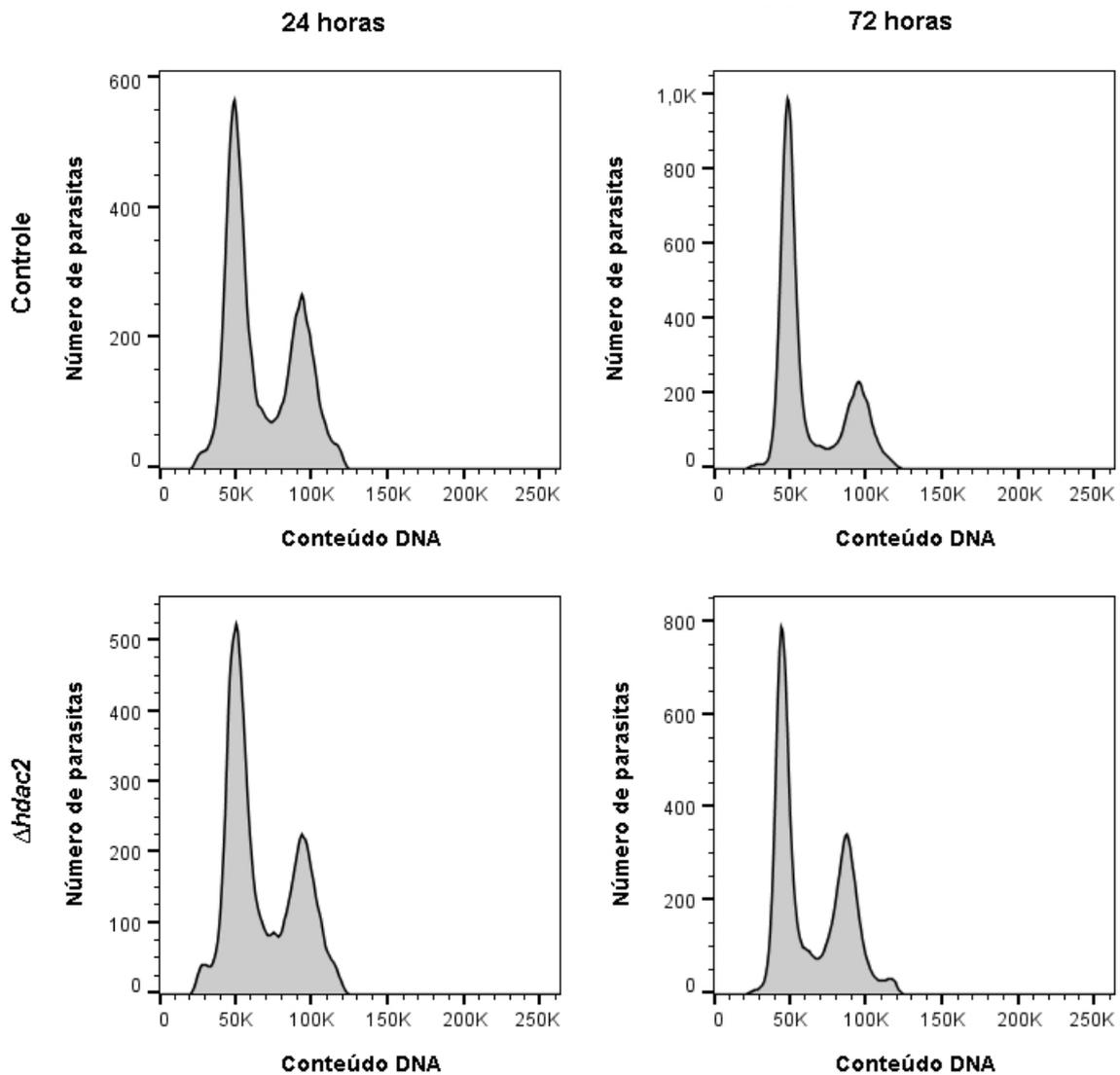


FIGURA 4.8 - ANÁLISE DE CICLO CELULAR DOS PARASITAS $\Delta TGHDAC2$.

Para avaliar as fases do ciclo celular, parasitas em diferentes tempos pós-infecção (24 e 72 horas) foram marcados com iodeto de propídeo para visualização do DNA e analisados por citometria de fluxo. Os gráficos acima mostram a análise do ciclo celular dos parasitas $\Delta tghdac2$ e controle (RH $\Delta hxgprt\Delta ku80$).

FONTE: a autora. (2018)

Também foi obtida a porcentagem de parasitas presentes nas três fases do ciclo do parasita, nos diferentes tempos experimentais (TABELA 4.1)

TABELA 4.1 - PORCENTAGEM DE PARASITAS NAS FASES DO CICLO CELULAR

	%G1	%S	%M
Controle - 24h	41,1	32,4	21,2
Controle - 72h	58,6	17,6	20,5
<i>Δtghdac2</i> - 24h	42	31,8	21,8
<i>Δtghdac2</i> - 72h	42,9	24,3	26,7

FONTE: a autora (2018)

Apesar de não haver grandes diferenças, as porcentagens referentes a 72 horas pós infecção chamaram a atenção, pois apresentou um pequeno acúmulo de parasitas *Δtghdac2* na fase S e na fase M, em comparação com o controle. Como a TgHDAC2 tem uma expressão aumentada durante a fase S do ciclo celular, que por sua vez ocorre ainda durante a mitose, consideramos relevante analisar melhor a fase síntese de DNA nesses parasitas.

A diferenciação de parasitas em fase S dos parasitas em fase G1 não é trivial, uma vez que é necessário visualizar a síntese de DNA. Sendo assim, iniciamos uma colaboração com o grupo da Dr^a Maria Carolina Elias, do Instituto Butantan, com experiência na área de replicação do DNA em protozoários. O grupo nos auxiliou em ensaios de incorporação de EdU, ou 5-ethynyl-2'-deoxyuridine, um análogo de timidina que é incorporado na molécula de DNA durante a síntese deste ácido nucléico.

Uma vez incorporado o EdU, é possível detecta-lo pela azida fluorescente em ensaios de microscopia, que revelou uma maior incorporação pelos parasitas *Δtghdac2* (GRÁFICO 4.4), ou seja, mais parasitas apresentaram marcação. Esses dados revelam um acúmulo nessa fase do ciclo, como indicado pelos ensaios de citometria de fluxo, o que sugere uma participação de TgHDAC2 direta ou indiretamente nos eventos de síntese de DNA. Por outro lado, apesar de a incorporação ser maior nos parasitas nocaute, aparentemente, os mesmos apresentam intensidade de fluorescência discretamente menor, o que poderia ser reflexo da síntese de DNA mais lenta ou ainda menor quantidade de forquilhas de replicação (FIGURA 4.9). Embora promissores, esses ensaios deverão ser repetidos e quantificados, afim de confirmar os dados.

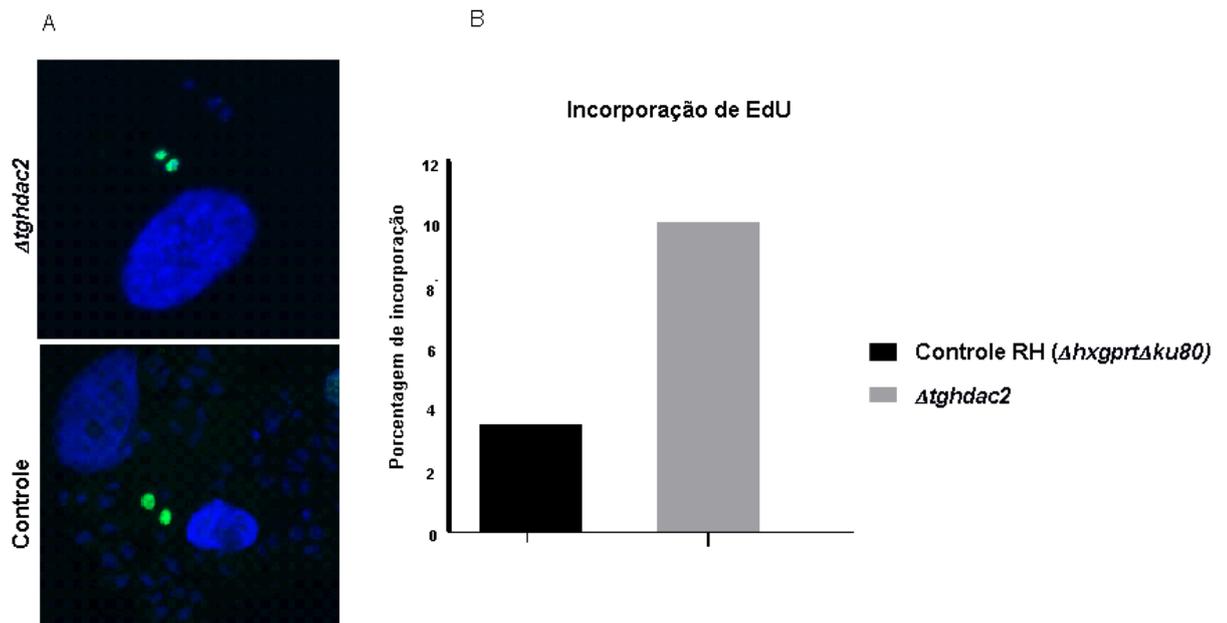


FIGURA 4.9 - INCORPORAÇÃO DE EDU.

Parasitas controle e nocaute invadiram células HFF previamente crescidas em lâminulas até confluência e replicaram por 24 horas, quando foi adicionado EdU ao meio por 2 horas. Após este tempo, as células foram fixadas e realizada uma reação para marcação do análogo de timidina. As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência. As imagens acima (A) são representativas do que foi visualizado e contado, sendo que foram considerados os parasitas EdU positivos e negativos (somente DAPI) para calcular a porcentagem de incorporação (B).

FONTE: a autora (2018)

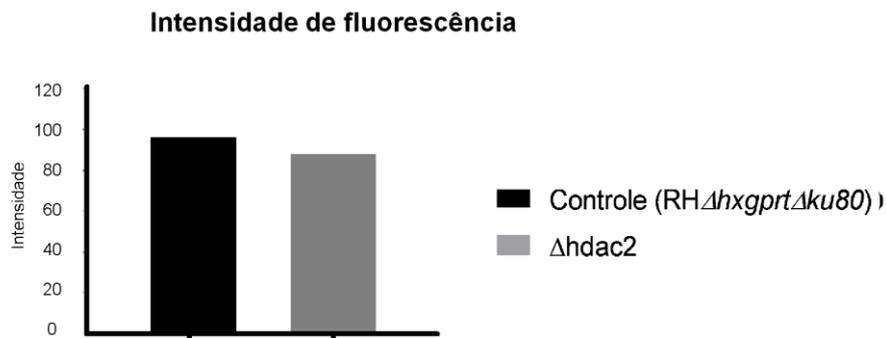


GRÁFICO 4.4 - INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA DE EDU

A intensidade de fluorescência foi quantificada, a qual parece ser levemente maior nos parasitas controle. Análise de apenas uma replicata biológica.

