

JÚLIA RIBEIRO MORAES

EFEITOS DA TRICOSTATINA A, UM INIBIDOR DE
HISTONAS DESACETILASES, EM *Angomonas deanei*, UM
TRIPANOSOMATÍDEO COM ENDOSSIMBIONTE



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como pré-requisito para a obtenção do
grau de Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
NOVEMBRO / 2018**

Trabalho realizado no Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, Departamento de Biologia Celular e Parasitologia, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, sob a orientação da Professora Dra Maria Cristina Machado Motta e coorientação da Dra Aline Araújo Zuma.

FICHA CATALOGRÁFICA

R827e

Ribeiro Moraes, Júlia

Efeitos da Tricostatina A, um inibidor de histonas desacetilases, em *Angomonas deanei*, um tripanosomatídeo com endossimbionte / Júlia Ribeiro Moraes. -- Rio de Janeiro, 2018.

51 f.

Orientador: Maria Cristina Machado Motta.

Coorientador: Aline Araújo Zuma.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2018.

1. *Angomonas deanei*. 2. Endossimbiose. 3. Microtúbulos. 4. Histonas desacetilases. 5.

Tricostatina A. I. Machado Motta, Maria Cristina, orient. II. Araújo Zuma, Aline, coorient. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

JÚLIA RIBEIRO MORAES

EFEITOS DA TRICOSTATINA A, UM INIBIDOR DE HISTONAS
DESACETILASES, EM *Angomonas deanei*, UM TRIPANOSOMATÍDEO
COM ENDOSSIMBIONTE

Rio de Janeiro, 30 de novembro de 2018

(Profa. Marta Helena Branquinha de Sá – IMPPG)

(Dra. Michelle Tanny Cunha do Nascimento – IBQM)

(Dra. Carolina Moura Costa Catta-Preta –

(Profa. Elvira Maria Chequer Bou Habib – IMPPG)

DEDICATÓRIA

A todos os cientistas que dedicam o seu tempo e o seu amor para fazer pesquisa de ponta, a duras penas, no Brasil. Que os seus esforços e sua paixão sejam sempre reconhecidos.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente, ao fracasso. Não fosse o meu fracasso no vestibular de medicina, não estaria hoje escrevendo este trabalho de conclusão de curso sobre um assunto que tanto amo. Não fosse a minha falha, não teria entrado para o curso de Microbiologia e Imunologia e vivido tudo que vivi e que me foi proporcionado por este curso do coração. Ou talvez o fracasso seja meramente uma obra de Deus, feita para nos colocar agilmente nos planos Dele. Sendo assim, agradeço a Deus por me por no caminho certo e me apresentar a oportunidade de completar a faculdade e escrever este trabalho, mesmo que, em primeiro momento, parecesse que eu tivesse falhado.

Agradeço aos meus pais, Déa Maria Martins Ribeiro e Altair Moraes Filho, pelo amor e dedicação para comigo, pelos sacrifícios e abdições que sempre fizeram para que eu guesse os meus sonhos e tivesse o melhor que eles poderiam proporcionar.

Agradeço à minha orientadora, Maria Cristina Machado Motta, e à minha co-orientadora, Aline Araújo Zuma, por me aceitarem e re-aceitarem na equipe, acreditando que eu poderia ter algo a acrescentar ao trabalho realizado no grupo. Mulheres brilhantes, inteligentes e cheias de honradez que me inspiram e me fazem querer ser melhor naquilo que faço.

Gostaria de agradecer também à equipe do laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, em especial aos colegas do grupo Cris Motta que deixaram de ser apenas colegas e se tornaram amigos, Jean de Oliveira Santos, Azuil Barrinha, Tayná Mourão, Camila Gonçalves, Fernanda Bortolami e Ana Carolina Loyola, por estarem sempre dispostos a me ajudar e por fazerem os dias de trabalho mais doces e alegres.

Agradeço aos meus amigos, que por motivos de espaço não poderei colocar todos os nomes, porém gostaria de agradecer especialmente à Bruna e ao Pedro, por terem sido o meu porto seguro nos momentos difíceis e meu sistema de suporte nos momentos de alegria. Obrigada por me entenderem e terem paciência comigo, principalmente nos momentos finais da vida acadêmica.

Agradeço à Paula, ao Vinícius e ao Matheus, por terem visto em mim algo especial e terem se tornado amigos tão queridos na faculdade, sempre servindo de apoio e uma fonte infinita de leveza, felicidade e companheirismo nesses quatro longos anos.

Agradeço a Duda, por ser tão sensata e me dar luz quando eu precisei, empatia em momentos ruins, e risadas em momentos únicos. Por estar ali para o que der e vier e nunca se cansar das minhas reclamações e dos meus lamentos, sempre pronta com a casa aberta, um sorriso no rosto e um prato de pão de queijo.

Agradeço ao Matt, que mesmo a 7000 km de distância, torceu, vibrou e comemorou comigo cada conquista realizada, inclusive e principalmente academicamente, acreditando na minha capacidade e me repreendendo quando falava que não ia conseguir.

Agradeço ao Michael, que apesar de todas as diferenças, talvez tenha sido o único a me apoiar inteiramente em todas as minhas decisões e a acreditar em mim e nos meus planos e sonhos. Agradeço por sempre me incentivar e por sentir tanto orgulho de minhas conquistas, mesmo que pequenas.

Agradeço também a todas as outras pessoas que passaram pela minha vida e deixaram um pouco de cada uma delas em mim. Acredito que somos frutos de tudo aquilo que vivenciamos e temos um pedaço de cada pessoa que cruza o nosso caminho, nos influenciando e moldando nos nossos gostos, sonhos e objetivos. Por isso, sou grata por cada uma delas e pela influência que tiveram em minha vida e, conseqüentemente, na escolha da minha carreira e da minha pesquisa.

Por fim, agradeço às agências de fomento, FAPERJ e CNPq/CAPES, que financiaram e investiram neste projeto.

RESUMO

JÚLIA RIBEIRO MORAES

EFEITOS DA TRICOSTATINA A, UM INIBIDOR DE HISTONAS DESACETILASES, EM *Angomonas deanei*, UM TRIPANOSOMATÍDEO COM ENDOSSIMBIONTE

Orientador: Profa. Maria Cristina Machado Motta

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Angomonas deanei é um tripanosomatídeo monoxênico que possui em seu citoplasma uma bactéria simbiótica. Nessa relação mutualística, a divisão da bactéria é controlada pelo hospedeiro durante o ciclo celular e é dependente do citoesqueleto de microtúbulos, de forma que cada célula filha herde apenas um endossimbionte. Histonas Desacetilases (HDACs) são enzimas que catalisam a retirada de radicais acetil (desacetilação) de proteínas tais como histonas e tubulina, podendo influenciar na expressão gênica e no dinamismo do citoesqueleto do tripanosomatídeo. A Tricostatina A (TSA) é um inibidor de HDACs utilizado como agente antitumoral e antiparasitário e, mais recentemente, como agente quimioterápico contra *Trypanosoma cruzi*. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos da TSA sobre *Angomonas deanei*, especialmente a fim de investigar se a divisão sincronizada do simbiote com outras estruturas celulares é afetada. Células controle e tratadas com diferentes doses do inibidor por até 60 horas foram então analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e de Transmissão (MET) e por Contrastação Negativa. A técnica de imunofluorescência usando anticorpo anti-tubulina acetilada foi utilizada para avaliar os efeitos do composto sobre o citoesqueleto do protozoário hospedeiro e sobre o endossimbionte. Além disso, foi analisada a relação entre a proliferação e viabilidade celular e a progressão do ciclo celular. Os resultados mostraram inibição da proliferação, mas não da viabilidade. Alterações morfológicas e ultraestruturais foram observadas em protozoários tratados, como a não segregação do simbiote e alterações no arranjo do citoesqueleto, assim como parada do ciclo celular na fase G1. Concluímos que a inibição da desacetilação afeta a sincronia de divisão do simbiote com o protozoário hospedeiro e que a divisão da bactéria depende do dinamismo dos microtúbulos.

Palavras-chaves: *Angomonas deanei*; *Tripanossomatídeos*; *Endossimbiose*; *Microtúbulos*; *Histonas desacetilase*; *Tricostatina A*.

ABSTRACT

JÚLIA RIBEIRO MORAES

EFEITOS DA TRICOSTATINA A, UM INIBIDOR DE HISTONAS DESACETILASES, EM *Angomonas deanei*, UM TRIPANOSOMATÍDEO COM ENDOSSIMBIONTE.

Orientador: Profa. Maria Cristina Machado Motta

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Angomonas deanei is a monoxenic trypanosomatid that harbors a symbiotic bacterium in its cytoplasm. In this mutualistic association, the division of the prokaryote is controlled by the host during its cell cycle and is dependent of the microtubule cytoskeleton, in a way that each daughter cell inherits only a single bacterium. Histone Deacetylases (HDACs) are enzymes that catalyze the removal of acetyl radicals (deacetylation) from proteins, such as histones and tubulin, influencing on gene expression and cytoskeleton dynamism of the trypanosomatid. Tricostatin A (TSA) is a HDACs inhibitors used in studies as antitumour and antiparasitic agent, and more recently, as chemotherapeutic agent against *Trypanosoma cruzi*. In this context, the objective of this work was to analyze the effects of TSA on *Angomonas deanei*, especially to investigate if the symbiont synchronic division with other host cell structures is affected. Thus, *A. deanei* was treated with different concentrations of the inhibitors for up to 60 hours and then processed for Scanning Electron Microscopy (SEM), Transmission Electron Microscopy (TEM) and Negative Stain. The Immunofluorescence technique using anti-acetylated tubulin antibody was employed to verify the compound effects over the host cytoskeleton and its endosymbiont. Additionally, the relation between cell proliferation and cell viability was analyzed and also the cell cycle progression. Results show inhibition of cell proliferation, but not of cell viability. Morphological and ultrastructural alterations on treated protozoans were also observed, like symbiont non-segregation and modifications on the cytoskeleton arrangement, as well as cell cycle arrest on G1 phase. We conclude that the deacetylation inhibition affects the synchronic division between the symbiont and the host protozoan and that the bacterium division depends on microtubule dynamism.