FONTE: a autora (2018)

4.2.5 Análise morfológica dos parasitas $\Delta tghdac2$ no interior dos vacúolos parasitóforos

Normalmente defeitos no ciclo celular, são associadas a uma desorganização dos parasitas no vacúolo parasitóforo. As etapas de divisão, resultam em um

resquíio da célula-mãe, conhecido como corpo residual, que mantém os parasitas unidos. Ensaios de microscopia de fluorescência realizados previamente já indicavam essa desordem para os parasitas *Δtghdac2*. Para confirmar esse dado, foi feita uma avaliação da morfologia por microscopia eletrônica de varredura, utilizando uma fita adesiva, de modo a remover parte da célula e expor os vacúolos intracelulares. Dessa forma, foi observado que os parasitas nocaute para *tghdac2* se encontravam de forma mais desorganizada no vacúolo, desunidos, enquanto que os parasitas controle possuem formação ordenada e presos pelo corpo residual, algo pouco encontrado nos nocautes, principalmente quando se observava mais de quatro parasitas no mesmo vacúolo (FIGURA 4.10).

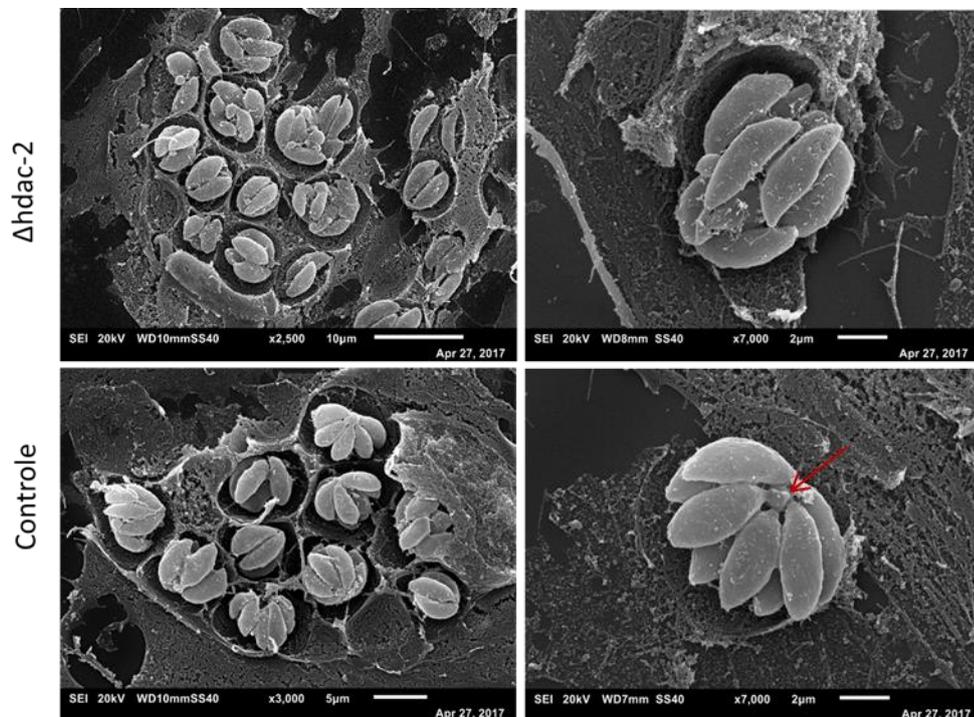


FIGURA 4.10 – ORGANIZAÇÃO DOS PARASITAS NO VACÚOLO OBSERVADOS POR MEV.

Células HFF foram infectadas com formas taquizoítas e processadas para microscopia eletrônica de varredura. Para visualização do interior do vacúolo, foi utilizada fita adesiva, de modo a retirar parte da célula hospedeira. Formas taquizoítas crescem de maneira organizada e presas por um corpo residual (seta) o que parece não ocorrer nos parasitas *Δtghdac2*.

FONTE: a autora (2018)

4.2.6 Análise das acetilações das histonas H3 e H4

As HDACs de classe I, como é o caso da TgHDAC2, são principalmente nucleares, de modo que devem estar atuando principalmente nas histonas. Para avaliar essa possibilidade, escolhemos iniciar pelas histonas H3 e H4, uma vez que há anticorpos disponíveis contra essas histonas de humanos acetiladas, e elas são

as mais similares com as histonas de *Toxoplasma*. O anticorpo para H3 acetilada reconhece os aminoácidos de 1 a 20, englobando as acetilações em K9 e K14, enquanto que o anticorpo para H4 acetilada reconhece apenas a lisina 16 acetilada.

Logo, extratos proteicos de *T. gondii* (controle e nocaute para *tghdac2*), foram submetidos a ensaios de Western blot para verificar se há diferença no padrão de acetilação. Como normalizador da quantidade de proteína utilizamos anti- β -tubulina, uma vez que é uma proteína de expressão constitutiva (FIGURA 4.11).

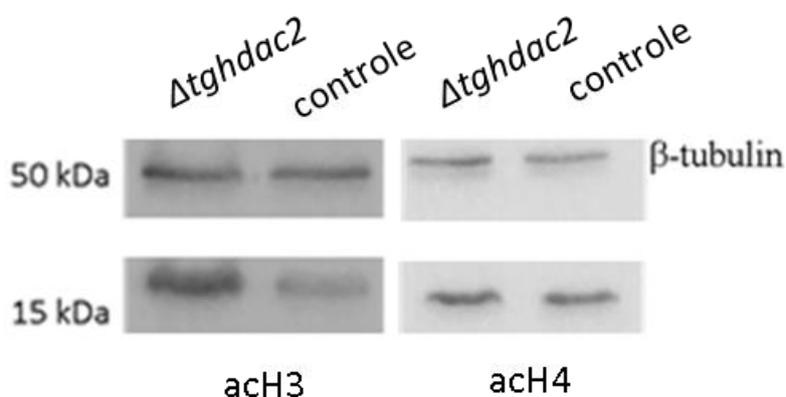


FIGURA 4.11- ANÁLISE DE WESTERN BLOT PARA HISTONAS H3 E H4 ACETILADAS.

Extrato proteico de 5×10^6 formas taquizoítas de *T. gondii* $\Delta tghdac2$ e controle (RH $\Delta h x g p r t \Delta k u 80$) foram analisados em Western blot, no qual foram utilizados anticorpos anti-H3 ou anti-H4 acetiladas e anti- β -tubulina, como controle do número de células. As membranas foram reveladas por quimiluminescência e a intensidade das bandas foi quantificada com auxílio do software ImageJ.

FONTE: a autora (2018)

As bandas referentes a acetilação de H3 e H4, bem como as de β -tubulina, utilizada como controle, foram quantificadas pelo software ImageJ. Para obter o resultado final, a intensidade das bandas de H3 e H4 foram divididas pela intensidade da banda de β -tubulina. Os gráficos 4.6 e 4.7 representam as análises estatísticas para os experimentos, que revelaram que embora em alguns casos foi observado diferenças, especialmente quanto a histona H3ac, quando 3 experimentos independentes foram analisados, não houve diferença significativa entre *$\Delta tghdac2$* e o controle.

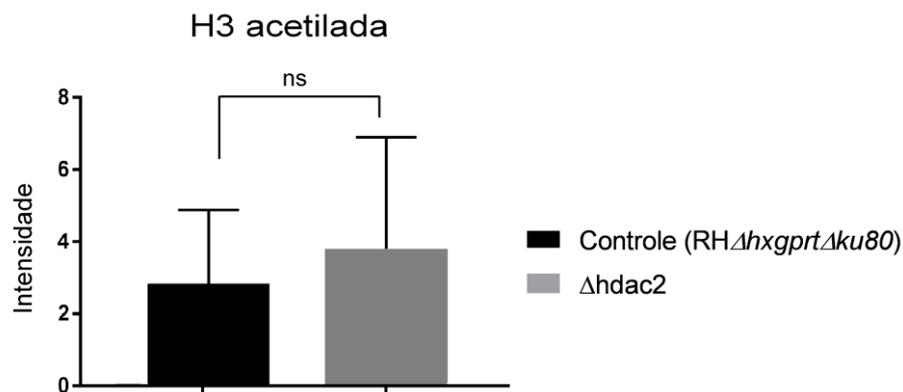


GRÁFICO 4.5 – HISTONA H3 ACETILADA.

A intensidade das bandas observadas em Western Blot para nocaute e controle foi quantificada e o gráfico acima representa o resultado de três experimentos independentes, sem diferença significativa. O teste T foi feito usando GraphPad Prism versão 7.

FONTE: a autora (2018)

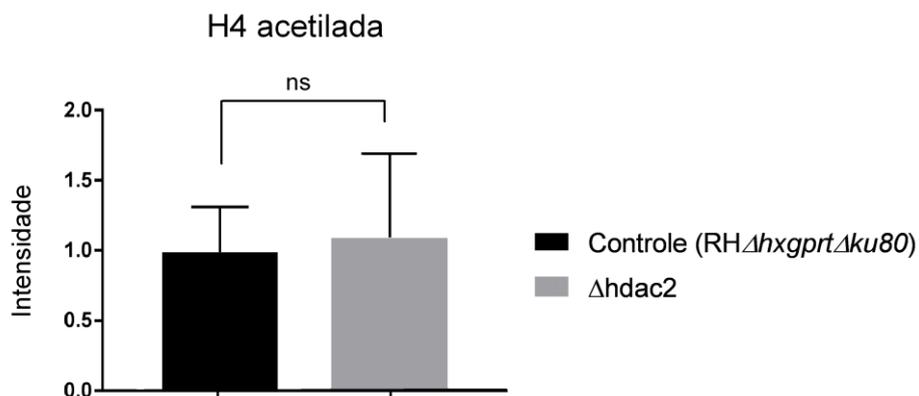


GRÁFICO 4.6 - HISTONA H4 ACETILADA.

A intensidade das bandas observadas em Western Blot foi quantificada e o gráfico acima representa o resultado de três experimentos independentes, que revelou que nocaute e controle não foram significativamente diferentes. O teste T foi feito usando GraphPad Prism versão 7.

FONTE: a autora (2018)

4.3 ETIQUETAMENTO DO GENE ENDÓGENO

Outra estratégia escolhida para caracterização de TgHDAC2 foi o etiquetamento do gene, o que permitiria a determinar a localização da proteína e identificação dos parceiros dessa proteína. Por conseguinte, recorreremos ao método de clonagem independente de ligação, com o vetor pLIC.HA.HXGPRT (HUYNH; CARRUTHERS, 2009).

4.3.1 Amplificação e confirmação de clones positivos

Primeiramente, deve ser amplificado uma região de aproximadamente 1000 pb (nesse caso 1002 pb) correspondentes ao final do gene, sem o códon de

terminação. O sucesso da amplificação desse inserto foi confirmado em gel de agarose, que pode ser observado na figura 4.12.

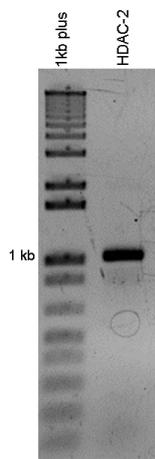


FIGURA 4.12 - AMPLIFICAÇÃO DE PARTE DO GENE *tghdac2*

Gel de agarose 1% onde verificou-se a amplificação no tamanho esperado de 1002 pb. Para a clonagem no vetor pLIC.HA.HXGPRT foi feita a amplificação de parte do gene *tghdac2*. Aos *primers* foram adicionadas as sequências LIC complementares ao vetor.

Fonte: a autora (2018)

Este fragmento foi então tratado com a enzima T4 DNA polimerase, que através de sua atividade exonuclease/polimerase, gerou extremidades complementares entre vetor e inserto. A clonagem ocorreu por complementaridade de sequência e os clones positivos foram confirmados por PCR de colônia e digestão enzimática.