Key words: *Angomonas deanei*; *Trypanosomatid*; *Endosymbiosis*; *Microtubules*; *Histone deacetylase*; *Trichostatin A*.

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Os tripanosomatídeos	1
1.2 Endossimbiose em tripanosomatídeos	2
1.3 O citoesqueleto e o arranjo de microtúbulos	7
1.4 A acetilação e a desacetilação de proteínas	10
1.4.1 Acetilação e desacetilação de histonas	10
1.4.2 Acetilação e desacetilação de tubulina	12
1.5 O inibidor de desacetilases Tricostatina A	13
2 JUSTIFICATIVA	14
3 OBJETIVOS	14
3.1 Objetivo geral	14
3.2 Objetivos específicos	14
4 MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1 Cultivo Celular	15
4.2 Curva de Crescimento	15
4.3 Viabilidade Celular	16
4.4 Imunofluorescência	17
4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	17
4.6 Microscopia Eletrônica de transmissão (MET)	18
4.7 Contrastação Negativa	19
4.8 Citometria de Fluxo para Ciclo Celular	19
5 RESULTADOS	20
5.1 Curva de Crescimento	20
5.2 Viabilidade Celular	21
5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	22
5.4 Contrastação Negativa	23
5.5 Imunofluorescência	24
5.6 Citometria de Fluxo para Ciclo Celular	28
5.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	30
6 DISCUSSÃO	31
7 CONCLUSÃO	36
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1 INTRODUÇÃO

1.1 Os tripanosomatídeos

Os tripanosomatídeos são protozoários flagelados, parasitas, que fazem parte da família Trypanosomatidae e apresentam algumas particularidades em sua morfologia e metabolismo quando comparados a outros protozoários. Essas particularidades se dão especialmente em determinadas organelas, sejam elas específicas da família ou comum a todos os eucariotos. Possuem uma mitocôndria única e ramificada, que apresenta uma parte alargada onde se encontra o DNA mitocondrial (kDNA) chamada cinetoplasto; um flagelo único, que emerge do corpo basal e que por sua vez está ligado ao cinetoplasto; a estrutura paraflagelar e o axonema que compõem o flagelo; os glicossomos, que são um tipo especial de peroxissomo e que contêm enzimas da via glicolítica; um núcleo que sofre mitose fechada; e organelas específicas de reserva como os reservossomos, presente na forma epimastigotas do *Trypanosoma cruzi* (Woodward and Gull, 1990; de Souza et al., 1999).

A morfologia dos membros da família Trypanosomatidae é variada e pode se modificar durante o ciclo de vida de determinadas espécies (Wallace et al., 1966). Anteriormente, alguns tripanosomatídeos eram qualificados por nomes derivados dos gêneros que tivessem a forma mais semelhantes à sua, como por exemplo, o uso do termo “tripanosomático” para se referir às formas metacíclicas de trypanosomas encontrados no sangue, ou “crithidiano” para os flagelados com características semelhantes às atribuídas ao gênero *Crithidia* (Wallace et al., 1966). Essa classificação se aprimorou e os tripanosomatídeos passaram a ser denominados de acordo com a posição de estruturas principais, como o ponto de emergência do flagelo e a posição do núcleo em relação ao cinetoplasto (Wallace et al., 1966; Gomes, 2014). Tendo isto como base, o termo “mastigota” foi utilizado junto a prefixos para classificar as formas do ciclo biológico dos protozoários (Wallace et al., 1966), totalizando 7 formas principais representadas na figura abaixo:

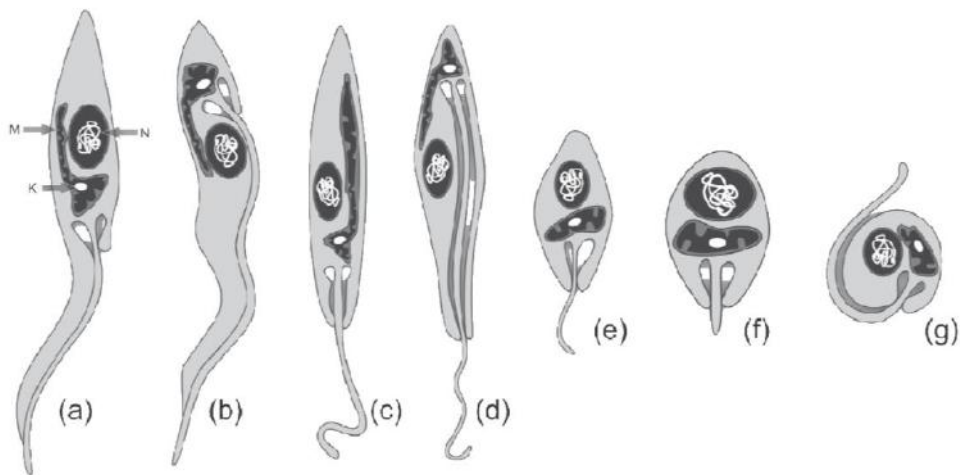


Figura 1: Representação das formas apresentadas na família Trypanosomatidae. Nesta figura estão representadas as seguintes formas: (a) epimastigota, (b) tripomastigota, (c) promastigota, (d) opistomastigota, (e) coanomastigota, (f) amastigota e (g) esferomastigota (por José Miguel Machado – www.cariocacria.com.br)

A família Trypanosomatidae consiste em um número grande e diversificado de espécies, sendo sua grande maioria de protozoários monoxênicos (que possuem apenas um hospedeiro invertebrado, em geral um inseto) e também protozoários heteroxênicos (mais de um hospedeiro, sendo um invertebrado e o outro vertebrado). Estes últimos são causadores de doenças em animais e seres humanos, como as tripanossomíases e a leishmaniose, por exemplo, sendo de grande importância social, médica e econômica (Gomes, 2014; Kaufer et al., 2017). São 20 gêneros pertencentes à família, dos quais 3 gêneros são patogênicos e 4 gêneros são de espécies que possuem uma bactéria simbiótica em seu citoplasma, também chamada de endossimbionte (Teixeira et al. 2011, Votýpka et al. 2014, Kostygov et al. 2016).

1.2 Endossimbiose em tripanosomatídeos

Entre estes tripanosomatídeos monoxênicos, os 4 gêneros que abrigam endossimbiontes são *Angomonas*, *Strigomonas*, *Kentomonas* e *Novymonas*. Estes protozoários apresentam 3 estruturas contendo DNA: o simbiote, o cinetoplasto e o núcleo (Figura 2).

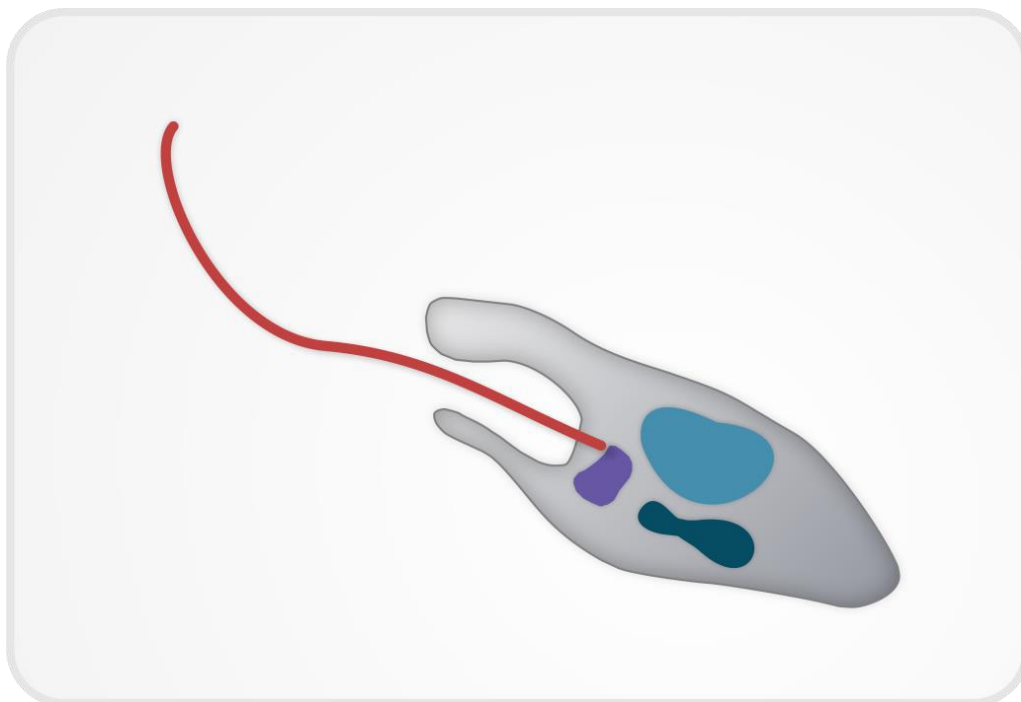


Figura 2: Representação de *Angomonas deanei* e quatro de suas estruturas principais: endossimbionte (azul escuro) próximo ao núcleo (azul claro), cinetoplasto (roxo) e flagelo (vermelho). Esquematizado por Júlia Ribeiro Moraes, Gabriela Pires e Pedro Emanuel Maia. Inspirada em imagem de Carolina Catta-Preta publicada na Revista Pesquisa FAPESP, no artigo intitulado "Parceiros Inseparáveis" (2015).

É possível afirmar que estes protozoários sofrem modificações morfológicas, bioquímicas e moleculares pela presença da bactéria em seu citoplasma (revisto por Motta 2010, Motta et al. 2013). Quando comparados aos tripanosomatídeos que naturalmente não possuem simbiote, as espécies com a bactéria acabam por apresentar diferenças nas estruturas típicas da família. A presença da bactéria causa mudanças na distribuição espacial de certas organelas, como a mitocôndria e os glicossomos. A mitocôndria única e ramificada se encontra bem próxima à membrana plasmática, por vezes tocando-a, e nestes pontos os microtúbulos subpeliculares estão ausentes. O cinetoplasto por sua vez, quando comparado ao dos tripanosomatídeos sem simbiote, possui formato diferenciado e kDNA contendo arranjo menos condensado (Freytmüller & Camargo 1981, Cavalcanti et al., 2008; de Souza et al. 2017). Já os glicossomos encontram-se distribuídos em sua maioria ao redor do simbiote (Loyola-Machado et al. 2017). Além disso, observa-se uma estrutura paraflagelar bastante reduzida (Gadelha et al., 2005). A bactéria por sua vez, apresenta parede celular degenerada e genoma bastante pequeno, entre 742 e 833 kb (Motta et al., 1997a; Motta et al. 2013, Silva et al., 2018) – Figura 3.

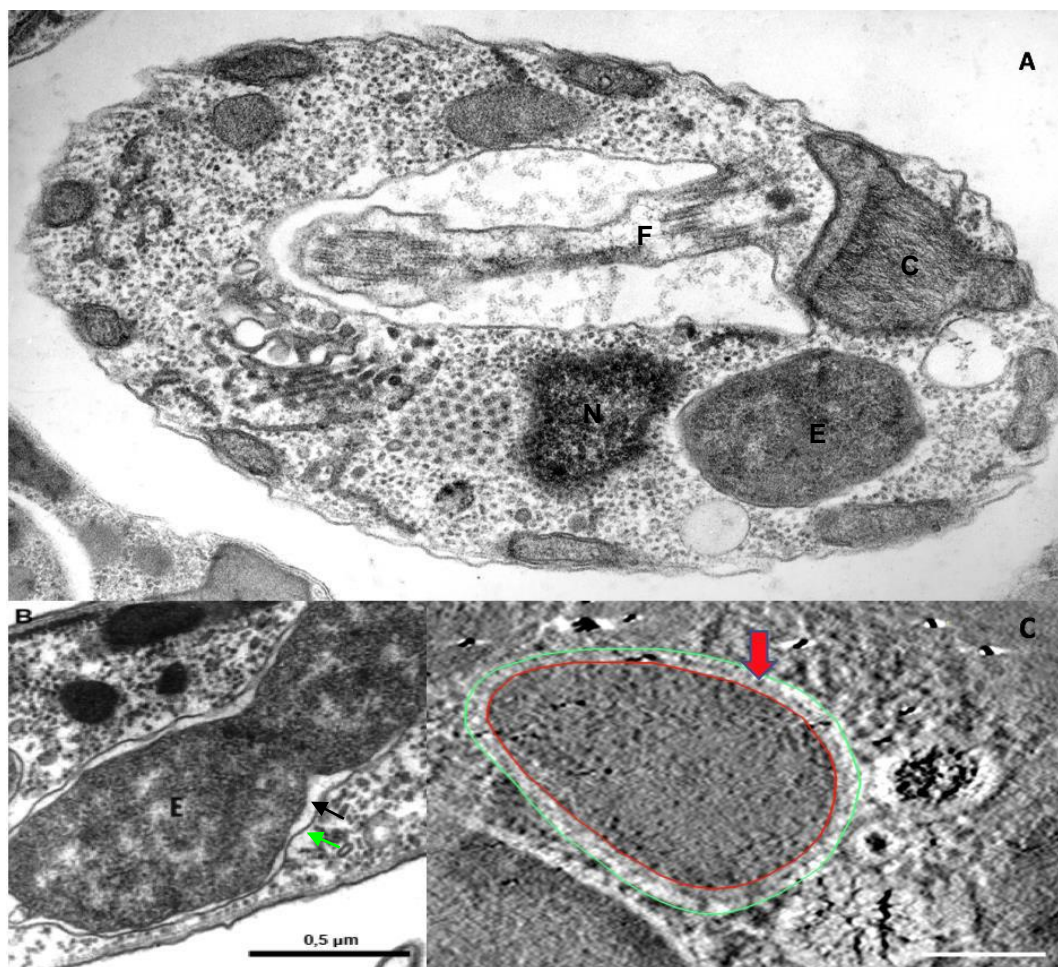


Figura 3: Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) mostrando características ultraestruturais típicas dos tripanossomatídeos que contêm endossimbionte (E). (A) Imagem de *Angomonas desouzai* com bactéria simbiótica, cinetoplasto com kDNA menos condensado (C), bolsa flagelar (BF) contendo o flagelo (F) e outras estruturas principais, como o núcleo (N) (Soares, Motta & De Souza, 1989). (B) Endossimbionte de *A. deanei* com seu envoltório composto por duas unidades de membrana, uma mais externa (seta verde) e uma mais interna (seta preta). Esta amostra foi processada por MET modo rotina (Soares & De Souza, 1988). (C) Endossimbionte de *A. deanei* com sua membrana mais externa delimitada em verde, membrana mais interna delimitada em vermelho e com a parede de peptidoglicana reduzida entre as membranas (seta). Esta amostra foi fixada por congelamento (Catta-Preta, 2015).

As alterações estruturais, observadas tanto no simbiote como no protozoário hospedeiro, estão relacionadas ao carácter mutualístico da relação e também com a adaptação e a co-evolução entre os dois microrganismos. Tal tipo de associação nos ajuda a entender o aparecimento de organelas de origem simbiótica na célula eucariota.

Comparados aos tripanossomatídeos heteroxênicos, os tripanossomatídeos monoxênicos têm seus hábitos e ciclos de vida pouco conhecidos (Kaufer et al., 2017). Sabe-se que os hospedeiros invertebrados destes protozoários são usualmente das ordens Diptera e

Hemiptera, que pertencem a uma gama ampla de espécies e estão contidos em gêneros como *Aedes*, *Oncopeltus*, *Ornidia* e *Chrysomya*, por exemplo. Devido ao seu baixo impacto na saúde de seres humanos e animais, estes protozoários foram poucos estudados por parasitologistas (Kaufer et al., 2017). Em contrapartida, considerando-se que tripanosomatídeos em geral são importantes modelos para o estudo de processos biológicos básicos e essenciais, os monoxênicos portadores de bactéria simbiótica têm se mostrado relevantes para estudos de co-evolução metabólica e para o entendimento do controle da divisão celular. Este tipo de investigação nos permite melhor entender como surgiram organelas oriundas de simbioses, como a mitocôndria e o cloroplasto (Timmis et al., 2004; Catta-Preta et al., 2015).

Tendo isto em vista, um dos protozoários com endossimbionte mais estudado é a *Angomonas deanei*. *A. deanei* é um tripanosomatídeo de forma coanomastigota que possui em seu interior uma β -proteobactéria simbiótica que é filogeneticamente relacionada aos gêneros *Bordetella* e *Achromobacter* e se encontra próxima ao núcleo da célula hospedeira (revisto por Motta, 2010; Motta et al., 2013; Silva et al., 2018). Genes que codificam a síntese da parede celular foram perdidos pelo simbiote, porém genes codificantes para a síntese de DNA e outras funções fundamentais foram mantidos (Motta et al., 2013). A relação entre protozoário e bactéria proporciona uma troca metabólica intensa, o que mantém estes dois microrganismos unidos. A proteobactéria contém enzimas que completam vias metabólicas essenciais do protozoário, enquanto que parece se beneficiar da atividade dos glicosomos e do ATP gerado pelo hospedeiro (Alves et al., 2011, 2012; Klein et al., 2012; Motta et al., 1997b; Azevedo-Martins et al., 2015; Loyola-Machado et al., 2017). De acordo com esta ideia, o endossimbionte é observado em íntima associação com os glicosomos e com os ramos mitocondriais, de modo a integrar metabolicamente a bactéria e o hospedeiro (Motta et al., 1997b; Faria-e-Silva et al., 2000; Loyola-Machado et al., 2017).

Em *A. deanei*, a interação entre protozoário hospedeiro e simbiote é altamente controlada, sendo a divisão da bactéria coordenada com a do núcleo durante o ciclo celular. Deste modo, cada célula filha recebe apenas uma cópia deste simbiote e de outras organelas e estruturas únicas essenciais, como o núcleo, o cinetoplasto e o flagelo (Motta et al., 2010). Esta sincronia de divisão também é observada em *Strigomonas culicis*, outra espécie de tripanosomatídeo que contém simbiote (Brum et al., 2014). Em ambas as espécies, a bactéria se divide de maneira regulada e usando o núcleo da célula hospedeira como referência topológica, se alongando e inclinando sobre o mesmo (Motta et al., 2010, Brum et al., 2014).

No caso de *A. deanei*, dentro do tempo de geração de 6 horas do protozoário, o simbionte realiza a sua replicação em 4 horas, sendo a primeira estrutura a se duplicar na célula durante o ciclo celular. Após isso, ocorre a duplicação do corpo basal e depois o cinetoplasto se duplica e se divide, seguido do núcleo. Enquanto isso, um novo flagelo se forma e também uma nova bolsa flagelar. Ao final da citocinese do protozoário surgem duas células filhas, cada uma com uma cópia de cada organela citada (Motta et al., 2010) – Figura 4.

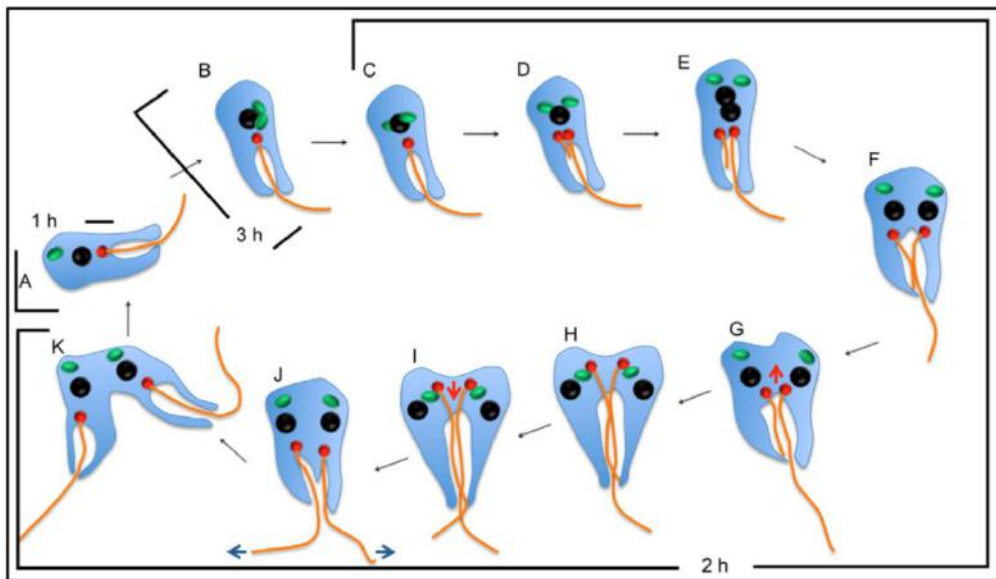


Figura 4: Representação esquemática do ciclo celular de *Angomonas deanei*. Nota-se que o simbionte, em verde, é a primeira estrutura que contém DNA a se dividir. Em seguida, o cinetoplasto, em vermelho, se duplica e migra para a parte posterior do corpo celular de modo simultâneo à invaginação da bolsa flagelar. O núcleo, em preto, é a última estrutura que contém DNA a se dividir. Após a citocinese, cada célula filha herda apenas uma cópia de cada uma destas estruturas (Motta et al., 2010).