Para digestão, foram escolhidos quatro clones positivos em PCR de colônia e foram utilizadas as enzimas *XhoI* (New England Biolabs), que possui três sítios de restrição (2 no inserto e 1 no vetor) e *NheI* (New England Biolabs) que possui um sítio de restrição apenas no inserto. Dessa forma, esperava-se encontrar três bandas, de 4945 pb, 673 pb, 446 pb e 426 pb (as bandas de 446 pb e 426 pb aparecem como uma única banda, uma vez que o gel não tem resolução para distinguir tamanhos tão próximos), que como pode ser visualizado na figura 4.13, foi o padrão observado para três dos clones analisados.

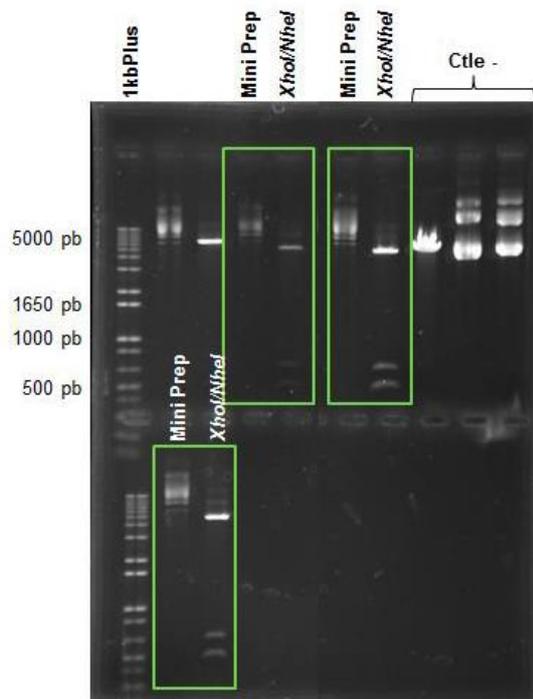


FIGURA 4.13 - CONFIRMAÇÃO DA CLONAGEM PARA ETIQUETAMENTO DE *TGHDAC2*.

Gel de agarose 1%, após a digestão enzimática, para verificação da clonagem de parte do gene *tghdac2* no vetor pLIC.HA.HXGPRT. Quatro clones foram selecionados para digestão, além do controle negativo sem inserto. 3 dos 4 clones (destacados em verde) testados mostraram fragmentos do tamanho esperado para a digestão com as enzimas *XhoI* e *NheI* (4945 pb, 673 pb, 446 pb e 426 pb).

FONTE: a autora (2018)

Os três clones positivos foram encaminhados para sequenciamento, onde verificou-se a correta sequência do inserto. Com isso, foi feita a transfecção do plasmídeo em formas taquizoítas de *T. gondii*, cepa RH Δ *hxgprt* Δ *ku80*.

4.3.2 Confirmação de transfectantes expressando a etiqueta de HA.

Após a seleção dos transfectantes com ácido micofenólico e xantina, a população foi analisada em ensaios de Western blot e imunofluorescência utilizando anticorpos contra a etiqueta de HA. Porém não obtivemos nenhum resultado positivo, mesmo após diversas tentativas.

Para analisar esses transfectantes negativos, foram feitas PCRs para saber se esses parasitas transfectantes tinham a etiqueta de HA (utilizando *primers* que anelam apenas na etiqueta de HA) e se a mesma se encontrava na local correto, no final do gene *tghdac2* (utilizando *primers* que anelam no interior do gene *tghdac2* e na etiqueta de HA). Como pode ser visto na figura 4.14, os parasitas transfectantes

contém a etiqueta de HA, porém ela não está integrada no local correto, uma vez que a PCR para integração não obteve amplificação



FIGURA 4.14 - PCR PARA INTEGRAÇÃO DA ETIQUETA DE HA.

Para saber se os parasitas transfectantes possuíam a etiqueta de HA e se ela estava integrada no local correto, foram feitas duas PCRs. A primeira detectava a etiqueta, resultando em um produto de amplificação de aproximadamente 650 pb, o que pôde ser verificado na primeira canaleta (HA detec.). A segunda PCR continha *primers* que anelavam na região interna ao gene e dentro da etiqueta, para saber se está no local correto, o que não foi obtido, indicando que a etiqueta foi integrada em outro local desconhecido no genoma.

FONTE: a autora (2018).

Como os parasitas transfectantes contém a etiqueta de HA e provavelmente o gene *hxgprt*, a seleção ocorreu, entretanto por não estar integrado no local correto não foi possível realizar a localização celular de TgHDAC2. Acreditamos que aumentar a porção de recombinação para 2000 pb ajudaria na correta integração do inserto, porém obtivemos os mesmos resultados. Dessa forma partimos, alternativamente, superexpressão da proteína, que pode fornecer bons indicadores sobre sua localização e função.

4.4 ANÁLISE DA SUPEREXPRESSÃO DE TGHDAC2

A superexpressão de TgHDAC2 foi a alternativa escolhida para dar continuidade a caracterização da proteína. Primeiramente o gene foi amplificado a partir do cDNA, resultando em produto de 1875 pb, que como pode ser visto na figura 4.15, foi obtida com sucesso.

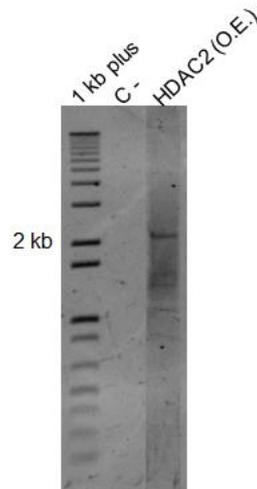


FIGURA 4.15 - AMPLIFICAÇÃO DE *TGHDAC2* PARA SUPEREXPRESSÃO.

Para a clonagem no vetor de superexpressão foi necessário a amplificação da região codificante de *tghdac2*, através do cDNA. Neste gel de agarose 1% verifica-se a amplificação no tamanho esperado de aproximadamente 2 kb. C – representa o controle negativo da reação de PCR.

FONTE: a autora (2018)

A confirmação da correta clonagem foi feita por PCR de colônia e posterior digestão enzimática com a enzima *XhoI*, que deveria liberar um fragmento de aproximadamente 1411 kb. Como pode ser visto na figura 4.16, após a digestão enzimática houve liberação do fragmento do tamanho esperado, confirmando a clonagem.

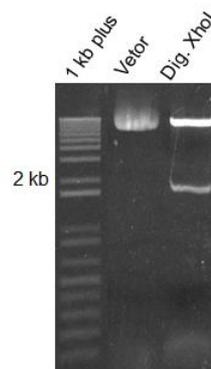


FIGURA 4.16 - CONFIRMAÇÃO DA CLONAGEM PARA SUPEREXPRESSÃO.

Para confirmação da clonagem do gene *tghdac2* no vetor de superexpressão foi feita uma digestão confirmatória, utilizando a enzima *XhoI*. O gel de agarose 1% mostra os fragmentos de tamanho esperado, confirmando a clonagem.

FONTE: a autora (2018)

Após a confirmação, o plasmídeo foi linearizado com a enzima *Kpn1* e transfectado em formas taquizoítas de *T. gondii* cepa RH Δ hxgp r t, onde espera-se que se integre aleatoriamente no genoma do parasita.

Como este vetor insere um domínio de desestabilização (DD), a superexpressão da proteína fica condicionada a adição de Shield-1 ao meio de cultura, um análogo a rapamicina, tornando a proteína estável. O DD fusionado a proteína a torna instável e faz com que seja encaminhada para degradação, Shield-1 se liga ao DD e impede que a proteína seja degradada. A indução foi feita por 24 horas e em seguida foi realizado ensaio de imunofluorescência para detecção da etiqueta de GFP.

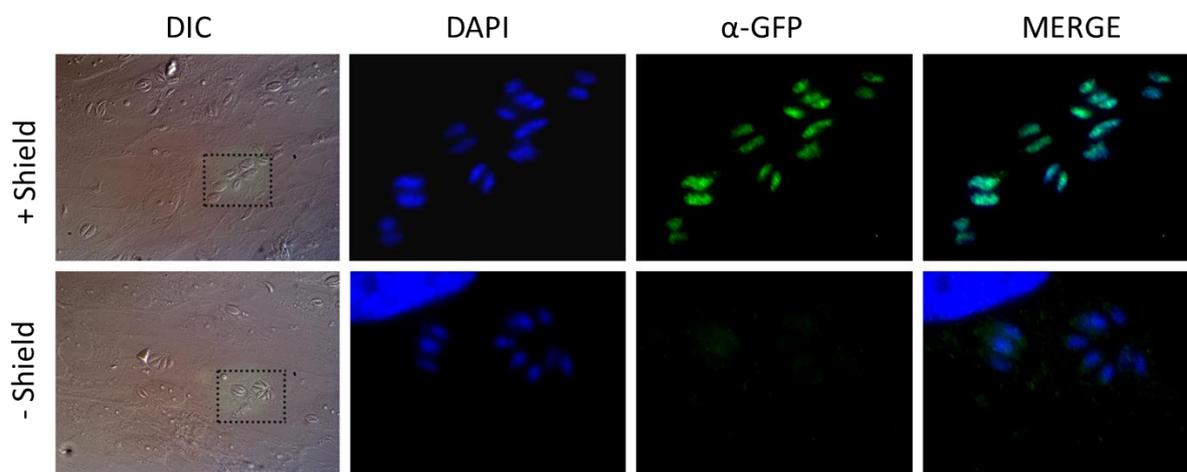


FIGURA 4.17 – SUPEREXPRESSÃO DE TgHDAC2.

Parasitas transfectados com vetor de superexpressão de TgHDAC2 foram submetidos a ensaios de imunofluorescência indireta para marcação da etiqueta de GFP. A adição de Shield-1 ao meio estabiliza a proteína e faz com que ela apresente a etiqueta de GFP, sem Shield-1 a proteína fica instável e é degradada. A marcação da proteína colocaliza com o núcleo do parasita. O DNA da célula hospedeira e dos parasitas foi corado com DAPI.

FONTE: a autora (2018).

Com a adição de Shield-1 foi verificada uma marcação nuclear em uma parcela da população (FIGURA 4.17), ao contrário do controle sem Shield-1 que não obteve nenhuma marcação. Porém, nenhuma marcação foi vista em Western blot, e por esse motivo ainda não foi possível seguir com a caracterização destes parasitas. Isso provavelmente ocorreu, pois apenas uma pequena parcela da população mostrou-se positiva, o que poderia justificar a não detecção no Western blot. Ainda, esses parasitas positivos foram perdidos durante o crescimento da população e não foi possível clonar essa população, sendo necessária nova transfecção.

4.5 AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM NA PLATAFORMA GATEWAY

Outra abordagem, é a análise da estrutura da proteína, visto que parte dela, mais especificamente as regiões das inserções aminoacídicas no interior do domínio, possuem estrutura desconhecida. Para essa finalidade, foi necessário a produção de TgHDAC2 recombinante, que foi feita através de clonagem no sistema *Gateway*. Vale destacar que uma vez obtida, a proteína recombinante também poderá ser utilizada para produção de anticorpos policlonais.

Primeiramente a região codificante do gene *tghdac2* foi amplificada por PCR a partir do cDNA de *T. gondii*, que foi obtida com sucesso, com o tamanho esperado de 1980 pb (FIGURA 4.18),.

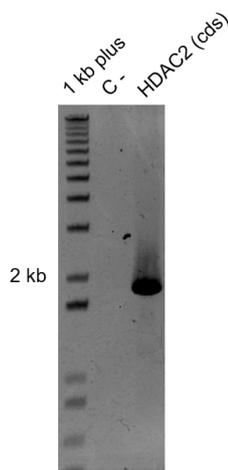


FIGURA 4.18 - AMPLIFICAÇÃO DE TGHDAC2 PARA CLONAGEM EM SISTEMA GATEWAY.