Como estratégia para estudar o ciclo celular de microrganismos, é possível utilizar inibidores que bloqueiam de modo específico uma determinada fase do mesmo. A Afidicolina, por exemplo, quando testada em *A. deanei*, inibiu o progresso do ciclo celular em G1/S, promovendo o aumento do número de células contendo um simbionte em forma de constrição. Por outro lado, a Camptotecina, um inibidor da fase G2 em tripanosomatídeos (Zuma et al. 2014), promove a filamentação do endossimbionte. Isto significa que a proteobactéria é capaz de replicar o seu material genético, porém incapaz de realizar a citocinese, se tornando uma estrutura alongada com mais de um nucleóide (material genético procariótico condensado). Além disso, o uso de Cicloheximida, um inibidor de síntese proteica, também bloqueia a progressão do ciclo celular em diferentes fases e resulta em protozoários cujos simbiontes são incapazes de se dividir. Isso mostra que a bactéria

simbiótica consegue replicar seu DNA independentemente do protozoário, porém sua citocinese é dependente de fatores produzidos pelo hospedeiro durante a progressão do ciclo celular. Olhados em conjunto, estes dados indicam que, em *A. deanei*, a coordenação de divisão do simbiote com a célula hospedeira ocorre em G1. Importante ainda mencionar, que o uso da Orizalina, um inibidor da polimerização de tubulina, impediu a divisão do simbiote, sugerindo que este processo é microtúbulo-dependente (Catta-Preta et al., 2015).

1.3 O Citoesqueleto e o arranjo de microtúbulos

Comum a todos os eucariotos, o citoesqueleto é caracterizado por uma rede de proteínas filamentosas que estão relacionadas à forma da célula, ao tráfego interno de vesículas, ao processo de mitose e ao controle do metabolismo celular em geral (Alberts et al., 2010). Essas proteínas filamentosas se distinguem em três classes principais, que diferem entre si pelo diâmetro, resistência e composição: os microtúbulos, que possuem maior diâmetro e são constituídos de tubulina; os filamentos intermediários, constituídos de diversas subunidades de proteínas; e os filamentos de actina, de menor diâmetro e constituídos de proteínas do mesmo nome (Alberts et al., 2010; Janke e Bulinsk, 2011; Nature Education, 2014). Cada uma dessas classes de proteínas está mais relacionada a determinadas funções da célula. Os microtúbulos, por exemplo, são essenciais para o posicionamento e o transporte de organelas, na formação de cílios e flagelos e também do fuso mitótico, durante o processo de divisão celular. Já os filamentos de actina são mais relacionados à manutenção da forma da membrana celular e à formação de filopódios no processo de mobilidade celular, por exemplo. Os filamentos intermediários têm funções bem diversas como resistência ao estresse mecânico e formação de junções celulares (Matilla e Lappalainen, 2008; Janke e Bulinsk, 2011).

Em tripanosomatídeos, o citoesqueleto de microtúbulos tem um arranjo particular, onde se observa uma rede de microtúbulos subpeliculares, que são ligados uns aos outros e à membrana plasmática do protozoário. Essa rede é extremamente controlada pelo protozoário e confere a forma particular da célula uniflagelada, além de estar relacionada à divisão do tripanosomatídeo e à distribuição de suas organelas (Gull, 1999). Em se tratando ainda destes microrganismos, o citoesqueleto é especialmente estudado em *Trypanosoma brucei*, em especial na forma procíclica, e pode variar de conformação durante as diferentes fases de desenvolvimento do protozoário. O único flagelo, contém microtúbulos que formam o axonema, e se origina da bolsa flagelar, estando conectado ao cinetoplasto. Microtúbulos de maior diâmetro (24 nm) formam um padrão helicoidal ao longo da célula, apresentando um

espaço entre si que é bastante regular. Os microtúbulos vizinhos são conectados uns aos outros por pontes proteicas e também à membrana plasmática. Variações deste padrão podem ser vistas nas outras espécies da família (Gull, 1999) – Figura 5. Importante ainda considerar, que os diferentes formatos dos tripanossomatídeos são estabelecidos com a participação da FAZ (de Flagellum Attachment Zone), uma estrutura proteica complexa que liga a estrutura paraflagelar ao citoesqueleto de microtúbulos, que por sua vez, se conectam à membrana plasmática (Sunter & Gull, 2016). Além dos microtúbulos do citoesqueleto e daqueles que formam o axonema, há ainda aqueles que formam o fuso mitótico. Durante a mitose em tripanossomatídeos, ocorre um processo de divisão igualitária do material genético em que os cromossomos não sofrem compactação e não há perda do envoltório nuclear (Ogbaboyi et al., 2000).

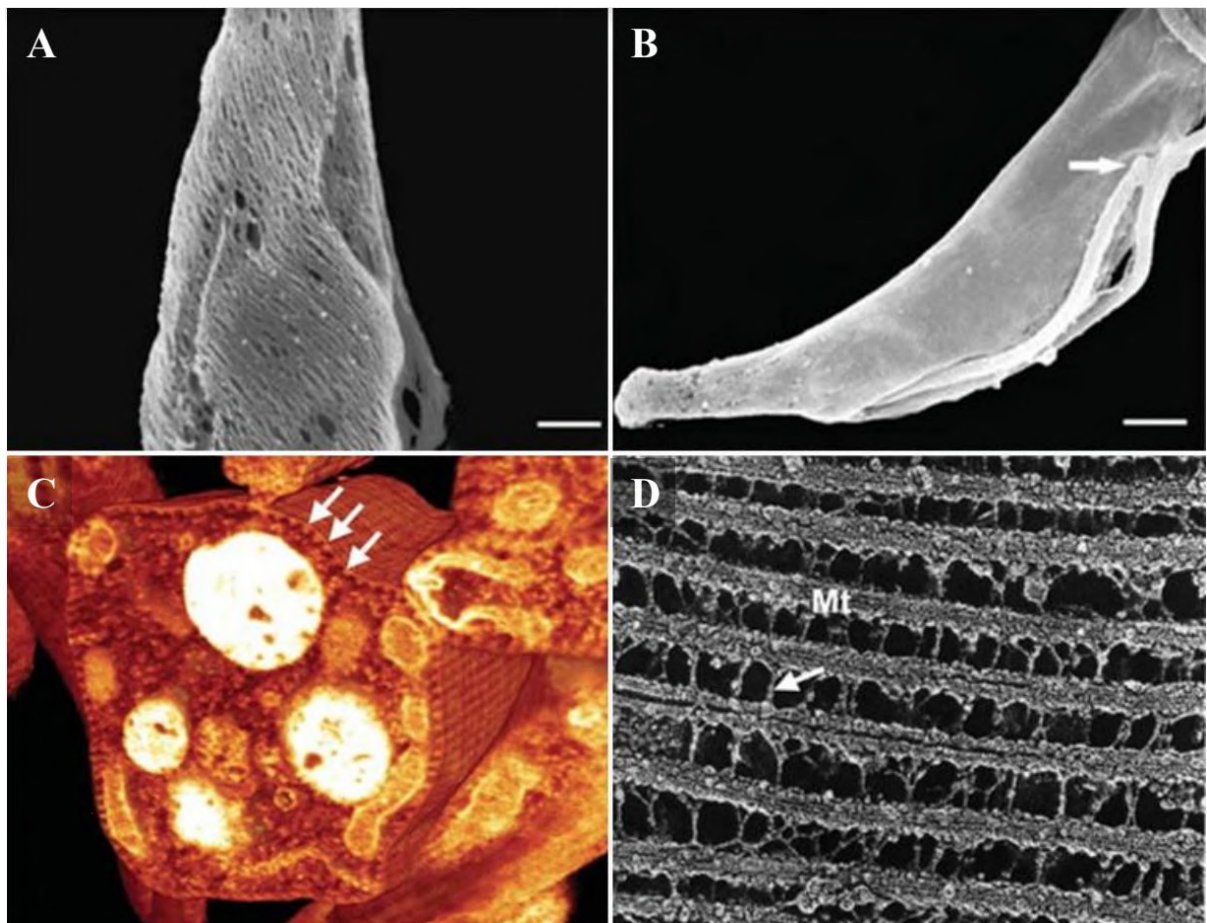


Figura 5: Microtúbulos subpeliculares em tripanosomatídeos. (A) Padrão helicoidal dos microtúbulos, após extração de membrana, em *H. megaseliae*. (B) Porção terminal do flagelo aderida ao corpo celular (seta) e padrão retilíneo dos microtúbulos em *T. brucei*. (C) Microtúbulos subpeliculares de *T. cruzi* (setas) observados por reconstrução tri-dimensional de série de microscopias eletrônicas de varredura (FIB-SEM). (D) Microtúbulos (Mt) de *H. megaseliae* interespaçados e conectados entre si (seta) (Vidal & De Souza, 2017). Nota-se que nestas imagens os microtúbulos correm paralelos entre si.

A trama de microtúbulos é composta por heterodímeros de α e β tubulina, apesar de existir uma grande variedade na família destas proteínas (Jackson et al., 2006). Esses heterodímeros de tubulina induzem uma polaridade intrínseca aos microtúbulos. Estudos anteriores mostraram que, em *T. brucei*, os microtúbulos do córtex têm polaridade e são mais dinâmicos na parte posterior da célula (“plus end”), ou seja, região contrária à emergência do flagelo. Já os microtúbulos do axomema e que compõem o flagelo, presentes na parte anterior do corpo celular, apresentam polaridade negativa e são menos dinâmicos (“minus end”) (Gull, 1999).

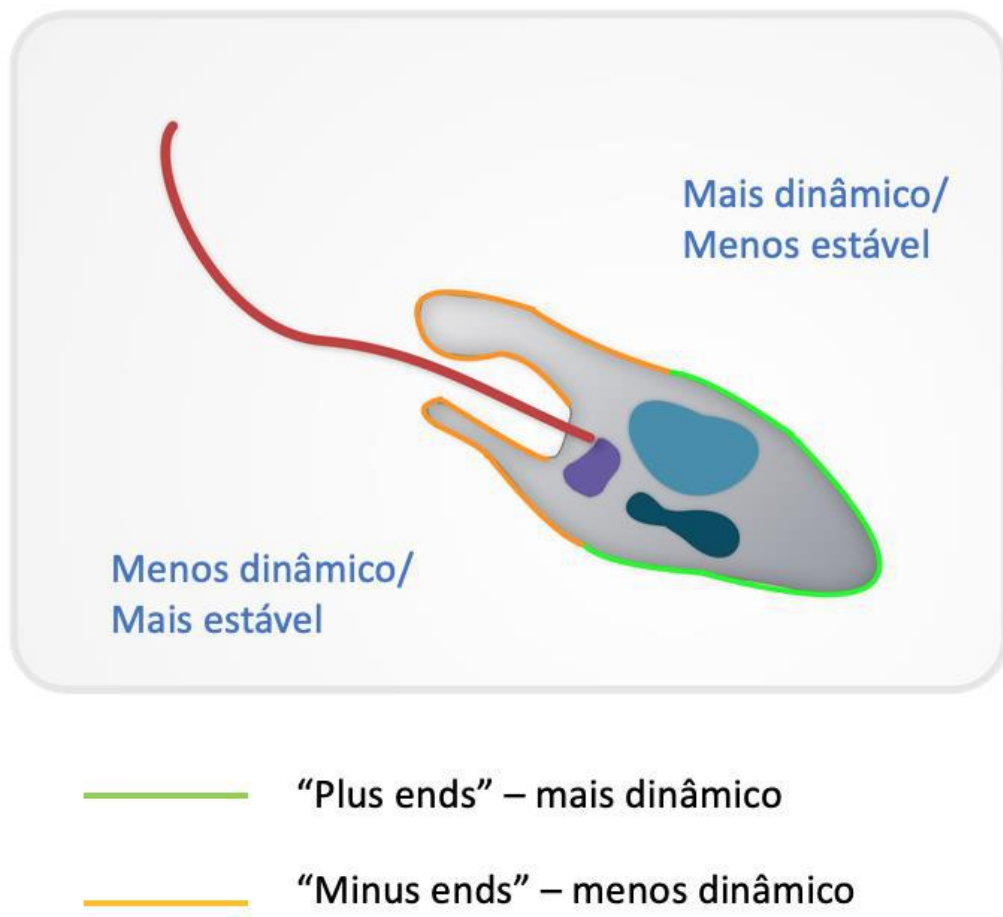


Figura 6: Representação do dinamismo do citoesqueleto em *Angomonas deanei*, baseando-se no que é descrito em *T. brucei*. A parte posterior do corpo celular, representada em verde, indica os terminais “plus end” dos microtúbulos, que são mais dinâmicos. Já a parte anterior do corpo, representada em laranja, indica os terminais “minus end”, que são menos dinâmicos.

A polarização dos microtúbulos é importante, pois a montagem e desmontagem destes filamentos acontece mais rapidamente nos terminais “plus end”, e é mais lenta nos terminais

“minus end” (Lodish et al., 2000). Além disso, as tubulinas tendem a sofrer modificações pós-traducionais, como fosforilação, acetilação, palmitoilação e tirosinação, por exemplo, que influenciam na polaridade e afetam a funcionalidade da proteína (Song & Brady, 2015), e que estão associadas, inclusive, ao dinamismo deste citoesqueleto de microtúbulos. Sabemos que modificações pós-traducionais de tubulina estão associadas à construção do citoesqueleto em tripanosomatídeos. Estudos demonstraram que nestes microrganismos, todos os genes de um *locus* codificam para o mesmo tipo de α e β tubulina, e o que irá diferenciá-las serão as modificações realizadas após a sua tradução (Gull, 1999).

Em *A. deanei*, pouco se sabe sobre as particularidades de seu citoesqueleto e nada se conhece sobre as modificações pós-traducionais dos microtúbulos, sendo necessários estudos para a elucidação desta questão. Entretanto, acredita-se que sejam similares ao que ocorre nos outros tripanosomatídeos mais estudados, como *T. brucei* e *T. cruzi*. Em estudos recentes, a diminuição da expressão de tubulina em *A. deanei* utilizando o sistema de RNA de interferência (RNAi) provocou uma alteração na ultraestrutura do protozoário, gerando células com o fenótipo “fat-cells” e impedindo a divisão do endossimbionte, que apresentou filamentação similar àquela provocada pela Camptotecina (Catta-Preta et al., 2016). Isso sugere que a divisão do simbionte no tripanosomatídeo esteja intimamente ligada ao citoesqueleto de microtúbulos e que, como dito anteriormente, alguns fatores produzidos pelo protozoário durante o ciclo celular sejam essenciais para a citocinese da bactéria (Catta-Preta et al., 2015).

1.4 A acetilação e a desacetilação de proteínas

Em eucariotos de forma geral, e como já dito anteriormente, proteínas como a tubulina e também as histonas, podem sofrer modificações pós-traducionais que auxiliam no exercício de suas funções.

A acetilação é o processo onde radicais acetil, cujas cargas são negativas, são transferidos de uma molécula (geralmente de uma Acetil-coenzima A) e adicionados às proteínas. Contrário a este processo, a desacetilação consiste na retirada de radicais acetil destas proteínas (Watson et al., 2014).

1.4.1 Acetilação e desacetilação de histonas

A acetilação de histonas ocorre com a introdução de radicais acetil nos resíduos de lisina presentes nas caudas N-terminais destas proteínas. Isso causa a redução da carga positiva das histonas, o que diminui a afinidade das mesmas ao DNA, que se torna menos

compactado. Assim, fatores de transcrição, como a RNA polimerase, têm maior acesso às regiões promotoras do DNA. Deste modo, a acetilação de histonas promove a transcrição, enquanto que a desacetilação reprime a transcrição, já que esta última aumenta a carga positiva das histonas e promove uma maior interação destas com o DNA, que se condensa (Kuo e Allis, 1998).

Neste contexto, a acetilação é catalisada por enzimas chamadas histonas acetiltransferases, ou HATs, e a desacetilação é catalisada pelas histonas desacetilases, ou HDACs (Kuo e Allis, 1998). Essas histonas podem ainda servir como alvos de promotores para ativar ou reprimir genes (Vogelauer et al., 2000) – Figura 7. As HDACs formam uma família que pode ser dividida em 4 classes distintas, baseadas nas suas estruturas. As HDACs de classes I, II e IV possuem um sítio catalítico similar, que utiliza zinco como um cofator, porém diferem entre si em tamanho e organização estrutural. Já as HDACs de classe III utilizam NAD⁺ como cofator (Campo, 2017).

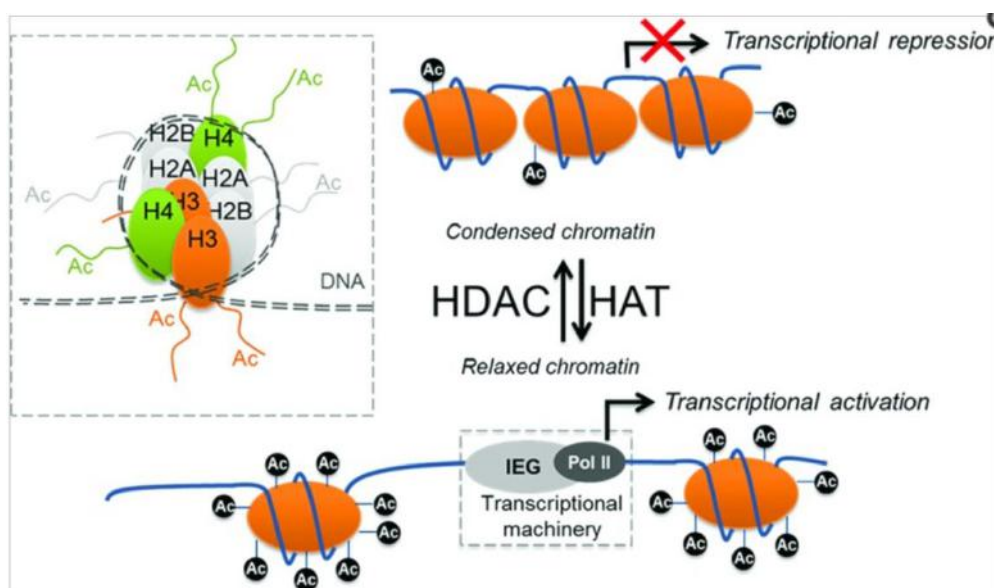


Figura 7: Esquema mostrando a acetilação e desacetilação de histonas realizadas por histonas acetiltransferases (HATs) e histonas desacetilases (HDACs), respectivamente. O *inset* mostra um nucleossomo que é composto por um octâmero de histonas acetiladas e por DNA (Whittle & Singewald, 2014).

Em tripanosomatídeos, as histonas apresentam características particulares, como a carga, sequência e/ou tamanho, e a regulação da expressão de genes é muito diferente quando comparada à de outros eucariotos (da Cunha et al., 2006). Porém, análises *in silico* do genoma de protozoários, como os do gênero *Leishmania*, revelaram a presença de genes codificantes

para diversas HATs e HDACs, inferindo que os tripanosomatídeos possuem mais fatores de transcrição do que era originalmente suposto (Ivens et al., 2005; Martínez-Calvillo et al., 2010; Campo, 2017). Estudos feitos por da Cunha et al. (2006) por exemplo mostram que, em *T. cruzi*, o padrão de acetilação de histonas H3 e H4 é bem similar ao de outros eucariotos, porém o de histonas H2A e H2B é bastante diferente. Mais recentemente, análises proteômicas mostraram que neste tripanossomatídeo as modificações pós-transcricionais em histonas variam de acordo com a fase de desenvolvimento (de Jesus et al., 2016). Em *T. brucei*, foi demonstrado que os genes que codificam para histonas desacetilases são essenciais para a progressão do ciclo celular desses tripanosomatídeos (Janzen et al., 2006). Isso implica que, apesar das diferenças apresentadas, é possível que as enzimas que realizam esses processos ainda sejam conservadas de forma a realizar as modificações similarmente a de outros organismos eucarióticos.