Gel de agarose 1%, no qual é possível verificar a amplificação da região codificante do gene *tghdac2* com tamanho esperado de 1980 pb (1875 pb do gene com adição de 105 pb das regiões de recombinação gateway). C- representa o controle negativo da reação de PCR, sem o cDNA.

FONTE: a autora (2018)

Após a amplificação, ocorreu a clonagem no sistema *Gateway*, que possui alta eficiência de clonagem e por ser baseado em recombinação, dificilmente leva a erros de clonagem, como orientação errada do inserto, por exemplo. De qualquer forma, a clonagem foi confirmada por PCR de colônia e digestão enzimática, utilizando as enzimas *EcoRV* (New England Biolabs) e *SaII* (New England Biolabs). Na figura 4.19 é possível observar o produto da digestão enzimática, com os fragmentos esperados entre 3519 pb, além de um fragmento de 900pb.

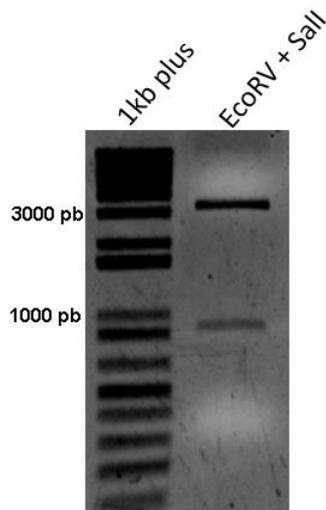


FIGURA 4.19 - CONFIRMAÇÃO DA CLONAGEM E VETOR pDONR 221

Para a confirmação da correta clonagem no vetor de entrada pDonr 221 foi feita uma dupla digestão confirmatória. A digestão com as enzimas *EcoRV* e *Sall*, resultou no padrão de bandas esperado de 3519 e 900 pb, confirmando a clonagem.

FONTE: a autora (2018)

Este vetor foi então recombinado no vetor de destino pDest17, que insere uma etiqueta de 6x histidina na porção N-terminal da proteína codificada, para auxiliar na purificação da proteína. A confirmação desta clonagem foi feita por PCR de colônia, onde apenas 3 dos 10 clones testados foram positivos (FIGURA 4.20).

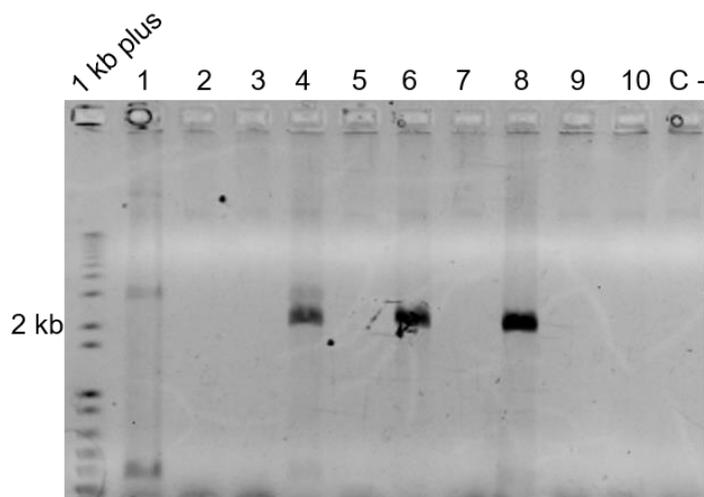


FIGURA 4.20 - PCR DE COLÔNIA PARA CONFIRMAÇÃO DA RECOMBINAÇÃO NO VETOR PDEST17

A confirmação da clonagem no vetor pDest17 foi feita por PCR de colônia, onde neste gel de agarose 1%, observa-se apenas três clones (4, 6 e 8) foram confirmados pela amplificação no tamanho esperado de aproximadamente 2 kb. C- representa o controle negativo da reação de PCR.

FONTE: a autora (2018)

O plasmídeo dos clones positivos foi extraído com o *kit* QIAprep® Miniprep (QIAGEN) e transformado em *E. coli*, cepa Rosetta-gami 2 pLysS para expressão da proteína.

4.6 EXPRESSÃO DE TGHDAC2 EM SISTEMA BACTERIANO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Após confirmação da clonagem, foram feitos alguns testes para avaliar qual a melhor cepa bacteriana para expressão da proteína e condições de tempo e temperatura, onde foi observado que a melhor condição foi obtida com a bactéria *E. coli*, cepa Rosetta-gami 2 pLysS a 37°C por 4 horas. Além desta, também foram realizados testes de expressão na bactéria *E. coli* (DE3) pLysS a 20°C por 16h e 30°C por 4h, onde não houve indução da expressão da proteína de interesse. Já a bactéria Arctic tem sua temperatura ótima a 12°C e a expressão da proteína foi testada nesta temperatura por 16h, porém também não houve nível significativo de expressão.

Após a expressão da proteína, as amostras do teste de indução foram submetidas a corrida eletroforética em gel SDS-PAGE 10% e o gel foi corado com Coomassie blue R-250 para visualização das bandas. A banda correspondente a expressão da proteína TgHDAC2, foi visualizada no peso molecular esperado de aproximadamente 72 kDa apenas no extrato total, indicando que a proteína está sendo expressa na fração insolúvel (FIGURA 4.21).

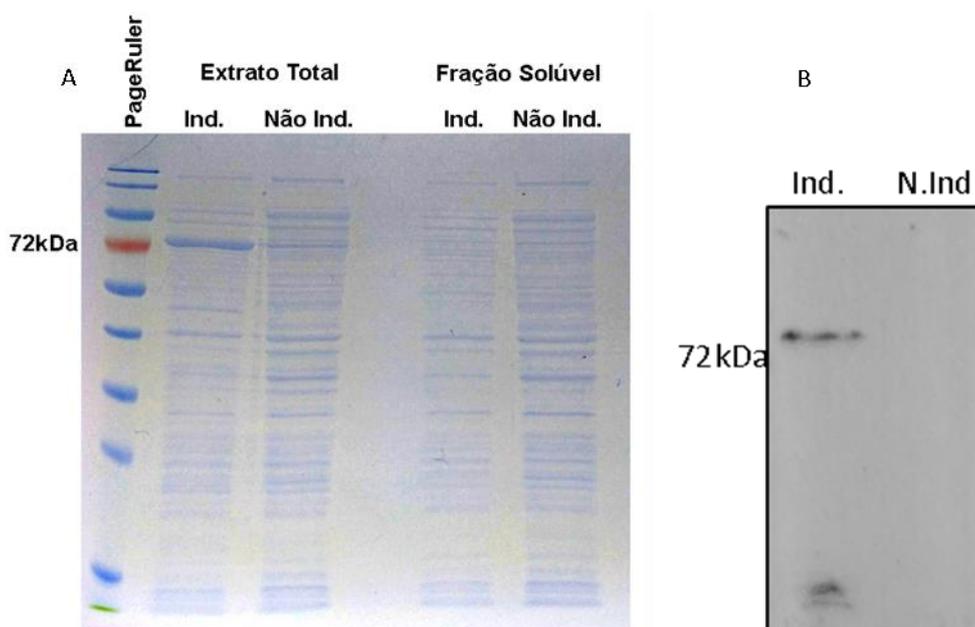


FIGURA 4.21 - TESTE DE EXPRESSÃO DE TgHDAC2 RECOMBINANTE.

A expressão foi feita em *E. coli* Rosetta-gami 2 (DE3)pLysS, que possui plasmídeo para expressão de tRNAs para códons considerados raros. A indução da expressão foi feita com 1mM de IPTG a 37°C por 4 horas. (A) Após tempo de indução as bactérias foram centrifugadas e a fração solúvel foi separada por sonicação. A amostra foi avaliada em gel SDS-PAGE 10%. (B) análise por western blot com anticorpo anti-histidina revela que a proteína possui a etiqueta e sua expressão foi induzida com sucesso.

FONTE: a autora (2018)

Como o nível de expressão foi satisfatório, foi feito um inóculo de 500 mL para purificação da proteína. Apesar de a proteína ter apresentado razoável nível de expressão, ela se encontra na fração insolúvel e, portanto, foi adotado um protocolo para purificação de proteínas contidas na fração insolúvel do extrato celular, conforme explicado no item 3.13. Após a última etapa de purificação, por troca iônica, foi observado que a proteína se encontrava satisfatoriamente purificada, como pode ser observado na figura 4.22.

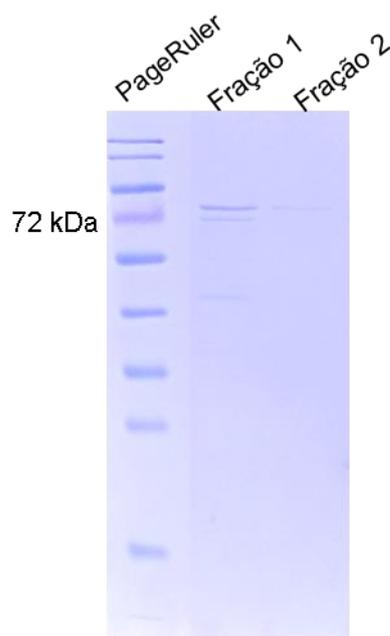


FIGURA 4.22 - TGHDAC2 APÓS PURIFICAÇÃO POR TROCA IÔNICA.

Após a última etapa de purificação a amostra foi avaliada em gel SDS-PAGE 10% A proteína foi satisfatoriamente purificada, nas frações 1 e 2 após purificação em coluna de troca iônica.

FONTE: a autora (2018)

Com a segunda etapa de purificação a uréia foi removida e seu re-enovelamento avaliada por dicroísmo circular e espalhamento dinâmico de luz.

4.7 ANÁLISE DA ESTRUTURA DE TgHDAC2 RECOMBINANTE

A TgHDAC2 possui duas inserções aminoacídicas dentro do domínio HDAC característico, algo único em alguns parasitas do filo Apicomplexa, e que não tem função ou estrutura conhecidas. Dados *in silico* indicavam que esta porção tornava a proteína instável. Para ter dados mais refinados e seguros a respeito desta região, foram feitas análises de dicroísmo circular e espalhamento dinâmico de luz.

O dicroísmo circular é um excelente método para rápida avaliação da estrutura secundária de proteínas. Basicamente, é definido como uma absorção desigual da luz circularmente polarizada (GREENFIELD, 2006). Já o espalhamento dinâmico de luz detecta agregados e determina a massa molecular de biomoléculas, de forma rápida e precisa.

O espalhamento dinâmico de luz revelou que a proteína é monomérica, ou seja, não forma agregados, e possui uma massa molecular de aproximadamente 69 kDa, tamanho esperado para o monômero de TgHDAC2.

Espectros de dicroísmo circular foram medidos em comprimentos de onda de 190 a 260 nm. As α -hélices são caracterizadas pela leitura negativa a 208 e 222 nm e positivas próximo a 200 nm. Já as folhas- β tem leitura negativa a 215 nm e positivas em 200nm.

Conforme pode ser observado no gráfico 4.8 a TgHDAC2 recombinante possui estrutura secundária composta tanto por α -hélices quanto por folhas- β .