1.4.2 Acetilação e desacetilação de tubulina

Um grande número de modificações pós-traducionais de tubulina é conhecido atualmente, sendo divididas em duas classes: modificações de proteínas gerais, que não são exclusivas desta proteína, tais como acetilação, palmitoilação e fosforilação; e modificações específicas de tubulina, como a tirosinação, poliglicinação e poliglutamilação, que como o nome já infere, ocorrem apenas nesta proteína (Song & Brady 2015) – Figura 8.

A acetilação geralmente ocorre na α tubulina, no resíduo de lisina 40 que se encontra no lúmen, ou parte interna oca, dos microtúbulos (Figura 7). Esse sítio de ligação de radical acetil se manteve conservado desde células protistas às células de mamíferos, porém difere em leveduras. Atualmente, a lisina 40 é o único sítio de acetilação que existe em microtúbulos inteiramente polimerizados, logo essa modificação é geralmente associada à microtúbulos estáveis. Essa acetilação é realizada por acetiltransferases, enzimas que se mostram conservadas de protistas à mamíferos (Li e Yang, 2015).

Já a desacetilação, é realizada pela histona desacetilase 6 (HDAC6), que está co-localizada na rede de microtúbulos e desacetila α -tubulina (Hubbert et al. em 2002). Isso trouxe o questionamento de que a HDAC6 teria uma função não relacionada à funcionalidade de histona e à regulação de transcrição (Li e Yang, 2015).

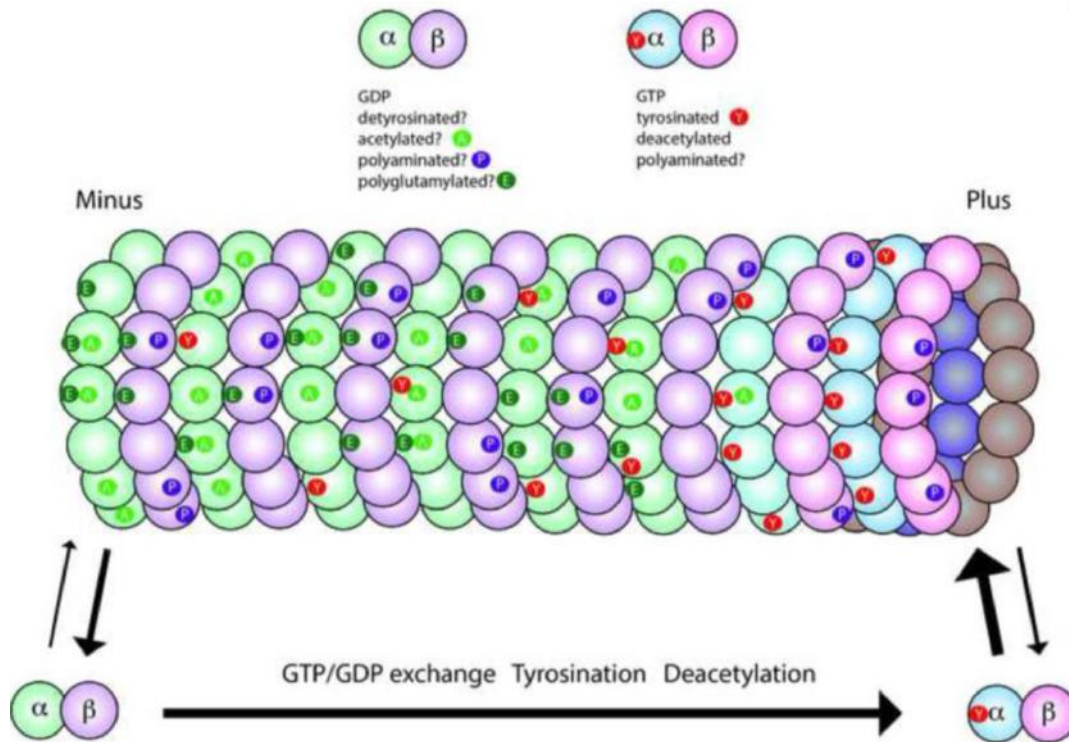


Figura 8: Modificações pós-traducionais que os microtúbulos podem sofrer. O terminal mais dinâmico/instável, referido como "plus end" (cujos dímeros de tubulina estão representados em rosa e azul), é rico em GTP e tende a sofrer modificações como tirosinação e desacetilação. O terminal menos dinâmico/mais estável, "minus end" (cujas tubulinas polimerizadas estão representadas em verde e roxo), é rico em GDP e tende a sofrer modificações como acetilação e destirosinação (Song & Brady, 2015).

1.5 O inibidor de desacetilases Tricostatina A

A Tricostatina A, também chamada de TSA, é um derivado natural do ácido dienohidroxâmico, isolado de espécies bacterianas do gênero *Streptomyces* (National Center for Biotechnology Information, 2005; Lernoux et al., 2017). A TSA inibe especificamente histonas deacetilases (HDACs) de classe I e II, resultando na hiper-acetilação de histonas e na transcrição desregulada de genes (National Center for Biotechnology Information, 2005; Campo, 2017). Utilizada expansivamente em vários estudos, a terapia com TSA é considerada inovadora para diversos tipos de câncer, já que seu mecanismo de ação acarreta no bloqueio da proliferação tumoral (de Souza et al., 2015; Garmpis et al., 2017). Diversos artigos evidenciam uma ação significativa e promissora contra câncer de mama e melanoma (Damaskos et al., 2017; Garmpis et al., 2017; Song et al., 2018), além de gerar efeitos em parasitas como *Trichomonas vaginalis* e *Entamoeba histolytica*. (Ehrenkauffer et al., 2007; Song et al., 2017).

Em tripanosomatídeos, os estudos realizados com este fármaco são escassos e os efeitos nesses protozoários são ainda pouco conhecidos. Campo (2017) relatou através de ensaios moleculares que um dos efeitos da TSA sobre *T. cruzi* foi a hiperacetilação de histonas. Recentemente, estudos do nosso grupo mostraram que a TSA é capaz de aumentar tanto o nível de acetilação de histonas, como dos microtúbulos em epimastigotas de *T. cruzi*, indicando que este composto age como um *dual inhibitor*, ou seja, um inibidor que possui dois alvos. Além disso, este inibidor de desacetilases promoveu alterações morfológicas e ultraestruturais no parasito, como torções do corpo celular, o que foi associado à sua ação sobre o citoesqueleto de microtúbulos (Santos et al, 2018).

2 JUSTIFICATIVA

Este trabalho tem sua importância para consolidar a ideia de que o ciclo celular e, principalmente, a divisão do tripanosomatídeo *A. deanei* e de seu endossimbionte são dependentes de microtúbulos. Pretendemos agora verificar se o dinamismo deste tipo de citoesqueleto apresenta um papel fundamental no processo de divisão da bactéria, de modo a manter uma única cópia do simbionte em cada nova célula filha gerada.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar os efeitos da Tricostatina A, um inibidor de enzimas desacetilases, sobre o tripanosomatídeo *Angomonas deanei* e seu endossimbionte.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a relação entre a proliferação e a concentrações utilizadas do inibidor por curvas de crescimento;
- Checar os efeitos deste inibidor sobre a viabilidade celular pelo método MTS/PMS;
- Verificar se há efeito do inibidor sobre a morfologia e ultraestrutura do tripanosomatídeo e do simbionte por microscopia eletrônica de transmissão e de varredura e por contrastação negativa;

- Avaliar se há efeito do inibidor sobre a estrutura e divisão do endossimbionte por imunofluorescência e por microscopia eletrônica de transmissão.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultivo Celular

Angomonas deanei foi mantido em meio Warren, contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB). O repique se deu a cada 24 horas e os protozoários foram mantidos em estufa a 28°C. Após este período, as células foram mantidas em geladeira a 4°C até o próximo repique.

4.2 Curva de Crescimento

As curvas de crescimento foram realizadas pelo método de contagem por câmara de Neubauer para análise da proliferação de protozoários tratados com o inibidor TSA (Sigma Aldrich) em relação as células controle.

O experimento foi lançado com os tripanosomatídeos já repicados em meio Warren enriquecido de 10% de SFB, à concentração de 1×10^6 células/mL em tubos Falcon com volume de 1 mL cada. Os diferentes tubos continham: células controle, células controle com o DMSO, veículo da droga (o DMSO foi testado na concentração referente à utilizada para diluir a maior concentração da droga, ou seja, foi utilizada a concentração de 20 μ L para diluir a droga para 100 μ M) e células tratadas com diferentes concentrações de Tricostina A (25 μ M, 50 μ M e 100 μ M). Os protozoários foram mantidos em estufa a 28°C durante todo o tempo de duração do ensaio.

Doze horas após o lançamento do experimento, com as células em uma concentração de 4×10^6 células/mL e em fase exponencial de crescimento, a TSA foi adicionada ao meio de cultura e alíquotas foram retiradas para contagem a cada 12 horas. Os parasitos foram diluídos em líquido de contagem (10% formaldeído em PBS) para quantificação em câmara de Neubauer nos tempos de tratamento 0 hora (inoculação do composto), 12 h, 24 h, 36 h, 48 h e 60 horas, que equivalem aos tempos de crescimento 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 60 h e 72 h, respectivamente.

Para a formulação do gráfico, as contagens foram feitas em duplicata e foi utilizada a fórmula: $A \times 10^4 \times B$, onde:

A é o número de células contadas dividido por 4;

10^4 é o fator da câmara de Neubauer;

B é o fator de diluição utilizado.

Foram realizadas no mínimo três curvas de crescimento em duplicata para obtenção de média e desvio padrão dos gráficos elaborados.

4.3 Viabilidade Celular

A análise da viabilidade celular foi realizada através do método MTS/PMS para avaliar se a célula estava viável a nível mitocondrial.