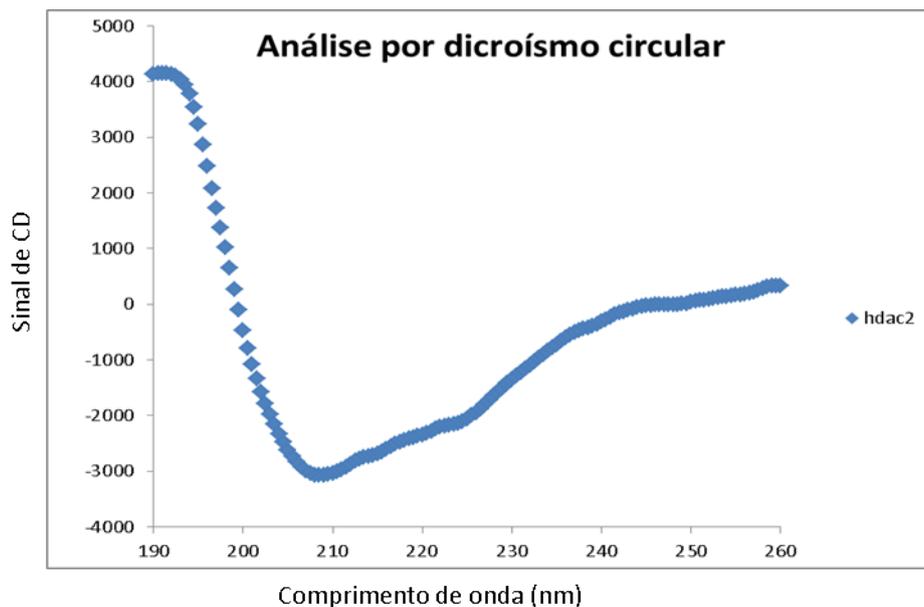


GRÁFICO 4.7 - ANÁLISE DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DE TgHDAC2 POR DICROÍSMO CIRCULAR.

A análise por dicroísmo circular indica que a proteína possui enovelamento e contém conteúdo secundário composto tanto por α -hélices quanto por folhas- β .

FONTE: a autora (2018)

Também foi realizado desenovelamento térmico, a fim de saber se a proteína é estável em altas temperaturas. Para isso a temperatura foi elevada gradualmente de 20 °C até 90°C. O gráfico 4.9 mostra a sobreposição dos espectros de dicroísmo circular de TgHDAC2 antes e após a desnaturação térmica. Pode se verificar que os espectros são bastante similares o que indica a alta estabilidade térmica dessa proteína.

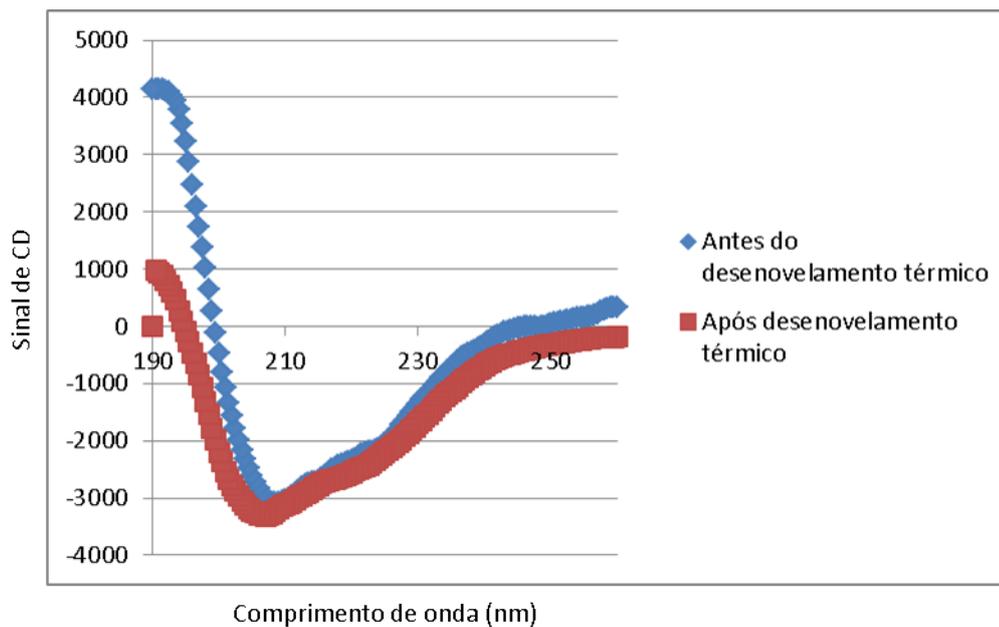


GRÁFICO 4.8 - ESTRUTURA SECUNDÁRIA APÓS DESENOVELAMENTO TÉRMICO.

TgHDAC2 é estável em altas temperaturas, pois não teve grande perda estrutural durante o desdobramento térmico, como pode ser observado pela manutenção da curva (em vermelho).

FONTE: a autora (2018).

5 DISCUSSÃO

O processo reversível de acetilação de histonas tem sido intensamente estudado nas últimas décadas, principalmente por seu papel na ativação da transcrição, visto que a acetilação de histonas reduz a interação dos nucleossomos com o DNA, deixando-o mais acessível as maquinarias transcrpcionais. A acetilação é catalisada por histonas acetiltransferases (HATs), enquanto que a remoção da acetilação é de responsabilidade das desacetilases de histonas (HDACs). As HDACs são, portanto, enzimas remodeladoras de cromatina, com papel crucial no silenciamento gênico em diversos organismos. Além de seu papel na regulação da expressão gênica, as HDACs têm sido cada vez mais relacionadas a outros processos celulares, especialmente aqueles dependentes de DNA, como a replicação e o reparo. Em mamíferos, as HDACs classe I (HDAC1 e HDAC2) estão diretamente relacionadas a progressão da replicação, estando presentes e atuando na forquilha de replicação. A deficiência de apenas HDAC1 já é suficiente para afetar a taxa de progressão das forquilhas de replicação (KEHRLI, et al, 2016).

Durante a replicação, as HDACs atuam retirando acetilações específicas e auxiliando na deposição de histonas recém-sintetizadas. Logo após a síntese no citoplasma, as histonas H4 são acetiladas nas lisinas 5 e 12, sendo que essas modificações são necessárias para que sejam depositadas na fita nova de DNA. Tão logo sejam depositadas, essas acetilações são removidas pelas HDACs de classe I, para a maturação da cromatina, ainda durante a replicação (BELL, et al, 2010). Do mesmo modo, a acetilação específica de H4K16, que é enriquecida em zonas de início de replicação, deve ser retirada pelas HDACs classe I para permitir a restauração da cromatina após a replicação, pois essa acetilação impede a compactação do DNA. A ausência das HDACs 1 e 2 leva a hiperacetilação de H4K16 na cromatina nascente, causando diminuição da velocidade da forquilha de replicação e ativação da resposta ao estresse de replicação (BHASKARA et al, 2013).

Além disso, elas regulam a atividade de outros remodeladores de cromatina, o que sugere um papel fundamental e direto das HDACs durante a replicação do DNA, sem necessariamente atuar no controle da expressão gênica de fatores importantes para a progressão do ciclo. Entretanto este papel de regulação da expressão gênica de ciclinas, CDKs e outras proteínas envolvidas com a progressão

no ciclo celular, principalmente na fase S já foi relatado (LAGGER, et al, 2002; INGRAM; HORN, 2002; MONTGOMERY et al, 2007; YAMAGUCHI et al, 2010).

Acredita-se que a replicação dos genes está diretamente relacionada a expressão dos mesmos, ou seja, genes ativamente transcritos normalmente são replicados inicialmente, enquanto que regiões teloméricas são replicadas tardiamente. Foi verificado que a ausência de Rpd3 (HDAC de classe I) em *S. cerevisiae*, causa ativação prematura nas origens de replicação tardias, (APARICIO et al, 2004), confirmando um efeito direto sobre o disparo das origens de replicação. Vogelauer et al (2002) também observou disparo prematuro das origens de replicação iniciais, associadas a uma entrada antecipada na fase S e brotamento, embora também observasse maior efeito nas origens tardias. Os autores acreditam que esse efeito é causado pela desacetilação de histonas (incluindo H4K5ac e H4K12ac), mas não descartam a acetilação de outras proteínas, como a Cdc45, que também está associada a origens de replicação em eucariotos.

Visto que desacetilases de classe I possuem amplo papel na progressão da replicação do DNA, e que a expressão de TgHDAC2 está aumentada justamente na fase S, fomos analisar se em *Toxoplasma* a função da enzima também está associada a esse evento. O primeiro indício foi obtido em ensaio de formação de placa e de replicação (FIGURA 4.1 e GRÁFICO 4.3), onde parasitas $\Delta tghdac2$, mostraram atraso na divisão celular quando comparado ao controle. Para avaliar se havia defeito em alguma etapa do ciclo celular, partimos para análise por citometria de fluxo, que indicou discreto aumento na quantidade de parasitas $\Delta tghdac2$ na fase S do ciclo, em comparação com o controle (FIGURA 4.8)

O ciclo celular de *T. gondii* é atípico, devido à ausência de uma fase G2 e início da mitose ainda durante a fase S. A mitose é facilmente detectada por microscopia, devido a migração do DNA para o interior das células-filhas em formação, o que dá ao núcleo um aspecto em formato de U. Por outro lado, não é possível distinguir parasitas em fase G1 ou S. Sendo assim, para esclarecer melhor se o atraso na divisão celular é, de fato, por defeitos na replicação do DNA durante a fase S, foram feitos ensaios de incorporação de EdU, um análogo de timidina, que é incorporado ao DNA durante a síntese. Embora preliminares, os resultados indicaram que parasitas $\Delta tghdac2$ possuem maior taxa de incorporação do análogo e leve diminuição da intensidade de fluorescência (FIGURA 4.9 e GRÁFICO 4.4) , o

que pode indicar que nestes parasitas há menos origens de replicação ativas ou que a velocidade da forquilha de replicação é mais lenta. Vale destacar ainda outro indício de defeito no ciclo celular, que é a desorganização dos parasitas no vacúolo parasitóforo (FIGURA 4.10), cujo fenótipo também foi encontrado no nocaute de outras proteínas que apresentavam defeitos no ciclo celular, como a F-actina (PERIZ et al, 2017) e a PRMT1 (BISSATI et al, 2016).

Assim como a HDAC1 de mamíferos e Rpd3 de levedura, é possível que a TgHDAC2 de *T. gondii* possa atuar de diversas maneiras na regulação do ciclo celular, uma vez que sua expressão é aumentada na fase S e que sua ausência leva a atrasos na proliferação celular, acúmulo em S e desordem no vacúolo parasitóforo. Diante dos resultados obtidos nesta dissertação, acredita-se que apesar de ser única de membros do filo Apicomplexa, a TgHDAC2 seja conservada em termos de função com as HDACs classe I de mamíferos e levedura.

Behnke et al. (2010) em estudo de transcriptoma durante o ciclo celular, revelou que durante a fase S, além da síntese do DNA também ocorre a síntese de proteínas importantes para maturação das células-filhas e invasão da célula hospedeira. Apesar de *T. gondii* $\Delta tghdac2$ ainda ser capaz de invadir e se replicar, isto ocorre de forma mais lenta do que observado em parasitas selvagens, permanecendo mais tempo no meio extracelular. Informações presentes no banco de dados de *T. gondii* indicam que TgHDAC2 é mais expressa quando o parasita se encontra no meio extracelular, sendo que em parasitas que recém invadiram sua expressão é diminuída (GAJI, et al, 2011).

Cerca de 2 horas após a invasão, o parasita já se prepara para proliferação celular e é quando a expressão de TgHDAC2 volta a subir, de modo que consiga atuar nos processos de replicação. Apesar de não ser capaz de se replicar fora da célula hospedeira, este momento é importante para a transcrição e tradução de proteínas importantes para a invasão. Gaji et al (2011) mostrou que os genes de invasão são expressos cinco vezes mais no parasita extracelular do que quando o parasita está dentro da célula hospedeira. Como foi verificada menor taxa de invasão nos parasitas $\Delta tghdac2$ (GRÁFICO 4.2), pode-se sugerir que TgHDAC2 esteja envolvida na regulação da expressão dessas proteínas, seja desacetilando as histonas e silenciando os respectivos genes, ou fatores associados diretamente nesse processo.