Assim como para as curvas de crescimento, os experimentos de viabilidade foram lançados com os tripanosomatídeos já repicados. As células foram crescidas em tubos Falcon, a uma quantidade total de 3 mL para cada tubo (para que fossem retiradas alíquotas de 1 mL a cada dia, nos tempos 24 h, 48 h e 72 horas de tratamento) e à concentração de 1×10^6 células/mL. A droga foi adicionada ao meio de cultura 12 horas após o lançamento do ensaio, tal como descrito para as curvas de crescimento. Essas alíquotas de 1 mL retiradas foram transferidas para tubos eppendorfs de 1,5 mL de capacidade e centrifugadas por 2 minutos a 3.600 rpm para a formação de sedimento (pellet).

Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e substituído por 1 mL de tampão de eletroporação, que mantém a viabilidade celular na ausência do meio de cultura durante o tempo necessário do ensaio e não interfere na leitura da absorbância. A partir dessas suspensões, 400 μ L foram transferidos para 4 poços de uma placa de 96 poços de fundo plano (100 μ L para cada poço), os quais 2 destes poços eram o controle negativo (o branco) e receberam 4 μ L de formaldeído a 10% em PBS. O formaldeído funciona como controle negativo, pois inviabiliza as células com as quais entra em contato. Como dito anteriormente, isso foi feito para cada concentração da droga a ser testada, além do controle e o controle do veículo da droga.

Após 10 minutos da adição do formaldeído, foi colocada uma mistura de MTS e PMS na proporção de 50 μ L de PMS para 1000 μ L de MTS. O MTS, na presença de PMS, é reduzido à formazan (que apresenta coloração marrom) por células viáveis, se tornando solúvel no meio e capaz de ter sua absorbância lida (Celis, 2006). Logo, os poços com células viáveis têm cor mais escura e os poços com células não-viáveis têm cor mais clara, apresentando maiores e menores níveis de absorbância respectivamente. A placa foi coberta

com papel alumínio para proteção da luz e foi incubada por 4 horas, em estufa a 28°C, até que fosse efetuada a leitura.

A leitura foi realizada em leitor de placas SpectraMax M2/M2e (Molecular Devices), no comprimento de onda de absorvância de 490 nm. Foram realizados três ensaios em duplicata para se obter um *n* mínimo e produzir média e desvio padrão.

4.4 Imunofluorescência

Para a imunofluorescência, as células controle e as células com 36 a 60 horas de tratamento com a droga foram processadas. As amostras foram fixadas em paraformaldeído 4% diluído em PBS por 5 minutos e posteriormente aderidas em lamínulas revestidas com poli-L-lisina por 10 minutos. A permeabilização das células se deu por Np40 (Nonidet) 3% por 10 minutos. Em seguida, foi incubado o tampão de bloqueio (BSA 3%, Geléia de peixe 0,5%, Saponina 1%) nas amostras por 30 minutos em câmara úmida, para impedir a ligação do anticorpo primário a sítios inespecíficos na célula.

Após a permeabilização e a incubação em tampão de bloqueio, as células foram marcadas com anticorpo primário específico para tubulina acetilada (T7451-100UL, Sigma-Aldrich), em uma proporção de 1:150, por 1 hora. A seguir, as amostras foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário ligado a fluorocromos (A11030, Invitrogen Molecular Probes), em uma proporção de 1:400, por 45 minutos. Posterior a isto, as células foram incubadas com DAPI, a uma proporção de 1:800, por 5 minutos para marcação de material genético presente em seu interior. Este protocolo de imunofluorescência permite a visualização da tubulina do citoesqueleto das células tratadas comparadas às células controle, como também a posição do endossimbionte e de organelas que contêm DNA (núcleo e cinetoplasto). Para finalizar, as lâminas com as amostras foram montadas com Prolong Gold e guardadas em freezer para assegurar a manutenção da fluorescência nas células até a observação, feita no microscópio Zeiss Axiobserver.

As amostras obtidas com este protocolo foram utilizadas também para quantificar os padrões celulares e verificar a capacidade da TSA de promover alterações no processo de divisão celular do tripanosomatídeos e de seu endossimbionte.

4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a Microscopia Eletrônica de Varredura, assim como para a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), os protozoários foram repicados e o experimento foi

lançado como que para uma viabilidade celular. Em seguida, alíquotas de 1 mL foram retiradas para processamento nos tempos de 48 e 60 horas de tratamento.

As células controle e tratadas passaram por um processo de fixação em glutaraldeído 2,5% por 1h. Após este processo, lamínulas foram revestidas com Poli-L-lisina por 10 minutos. A Poli-L-lisina ajuda na aderência das células à lamínula. As células foram lavadas em tampão cacodilato 0,1M por duas vezes e finalmente aderidas às lamínulas preparadas. Essas lamínulas foram então transferidas para uma placa de 24 poços e passaram pelo processo de pós-fixação com tetróxido de ósmio a 1% e ferrocianeto de potássio a 1,25% (OsO_4 e $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, respectivamente) em uma mistura 1:1, por 30 minutos. Após quatro lavagens em cacodilato 0,1M por 5 minutos cada, as amostras foram desidratadas em etanol. A desidratação se deu em baterias de 10 minutos, começando por etanol 30% até etanol 100%, este último ocorrendo duas vezes. Por fim, foi realizado o procedimento de secagem das amostras, que consiste na retirada do etanol presente nas mesmas e sua substituição por CO_2 líquido (CO_2 este que mais tarde se torna CO_2 gasoso), sem que ocorra mudança de fase durante a mudança dos líquidos e consequente modificação das estruturas celulares das amostras (UESC, 2014). Após a secagem, as amostras foram então colocadas em stubs e metalizadas com ouro para possibilitar a visualização ao microscópio Fei Quanta X50.

As imagens geradas por MEV foram utilizadas para realizar medições do comprimento e da largura do corpo celular, além do comprimento do flagelo, usando o software Fiji. Foram medidas 64 células em cada condição.

4.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para a Microscopia Eletrônica de Transmissão, como mencionado no tópico de MEV, as células controle e tratadas foram fixadas em glutaraldeído 2,5% diluído em tampão cacodilato 0,1M por 1 hora e pós-fixada com OsO_4 1% e $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 1,25%, em uma mistura 1:1. Posterior a isto, as amostras foram desidratadas, desta vez com acetona, a partir de acetona 50% até acetona 100%, mantendo a amostra 10 minutos em cada etapa e realizando esta última duas vezes. Para a infiltração, foi utilizada uma mistura de 1:1 de acetona 100% e epon, deixando as amostras overnight, enquanto que na inclusão, etapa posterior à infiltração, foi retirada a mistura acetona 100%-epon e substituída por epon 100% por no mínimo 5 e no máximo 6 horas.

Após essas etapas, as amostras já estavam completamente incluídas, com toda a água substituída pela resina epon, e puderam finalmente ser emblocadas. Para o emblocamento,

essas amostras foram transferidas para a forma de silicone e aquecidas em estufa a 60°C por 48 horas para que o epon se polimerizasse e formasse blocos firmes.

Os blocos prontos passaram então pelos processos de trimagem e piramidagem para posteriormente serem cortados. Após serem feitos os cortes, as grades os contendo foram contrastadas para facilitar a visualização ao microscópio. A contrastação se deu com acetato de uranila a 5% por até 45 minutos, com posterior lavagem com água destilada, e citrato de chumbo por 5 minutos. Após o processamento, o material pôde ser analisado em microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1200 ou Zeis 900.

4.7 Contrastação Negativa

Para a contrastação negativa, grades utilizadas em MET (de 300 ou 400 mesh) foram preparadas com uma película de FormVar e um Glow Charge do metalizador. *A. deanei* controle e as tratadas com o inibidor foram centrifugadas a 6.000 rpm por 3 minutos para a separação de pellet e sobrenadante. Parte deste sobrenadante foi retirada e as células do pellet foram ressuspensas no sobrenadante restante, resultando em uma suspensão celular com turbidez adequada. Essa suspensão celular foi colocada sobre as grades preparadas (8 µL) por 5 minutos para que as células pudessem se aderir à superfície da película de FormVar. Posterior à adesão, 100 µL de Np40 (1% em PBS) foram adicionados à grade por 10 minutos para que a extração da membrana celular ocorresse. Após esta extração, as células foram fixadas em 100 µL de solução de glutaraldeído 2,5% por 10 minutos e em seguida lavadas em PBS. As grades foram então contrastadas com solução Aurotioglicose (1%) e analisadas ao microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1200 ou Zeis 900 em até dois dias.

4.8 Citometria de Fluxo para Ciclo Celular

Para a análise do ciclo celular, foi realizada a citometria de fluxo com o marcador Sytox Green. As células controle e as tratadas foram centrifugadas a 3.000 rpm por 5 minutos para a separação de pellet e sobrenadante. Parte deste sobrenadante foi retirada e as células do pellet foram ressuspensas no sobrenadante restante, resultando em uma suspensão celular com turbidez adequada. A esta suspensão celular, foi adicionado 1 mL de paraformaldeído (0,25% em PBS), a temperatura ambiente, por 5 minutos. Após este tempo, as células foram centrifugadas a 3.000 rpm por 5 minutos e ressuspensas em 200 µL de PBS, e estes 200 µL de suspensão celular foram transferidos para tubos Falcon previamente gelados. Com o fundo dos tubos Falcon apoiados sobre vórtex em velocidade baixa, foram

adicionados, gota a gota, 2 mL de etanol gelado às amostras. Essas amostras foram, então, incubadas em gelo por 30 minutos.

Após este período, as células foram centrifugadas mais uma vez a 3.000 rpm por 10 minutos e ressuspensas em 600 μL de PBS. Foi adicionado então Sytox Green 5 μM a esses 600 μL de suspensão celular e as amostras foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente protegidas da luz. Após o tempo de incubação, as amostras foram lidas em Citômetro de Fluxo BD Accuri C6, em FSC-A e FL1-A. Foram realizados três ensaios para se obter um n mínimo.

5 RESULTADOS

5.1 Curva de Crescimento

Para avaliar a proliferação do protozoário frente às diferentes doses do inibidor TSA, as curvas de crescimento foram realizadas por até 72 horas, como mostrado no gráfico 1.