Vale especular que TgHDAC2 também poderia estar envolvida na expressão das proteínas de invasão *in vivo* e que, os parasitas $\Delta tghdac2$, ao ficarem por mais tempo fora da célula, sem conseguir invadir, poderiam ser alvos do sistema imune do hospedeiro, como por exemplo a opsonização por anticorpos, que leva a rápida fagocitose e eliminação destes parasitas, assim como demonstraram Joiner et al (1990) e Morisaki, Heuser e Sibley (1995). Sendo assim, a TgHDAC2 poderia funcionar como alvo para fármacos no tratamento da toxoplasmose.

Nos últimos anos, a visão de que a função das HDACs na transcrição estaria relacionada apenas ao silenciamento gênico tem sido desconstruída, uma vez que diversos estudos têm mostrado que a atividade de histona desacetilase é importante para a ativação de certos genes (CLAYTON, et al, 2006; KIDDER; PALMER, 2012; WANG, et al, 2009; ZUPKOVITZ, et al, 2006). Em levedura, foi mostrado que a Hos2, uma histona desacetilase de classe I, se associa preferencialmente a genes ativos (WANG; KURDISTANI; GRUNSTEIN, 2002).

Paralelamente, analisamos os níveis de acetilação em histonas, visto que são os potenciais alvos dessa enzima. Apesar da acetilação nas histonas H3 e H4 não ser estatisticamente diferentes dos parasitas controle, foi observado uma pequena variação, especialmente para histona H3 (GRÁFICO 4.5). No entanto, a acetilação é um processo muito dinâmico, que ainda pode depender dos processos celulares que estão ocorrendo no momento em que os parasitas são coletados para amostra, dificultando a comparação entre os resultados.

Nesse trabalho utilizamos apenas as histonas H3 e H4 por serem mais conservadas, sendo mais provável que anticorpos comerciais reconhecessem os homólogos de *T. gondii*. Além disso, as porções N-terminais de ambas possuem diversos sítios de acetilação, também identificados em *T. gondii*. Vale ressaltar, no entanto, que TgHDAC2 deve ser responsável pela desacetilação de outros resíduos não reconhecidos pelos anticorpos, ou mesmo de outras histonas, uma vez que nesse trabalho poucos foram testados em apenas duas histonas.

Devido a seu provável papel na replicação, seria interessante verificar as acetilações de deposição de histonas (H4K5ac e H4K12ac), que ocorrem assim que as histonas H4 são sintetizadas no citoplasma, e são removidas assim que depositadas no DNA. As acetilações na histona H3 recém-sintetizadas variam muito entre espécies, mas acetilação em K9 e K14 foram detectadas em histonas H3

recém-sintetizadas de *Tetrahymena*, sendo que foram esses os resíduos que testamos aqui, é possível que o mesmo ocorra em *Toxoplasma*.

Embora a superexpressão de TgHDAC2 indique uma localização celular no núcleo do parasita e apesar das HDACs de classe I, terem funções comumente associadas a desacetilação de histonas e envolvimento com a replicação do DNA, não é possível descartar que a TgHDAC2 desacetile outras proteínas não histonas. Em células de mamíferos o tratamento com MS-275, um inibidor de HDACs classe I, aumentou o número de proteínas acetiladas, confirmando que estas enzimas reconhecem proteínas não histonas como substrato. Essas outras proteínas compreendem fatores de transcrição, proteínas envolvidas em modificações de cromatina, reparo de DNA, transdução de sinal, importação nuclear, bem como chaperonas, proteínas estruturais, supressores de tumores e receptores de esteroides (MOSER; HAGELKRUY; SEISER, 2014).

Para conhecer os potenciais alvos e parceiros de TgHDAC2, o etiquetamento, ou mesmo a produção de anticorpos, seriam ferramentas fundamentais que viabilizariam ensaios de imunoprecipitação e identificação de proteínas através de espectrometria de massas. Entretanto, até o momento, não foi possível obter o etiquetamento da proteína. Foram feitas diversas tentativas de transfecção e duas construções diferentes, utilizando regiões para recombinação homóloga com 1000 e 2000 pb. Segundo Rommereim et al (2013) acima de 620 pb, são fragmentos considerados bons para recombinação homóloga, sendo que fragmentos próximos a 1000 pb aumentam muito a eficiência de recombinação.

A dificuldade em se obter a correta integração, de acordo com o mesmo autor, também pode ocorrer pela persistência episomal, ou seja, o plasmídeo entra na célula, porém não integra no genoma. Os parasitas transfectados e após seleção, continuam a etiqueta de HA, apenas detectada por PCR (FIGURA 4.14), sendo que não foi identificada por Western blot ou imunofluorescência. Além disso, a PCR que confirmaria a correta integração no genoma não obteve amplificação, sendo assim o plasmídeo poderia estar episomal o que explicaria a ausência de detecção. Outra explicação possível seria que talvez tivesse integrado em local aleatório no genoma. No entanto, a cepa RH Δ hxgprt Δ ku80 teoricamente não realiza, ou realiza em taxas muito baixas, a recombinação não-homóloga.

Outro fator que pode ter influenciado, é o fato dos *primers* não terem sido feitos com base na sequência da cepa utilizada (RH) e sim de acordo com

sequência da cepa ME49, a mais bem anotada até o momento. Os dados de sequenciamento da cepa RH foram obtidos e estão sendo depositados no banco de dados (LAU et al, 2016). Uma vez que os dados referentes a cepa RH estejam disponíveis seria interessante analisar se há muita diferença entre as sequências das duas cepas e em caso positivo, planejar novos *primers* e tentar esta abordagem novamente. Poderíamos ainda, utilizar a técnica de CRISPR-Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, associado ao gene 9). Shen et al (2014) e Sidik et al (2014) demonstraram a eficiência da edição de genes e inserção de etiquetas por recombinação homóloga em *T. gondii* utilizando este método.

Devido às dificuldades em obter a etiqueta, optamos alternativamente, pela superexpressão de TgHDAC2. Foi possível observar a localização nuclear em uma pequena parcela da população, através da fusão com GFP (FIGURA 4.17), porém não por Western blot. Embora esperado que a localização seja de fato nuclear, a confirmação da localização de TgHDAC2 ainda deve ser feita através de anticorpos policlonais ou etiquetamento da proteína endógena, o que trará resultados mais confiáveis. Acreditamos que apenas uma pequena parcela da população selecionada tinha o plasmídeo integrado no genoma, e conseqüentemente esta população deve ter sido perdida com a multiplicação dos parasitas. Ainda assim, quando a superexpressão de TgHDAC2 for confirmada, os parasitas transfectantes também serão caracterizados, de modo a contribuir com a elucidação da função de TgHDAC2 em *T. gondii*.

Os resultados de alinhamento indicam que a TgHDAC2 pode ter uma relação com as proteínas de plantas. Braun e colaboradores (2010) identificaram que a maquinaria de RNA de interferência de *T. gondii* tem uma origem relacionada a plantas e fungos. Além destas, os fatores de transcrição ApiAP2 também tem relação com proteínas de plantas. Todas essas relações podem indicar que *T. gondii* e as plantas modernas podem ter tido algum ancestral comum, do qual as espécies divergiram e se diversificaram. Por sua relação na transcrição, replicação e reparo de DNA, as HDACs devem ter evoluído junto com outros elementos regulatórios, como os fatores de transcrição e RNA de interferência, e por se tratar de processos tão importantes, a evolução deixa pouco espaço para diversificação e com isso a relação comum com as plantas é mantida.

A estrutura da proteína sempre despertou interesse pelo nosso grupo, e foi um dos motivos da escolha de TgHDAC2 como alvo de estudo. Dados preliminares

indicavam que as inserções aminoacídicas presentes no domínio HDAC não afetariam o sítio ativo da enzima (FIGURA 5.1) e poderiam funcionar como um domínio acessório. Entretanto, não havia qualquer tipo de informação a respeito da estrutura dessa região, se estaria presente na proteína madura ou se teria algum tipo de estrutura.

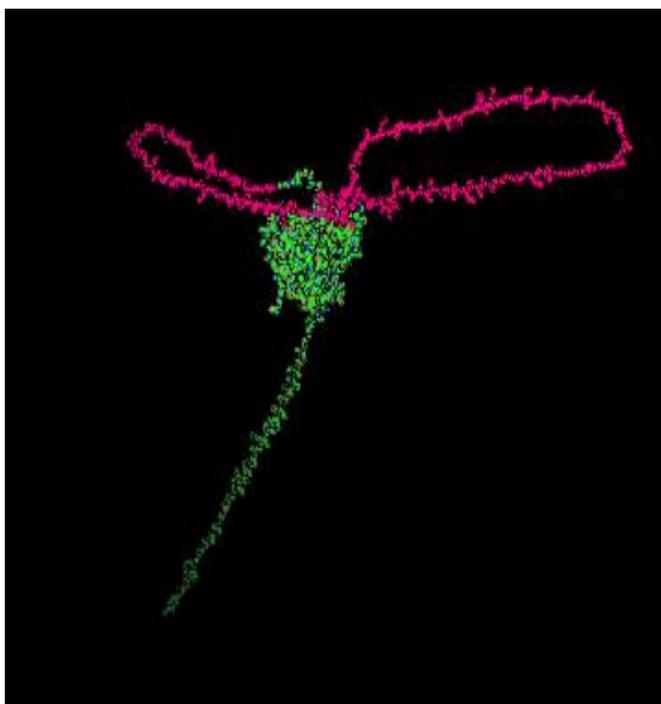


FIGURA 5.1 - ESTRUTURA DE TgHDAC2 FEITA POR HOMOLOGIA DE SEQUÊNCIA

Estrutura proteica modelada por homologia feita com o servidor HHPRED. A região globular é conhecida e é onde se encontra o sítio ativo da proteína. Destacado em rosa estão as duas inserções no domínio HDAC para as quais não se conhece a estrutura terciária.

FONTE: Siqueira (2015)

Os dados de dicroísmo circular forneceram dados mais refinados e confiáveis a respeito da estrutura tridimensional de TgHDAC2. Apesar dessa técnica avaliar a proteína como um todo, e não ser capaz de distinguir a região das inserções, foi possível afirmar que TgHDAC2 é uma proteína estável e enovelada, além de que não forma dímeros ou agregados. Além disso, os dados obtidos são promissores para uma futura análise por cristalografia de raios X, a qual traria dados de alta resolução e resolveria a estrutura tridimensional da proteína. Podemos inferir que a região das inserções aminoacídicas devem ser importantes para a estrutura da proteína e, possivelmente para sua função

Embora muitos indícios levem a crer que TgHDAC2 esteja relacionada com a replicação e invasão do parasita, outros estudos devem ser realizados para complementar e elucidar o mecanismo de ação de TgHDAC2 em *T. gondii*.

6 CONCLUSÕES

Nesta dissertação nos propusemos a avaliar a função de TgHDAC2 em *T. gondii* utilizando abordagens de genética reversa, como nocaute gênico, e construção de ferramentas para analisar sua localização celular e a estrutura da proteína.

Todas as construções foram realizadas com sucesso. O nocaute do gene *tghdac2* foi obtido com sucesso e o gene de seleção *hxgprt* foi inserido no *locus* correto do genoma de *T. gondii*, sendo que nessas condições o gene não se mostrou essencial para a sobrevivência do parasita. Entretanto a ausência de *tghdac2* acarretou em menor invasão e proliferação de formas taquizoítas, além de maior taxa de incorporação de um análogo de timidina, sugerindo que a TgHDAC2 atua durante a divisão celular, levando a crer que seja especificamente na fase S, diretamente relacionada a replicação do DNA.

Além disso, os parasitas nocaute perderam a organização no vacúolo parasitóforo, principalmente quando há mais de quatro parasitas num mesmo vacúolo, diferentemente dos parasitas utilizados como controle experimental que ficam organizados em rosetas, presos pelo corpo residual.

O nocaute gênico não levou a alteração significativamente, o nível de acetilação das histonas H3 e H4, não sendo possível identificar essas histonas como alvo de TgHDAC2.

A superexpressão de TgHDAC2 mostrou que a proteína tem localização nuclear, mas ainda deve ser confirmada por western blot.

A construção para etiquetamento do gene endógeno foi realizada com sucesso, porém o inserto não integrou no local correto, de forma que não foi possível realizar a localização da proteína por western blot e imunofluorescência.

A clonagem no vetor de expressão de proteínas em sistema bacteriano foi bem-sucedida, assim como a expressão e purificação da proteína recombinante, que teve que ser realizada em duas etapas.

O dicroísmo circular revelou que TgHDAC2 recombinante é uma proteína enovelada de aproximadamente 69 kDa, massa molecular esperada para um monômero, indicando que ela não forma dímeros ou agregados.

Outros estudos ainda devem ser feitos no intuito de compreender a função de TgHDAC2 no ciclo celular e invasão de *T. gondii*.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. *Biologia Molecular da célula*. 5. ed. Porto Alegre: **Artmed**,2010.
- ALLIS, C.D. JENUWEIN, T. The molecular hallmarks of epigenetic control. **Nature Reviews Genetics**:2016, v.17, p. 487-500
- ALVAREZ, C.A.; SUVOROVA, E.S. Checkpoints of apicomplexan cell division identified in *Toxoplasma gondii*. Coppens I, ed. **PLoS Pathogens**. 2017,v.13(7):e1006483. doi:10.1371/journal.ppat.1006483.
- APARICIO, J.G. et al. The Rpd3-Sin3 Histone Deacetylase Regulates Replication Timing and Enables Intra-S Origin Control in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**. 2004, v.24(11), p.4769-4780. doi:10.1128/MCB.24.11.4769-4780.2004.
- ARIAS, I. ;SORLOZANO, A.; VILLEGAS, E.; DE DIOS, L. J.; MCKENNEY, K.; CERVILLA, J.; GUTIERREZ, B. Influence of antimicrobial agents on replication and stage conversion of *Toxoplasma gondii*. **J Schizophr Res**. V.136, p. 128-36, 2012.
- ARISUE, N.; HASHIMOTO, T. Phylogeny and evolution of apicoplasts and apicomplexan parasites. **Parasitology International**, v. 64, n. 3, p. 254–259, 2015. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2014.10.005>>. .
- BALAJI, S.; BABU, M. M.; IYER, L. M.; ARAVIND, L. Discovery of the principal specific transcription factors of Apicomplexa and their implication for the evolution of the AP2-integrase DNA binding domains. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 13, p. 3994–4006, 2005.
- BANNISTER, A. J.; KOUZARIDES, T. Regulation of chromatin by histone modifications. **Nature Publishing Group**, v. 21, n. 3, p. 381–395, 2011. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/cr.2011.22>>. .
- BEHNKE, M. S.; WOOTTON, J. C.; LEHMANN, M. M.; et al. Coordinated progression through two subtranscriptomes underlies the tachyzoite cycle of *toxoplasma gondii*. **PLoS ONE**, v. 5, n. 8, 2010.
- BENMERZOUGA, I. et al. Guanabenz repurposed as an antiparasitic with activity against acute and latent toxoplasmosis. **Antimicrob Agents Chemother**. 2015, p. 59(11), p. 6939–6945.
- BHASKARA, S.; JACQUES, V.; RUSCHE, J. R.; et al. Histone deacetylases 1 and 2 maintain S-phase chromatin and DNA replication fork progression. **Epigenetics & chromatin**, v. 6, n. 1, p. 27, 2013. Epigenetics & Chromatin. Disponível em: <<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=23947532&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers3://publication/doi/10.1186/1756-8935-6-27>>. .

BHATTI, M. M.; LIVINGSTON, M.; MULLAPUDI, N.; SULLIVAN, W. J. Pair of unusual GCN5 histone acetyltransferases and ADA2 homologues in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 1, p. 62–76, 2006.

BISSATI, K. EL; SUVOROVA, E. S.; XIAO, H.; et al. *Toxoplasma gondii*. **mBio**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2016.

BLACK, M. W.; BOOTHROYD, J. C. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n.3, p. 607–623, 2000.

BLADER, I. et al. The Lytic Cycle Of *Toxoplasma Gondii*: 15 Years Later. **Annual review of microbiology**: 2015, v. 69, p. 463–485.

BOUGDOUR, A.; MAUBON, D.; BALDACCI, P.; et al. Drug inhibition of HDAC3 and epigenetic control of differentiation in Apicomplexa parasites. **the journal of experimental medicine**, v. 206, n. 4, p. 953–966, 2009.

BRAUN, L.; CANNELLA, D.; ORTET, P.; et al. A Complex Small RNA Repertoire Is Generated by a Plant / Fungal-Like Machinery and Effected by a Metazoan-Like Argonaute in the Single-Cell Human Parasite *Toxoplasma gondii*. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 5, 2010.

CHEN, Z. et al. Epigenetic regulation: A new frontier for biomedical engineers. **Annu. Rev. Biomed. Eng.** 2017, v.19,p.195–219. doi:<https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071516044720>

CLAYTON, A.L.; Enhanced histone acetylation and transcription: a dynamic perspective. **Mol Cell**. 2006;23:289–296

COOPER, G.M. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. **Regulation of Transcription in Eukaryotes**. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9904/>

CROKEN, M. M.; NARDELLI, S. C.; KIM, K. Chromatin modifications, epigenetics, and how protozoan parasites regulate their lives. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 5, p. 202–213, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2012.02.009>>. .

DALMASSO, M. C.; ECHEVERRIA, P. C.; ZAPPIA, M. P.; et al. *Toxoplasma gondii* has two lineages of histones 2b (H2B) with different expression profiles. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 148, n. 1, p. 103–107, 2006.

DALMASSO, M.C. et al. *Toxoplasma* H2A variants reveal novel insights into nucleosome composition and functions for this histone family. **J. Mol. Biol.** V.392 p.33–47. 2009

DARKIN-RATTRAY, S.J. et al. Apicidin: a novel antiprotozoal agent that inhibits parasite histone deacetylase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**: v.93 p.13143-13147. 1996.

DELWICHE, C.F.; PALMER, J.D. The origin of plastids and their spread via secondary symbiosis. In: D. Bhattacharya (ed.), *The Origins of Algae and their Plastids*. **Springer-Verlag**. 1997.

DIXON, S.E. et al. A decade of epigenetic research in *Toxoplasma gondii*. **Mol. Biochem. Parasitol.** v.173 p.1–9. 2010.

DOGGETT, J.S. et al. Endochin-like quinolones are highly efficacious against acute and latent experimental toxoplasmosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**: 2012, v.109(39), p. 15936–15941.

DUBEY, J. P. et al. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. **Clinical Microbiology Reviews**: v. 11, n. 2. 1998.

DUBEY, J.P. **Toxoplasmosis of Animals and Humans**. CRC Press: Beltsville, 2010. 2 ed

DUMÈTRE, A.; DUBEY, J. P.; FERGUSON, D. J. P.; BONGRAND, P.; AZAS, N. Mechanics of the *Toxoplasma gondii* oocyst wall. **PNAS**, v. 10, n. 28, p. 11535–11540, 2013.

EGGER, G.; LIANG, G.; APARICIO, A.; JONES, P. A. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature**, v. 429, n. 6990, p. 457–463, 2004.

ECKSCHLAGER, T. et al. Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs. *International Journal of Molecular Sciences*: 2017, v. 18.7, p.1414.

FALKENBERG, K.J.; JOHNSTONE, R. W. Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. **Nature Reviews Drug Discovery**: 2014, v.13, p.673–691. doi:10.1038/nrd4360

FERGUSON, B.M. A yeast origin of replication is activated late in S phase. **Cell**: 1991; 65: 507–515.

FERGUSON, D.J.P.; HUTCHISON, W. M.; SIIM, J.C. The ultrastructural development of the macrogamete and formation of the oocyst wall of *Toxoplasma gondii*. *Acta Pathol Microbiol Scand B*. v. 83, n. 5, p. 491-505, 1975

FINNIN, M. S.; DONIGIAN, J. R.; COHEN, A.; et al. letters to nature Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. **Letters to**

Nature, v. 401, n. 9, p. 188–193, 1999.

FISCHER, A. et al. Recovery of learning&memory after neuronal loss is associated with chromatin remodeling. **Nature** v. 447, p. 178–182, 2007

FISCHER, A.; SANANBENESI, F.; MUNGENAST, A.; TSAI, L. H. Targeting the correct HDAC(s) to treat cognitive disorders. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 31, n. 12, p. 605–617, 2010.

FOX, B.A. et al. Efficient gene replacements in *Toxoplasma gondii* strains deficient for nonhomologous end joining. **Eukaryot Cell**: v.8 p.520-529. 2009.

FRAGKOS, M. et al. DNA replication origin activation in space and time. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2015;16;360.
<http://dx.doi.org/10.1038/nrm4002>

GAJI, R. Y.; BEHNKE, M. S.; LEHMANN, M. M.; WHITE, M. W.; CARRUTHERS, V. B. Expression. **Mol Microbiol**, v. 79, n. 1, p. 192–204, 2012.

Gateway Technology. Disponível em
<<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/gatewayman.pdf> >. Acesso em: 15. Jan. 2018

GILBERT, R. E., FREEMAN, K., LAGO, E. G., BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G., TAN, H. K., WALLON, M., BUFFOLANO, W., STANFORD, M. R. AND PETERSEN, E. Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, e277, 2008

GISSOT, M. et al. *Toxoplasma gondii* and *Cryptosporidium parvum* lack detectable DNA cytosine methylation. *Eukaryot.Cell*: v. 7 n. 3 p. 537-540. 2008.
doi:10.1128/EC.00448-07

GISSOT, M.; KIM, K. How epigenomics contributes to the understanding of gene regulation in *Toxoplasma gondii*. *J Eukaryot Microbiol*: v. 55 n. 6 p.476-480. 2008.

GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com. .

GREENFIELD, N. J. “Using Circular Dichroism Spectra to Estimate Protein Secondary Structure.” **Nature protocols** 1.6 2876–2890. PMC. (2006).

GRIFFITHS, A.J.F. et al. Transcription: Gene Regulation in Eukaryotes— an Overview. **Modern Genetic Analysis**. New York: W. H. Freeman; 1999.. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21346/>

GROSS, U., POHL, F. Influence of antimicrobial agents on replication and stage

conversion of *Toxoplasma gondii* . **Curr Top Microbiol Immunol**. n. 219, p. 235-45 1996.

GUBBELS, M.; WHITE, M.; SZATANEK, T. The cell cycle and *Toxoplasma gondii* cell division : Tightly knit or loosely stitched ? **Science Direct**, v. 38, p. 1343–1358, 2008.

HANNON, G. J. RNA interference. **Nature**, v. 418, n. 11, p. 24–26, 2002.

HENIKOFF, S. Nucleosome destabilization in the epigenetic regulation of gene expression. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, p. 15–26, 2008.

HOLOCH, D.; MOAZED, D. RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. *Nature reviews Genetics*. 2015;16(2):71-84. doi:10.1038/nrg3863.

HU, K.; JOHNSON, J.; FLORENS, L.; et al. Cytoskeletal Components of an Invasion Machine — The Apical Complex of *Toxoplasma gondii*. **PLoS Pathogens**, v. 2, n. 2, p. 121–138, 2006.

HUYNH, M.H.; CARRUTHERS, V.B. Tagging of endogenous genes in a *Toxoplasma gondii* strain lacking Ku80. *Eukaryot Cell*: v. 8 n. 4 p.530-539. 2009.

INGRAM, A. K.; HORN, D. Histone deacetylases in *Trypanosoma brucei*: Two are essential and another is required for normal cell cycle progression. **Molecular Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 89–97, 2002.

JIN, B.; LI, Y.; ROBERTSON, K. D. DNA Methylation : Superior or Subordinate in the Epigenetic Hierarchy ? **Genes e Cancer**, v. 2, n. 6, p. 607–617, 2011.

KAMAKAKA, R. T.; BIGGINS, S. Histone variants : deviants. **Genes & Development**, v. 19, p. 295–310, 2005.

KEHRLI, K. et al. Class I Histone Deacetylase HDAC1 and WRN RECQ Helicase Contribute Additively to Protect Replication Forks upon Hydroxyurea-induced Arrest. **The Journal of Biological Chemistry**. 2016;291(47):24487-24503. doi:10.1074/jbc.M115.708594.

KHORASANIZADEH, S. The Nucleosome : From Genomic Organization to Genomic Regulation University of Virginia Health System. , v. 116, p. 259–272, 2004.

KIDDER, B.L.; PALMER, S. HDAC1 regulates pluripotency and lineage specific transcriptional networks in embryonic and trophoblast stem cells. *Nucleic Acids Res*. 2012;40:2925–2939

KÖHLER, S.; DELWICHE, C. F.; DENNY, P. W.; TILNEY, L. G.; WEBSTER, P.; WILSON, R. J. M. PALMER, J. D.; ROOS, D. S. A Plastid of Probable Green Algal

Origin in Apicomplexan Parasites. **SCIENCE**, :p. 1485-1489, 1997

KUSBECI, O. Y., MIMAN, O., YAMAN, M., AKTEPE, O. C., YAZAR, S. Could *Toxoplasma gondii* have any role in Alzheimer disease?. **Alzheimer Dis. Assoc. Disorders**, v. 25, p. 1–3, 2011

LAGGER, G.; CARROLL, Â. O.; REMBOLD, M.; et al. Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression. **the embo journal**, v. 21, n. 11, 2002.

LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P.A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I.M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; HIGGINS, D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, 23, 2947-2948, 2007.

LAU, Y.L. et al. Deciphering the Draft Genome of *Toxoplasma gondii* RH Strain. Grigg ME, ed. **PLoS ONE**. 2016;11(6):e0157901. doi:10.1371/journal.pone.0157901.

LEMAN, A.R; NOGUCHI, E. The Replication Fork: Understanding the Eukaryotic Replication Machinery and the Challenges to Genome Duplication. **Genes**. 2013;4(1):1-32. doi:10.3390/genes4010001.

LEVINE, N. D.; COX, F. E. G.; DEROUX, G.; et al. A Newly Revised Classification of the Protozoa *. **J. Protozool.**, v. 27, n. 1, p. 37–58, 1980.

LIM, L.; MCFADDEN, G. I. The evolution , metabolism and functions of the apicoplast. **Phil. Trans. R. Soc. B**, v. 365, p. 749–763, 2010.

LODISH,H., BERK,A., ZIPURSKY,S.L., MATSUDAIRA,P., BALTIMORE,D., DARNELL,J.E. **Molecular Cell Biology**, 1999

MARMORSTEIN, R. Chemistry of acetyl transfer by histone modifying enzymes : structure , mechanism and implications for effector design. **Oncogene**, v. 26, p. 5528–5540, 2007.

MARMORSTEIN, R.; ZHOU, M.M. Writers and Readers of Histone Acetylation: Structure, Mechanism, and Inhibition. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**. 2014, v. 6(7) a018762. doi:10.1101/cshperspect.a018762.

MCAULEY, J. B. Congenital Toxoplasmosis. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 3, n. 1, p. 30–35, 2014.

MEISTER, G.; TUSCHL, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. **Nature**, v. 431, n. 16, p. 343–349, 2004.

MOAZED, D. Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. **Nature**. 2009;457:413–420.

MONTGOMERY, R. L.; DAVIS, C. A.; POTTHOFF, M. J.; et al. Histone deacetylases 1 and 2 redundantly regulate cardiac morphogenesis, growth, and contractility. **Genes & Development**, v. 5, p. 1790–1802, 2007.

MONTOYA, J. G., LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. *The Lancet*, v. 363 n. 9425 p. 1965-1976. 2004.

MOSER, M.A.; HAGELKRUYS, A.; SEISER, C. Transcription and beyond: the role of mammalian class I lysine deacetylases. **Chromosoma**. 2014;123(1-2):67-78. doi:10.1007/s00412-013-0441-x.

NARDELLI ET AL. The Histone Code of *Toxoplasma gondii* Comprises Conserved and. **mBio**, v. 4, n. 6, p. 1–12, 2013.

NETO, V. A. Tratamento da toxoplasmose. **Rev. Med.**, v. 64, n. 1, p. 8–9, 1982.

PAPPAS, G.; ROUSSOS, N.; FALAGAS, M. E. Toxoplasmosis snapshots: Global status of seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis, International. **Journal for Parasitology**, V. 39, n. 12, P. 1385-1394, 2009

PARTHUN, M.R. et al. Hat1: the emerging cellular roles of a type 'B' histone acetyltransferase. **Oncogene** v. 26, p. 5319–5328. 2007

PERIZ, J.; WHITELAW, J.; HARDING, C.; et al. *Toxoplasma gondii* F-actin forms an extensive filamentous network required for material exchange and parasite maturation. **eLife**, p. 1–29, 2017.

PFEFFERKORN, E.R.; PFEFFERKORN, L.C. *Toxoplasma gondii*: isolation and preliminary characterization of temperature sensitive mutants. **Exp Parasitol** 39:365–376. 1976

PETERSON, C. L.; LANIEL, M. Histones and histone modifications. **Current Biology**, v. 14, n. 14, p. 546–551, 2004.

PRIOLEAU, M.N.; MacALPINE, D.M. DNA replication origins—where do we begin?. **Genes & Development**: 2016, v. 30(15), p.1683-1697. doi:10.1101/gad.285114.116.

RADKE, J. R.; BEHNKE, M. S.; MACKEY, A. J.; et al. The transcriptome of *Toxoplasma gondii*. **BMC Biology**, v. 18, p. 1–18, 2005.

RADKE, J. R. et al. Defining the cell cycle for the tachyzoite stage of *Toxoplasma*

gondii. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.115 n.2 p. 165-175.2001.

REINHART, B.J.; BARTEL, D.P. Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats. **Science**. 2002;297:1831

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2. 2012. doi:10.1128/CMR.05013-11.

ROMMEREIM, L.M. et al. Genetic Manipulation in $\Delta ku80$ Strains for Functional Genomic Analysis of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**. 2013;(77):50598. doi:10.3791/50598.

SAINSBURY, S.; BERNECKY, C.; CRAMER, P. Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**: 2015, v.16, p.129–143. doi:10.1038/nrm3952

SETO, E.; YOSHIDA, M. Erasers of Histone Acetylation : The Histone Deacetylase Enzymes. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 6, p. 1–26, 2014.

SHEN, B.; et al. Efficient gene disruption in diverse strains of *Toxoplasma gondii* using CRISPR/CAS9. **mBio**: v.5 n.3. 2014. doi:10.1128/mBio.01114-14.

SHEN, B. et al. “Activation of Chronic Toxoplasmosis by Transportation Stress in a Mouse Model.” **Oncotarget**: 2016 v. 7.52, p. 87351–87360.

SIDIK, S.M.; et al. Efficient Genome Engineering of *Toxoplasma gondii* Using CRISPR/Cas9. **PLoS ONE**: v.9 n. 6. p.100450. 2014. doi:10.1371/journal.pone.0100450.

SIQUEIRA, C.M. O papel de TgHDAC2 em *Toxoplasma gondii*. 2015. 63 f.. Monografia. **Universidade Federal do Paraná**, Curitiba, 2015.

SnapGene software de GSL Biotech. Disponível em: <snapgene.com>

SOUZA, W. DE; MARTINS-DUARTE, É. S.; LEMGRUBER, L. Organização estrutural do taquizoíta de *Toxoplasma gondii*. , v. 20, p. 131–143, 2010.

STRAHL, B. D.; ALLIS, C. D. The language of covalent histone modifications. , v. 403, n. January, p. 41–45, 2000.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**:30 2725-2729, 2013

TANAKA, T.; KNAPP, D.; NASMYTH, K. Loading of an Mcm Protein onto DNA Replication Origins Is Regulated by Cdc6p and CDKs. **Cell** , Volume 90 , Issue 4 , 649 - 660

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. Toxoplasma gondii: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, V. 30, n. 12, P. 1217-1258, 2000. ISSN 0020-7519, [http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00124-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00124-7)

UPADHYA, R. et al. Improved techniques for endogenous epitope tagging and gene deletion in Toxoplasma gondii. **Journal of Microbiology Methods**. v.85 n. 2 p.103-113. 2011.

VANAGAS, L. et al. Toxoplasma histone acetylation remodelers as novel drug targets. **Expert Rev Anti Infect Ther**: v.10 n.10 p.1189–1201. 2012.

VANAGAS, L.; JEFFERS, V.; BOGADO, S. S.; et al. targets. **Expert Rev. Anti. Infect. Ther.**, v. 10, n. 10, p. 1189–1201, 2013.

VAN DOOREN, G. G.; STRIEPEN, B. The Algal Past and Parasite Present of the Apicoplast. *Annual Review of Microbiology*: 2013, v. 67:1, p. 271-289

VOGELAUER, M. et al Histone Acetylation Regulates the Time of Replication Origin Firing. **Molecular Cell** , Volume 10 , Issue 5 , 1223 - 1233

VONLAUFEN, N.; et al. MYST Family Lysine Acetyltransferase Facilitates Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) Kinase-mediated DNA Damage Response in Toxoplasma gondii * □. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 15, p. 11154–11161, 2010.

WANG, A.; KURDISTANI, S.K.; GRUNSTEIN, M. Requirement of Hos2 histone deacetylase for gene activity in yeast. **Science**. 2002;298:1412–1414.

WANG, Z. et al. Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes. **Cell**. 2009;138:1019–1031.

WEI, H.; JIANG, S.; CHEN, L.; et al. Characterization of Cytosine Methylation and the DNA Methyltransferases of Toxoplasma gondii. **International Journal of Biological Sciences**, v. 13, n. 4, p. 458–470, 2017.

YAMAGUCHI, T.; CUBIZOLLES, F.; ZHANG, Y.; et al. Histone deacetylases 1 and 2 act in concert to promote the G1-to-S progression. **Genes and Development**, v. 24, n. 5, p. 455–469, 2010.

ZUPKOVITZ, G. Negative and positive regulation of gene expression by mouse histone deacetylase 1. **Mol Cell Biol**. 2006;26:7913–7928.