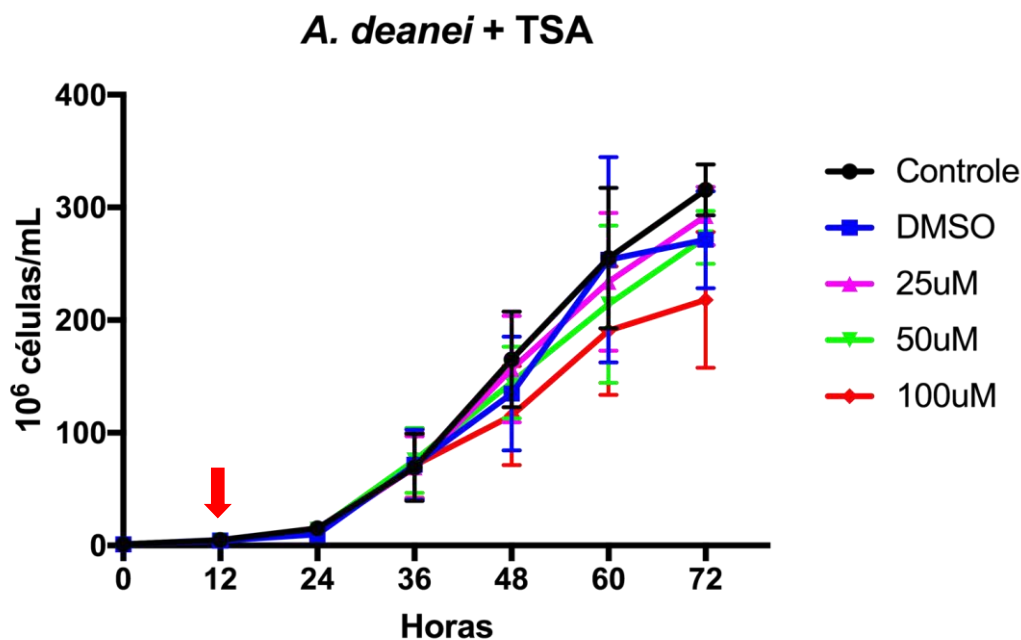


Gráfico 1: Curva de crescimento de *A. deanei*. Foram utilizadas células controle, controle com veículo da droga (DMSO) e tratadas com 25 μM , 50 μM e 100 μM de TSA. A seta vermelha indica o momento da adição do inibidor nas amostras, após 12 horas de crescimento. O gráfico representa a média e o desvio padrão de três curvas ($n = 3$).

É possível observar um efeito concentração-dependente na proliferação do tripanosomatídeo. Ou seja, quanto maior a dose de TSA utilizada, menor a proliferação do mesmo. Tal efeito se mostrou mais acentuado a partir de 36 horas de tratamento (48 horas de crescimento), atingindo uma maior diferença no tempo máximo de tratamento testado, de 60 horas. Neste tempo máximo, os protozoários tratados com 25 μM e 50 μM de TSA tiveram proliferação próxima à dos protozoários controle, com valor aproximado de 300×10^6 células/mL. Já os protozoários tratados com 100 μM de TSA tiveram proliferação mais reduzida, e equivalente a 200×10^6 células/mL aproximadamente.

A partir deste gráfico, foi calculado o IC_{50} da Tricostatina A para *A. deanei*, ou seja, a concentração do composto capaz de inibir a proliferação do protozoário em 50%. O valor obtido se apresentou maior que 100 μM , visto que esta concentração da droga foi capaz de inibir a proliferação em apenas 47% das células. Este trabalho pretende analisar os efeitos de um inibidor de desacetilase na relação entre protozoário hospedeiro e endossimbionte, logo ele não apresenta um viés quimioterápico. Assim, não foram testadas concentrações maiores do inibidor para o cálculo exato do IC_{50} .

5.2 Viabilidade Celular

Para avaliar a viabilidade celular dos tripanosomatídeos frente as doses do inibidor testadas, o método MTS/PMS foi utilizado e os resultados estão apresentados no gráfico 2.

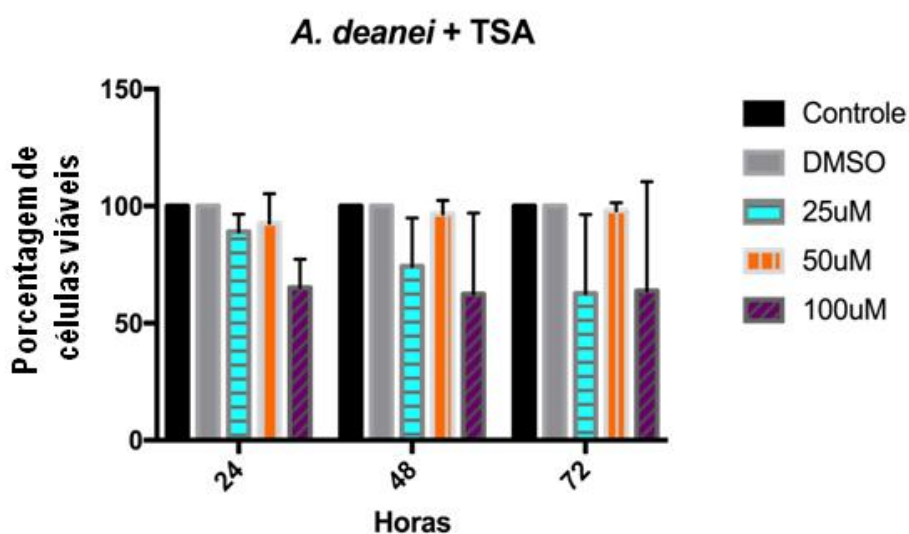


Gráfico 2: Viabilidade celular de *A. deanei* após 24, 48 e 72 horas de tratamento com a TSA. O gráfico representa a média e o desvio padrão de três testes de viabilidade ($n = 3$).

Conforme mostrado, pode-se afirmar que a viabilidade celular a nível mitocondrial não é afetada ao longo dos tempos de tratamento. Nas primeiras 24 horas, há uma maior queda na viabilidade dos protozoários após o uso da concentração mais elevada do inibidor (100 μM), porém esse valor decai após 48 e 72 horas de tratamento. Vale ressaltar que todos os experimentos realizados, e que são apresentados a seguir, foram feitos com parasitas metabolicamente viáveis.

5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Através da MEV, é possível observar que os parasitas na situação controle possuem uma morfologia piriforme típica dos tripanosomatídeos coanomastigotas. Quando comparados a estes parasitas não tratados, os protozoários tratados apresentaram uma alteração em sua morfologia, principalmente na parte posterior, onde ocorre um achatamento do corpo celular, e um encurtamento do flagelo, a partir de 48 horas de tratamento (figura 9 - B e C). Essas alterações são mais frequentes quando as doses do inibidor aumentam (figura 9 - B e C). Este achatamento do corpo celular provoca uma diminuição no seu comprimento e na sua largura de 12,5% e 1,8%, respectivamente, em relação ao comprimento dos protozoários controle. Mais expressivamente, o comprimento do flagelo dos tripanosomatídeos tratados apresenta um valor médio de 0,5 μm contra aproximadamente 2,5 μm dos parasitas controle, o que representa uma redução de 80,5% – Tabela 1.

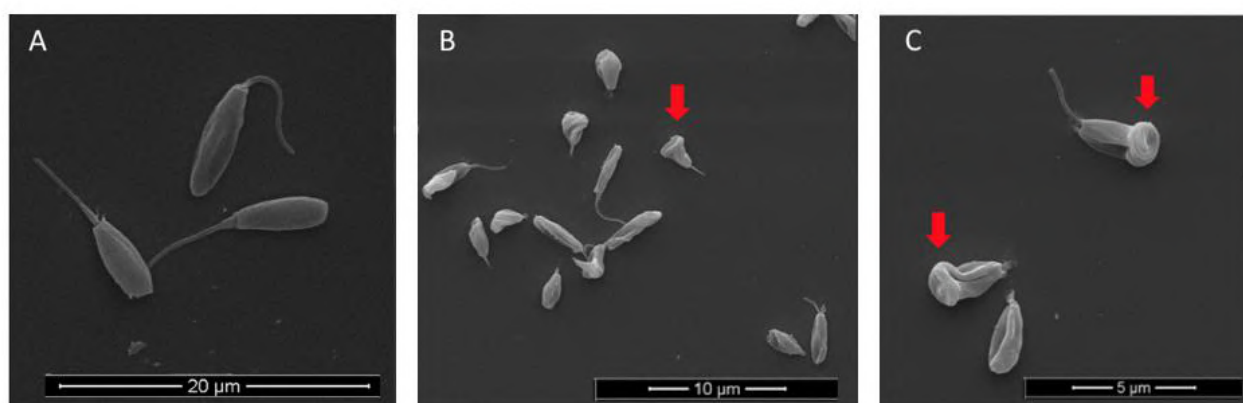


Figura 9: Imagens de *A. deanei* controle e de células tratadas com TSA por 48 horas. (A) Protozoários controle; (B-C) Parasitas tratados com 50 μM e 100 μM do inibidor, respectivamente. As setas vermelhas indicam as alterações ultraestruturais apresentadas pelos tripanosomatídeos na sua região posterior.

Tabela 1: Dimensões celulares de protozoários tratados com 100 μM TSA por 48 horas comparados ao grupo controle.

Tamanhos Celulares			
	Comprimento Corpo Celular	Largura Corpo Celular	Flagelo
Controle	4,5 μm	1,75 μm	2,56 μm
TSA 100 μM	3,94 μm	1,72 μm	0,5 μm

5.4 Contrastação Negativa

Pela contrastação negativa, nota-se que nas células controle o arranjo de microtúbulos do citoesqueleto de *A. deanei* forma uma malha complexa, em forma de treliça, por todo o corpo celular do protozoário. Tanto na parte anterior como na parte posterior, os microtúbulos subpeliculares correm em paralelo e se cruzam em pontos de distância frequente, de forma a haver um espaçamento regular entre eles (figura 10). No entanto, nos parasitas tratados por 36 horas com 100 μM de TSA, é possível observar um aumento do espaço entre os microtúbulos na região anterior do corpo celular, assim como uma abertura, ou mesmo perda, dos microtúbulos na parte posterior do parasita (figura 11).

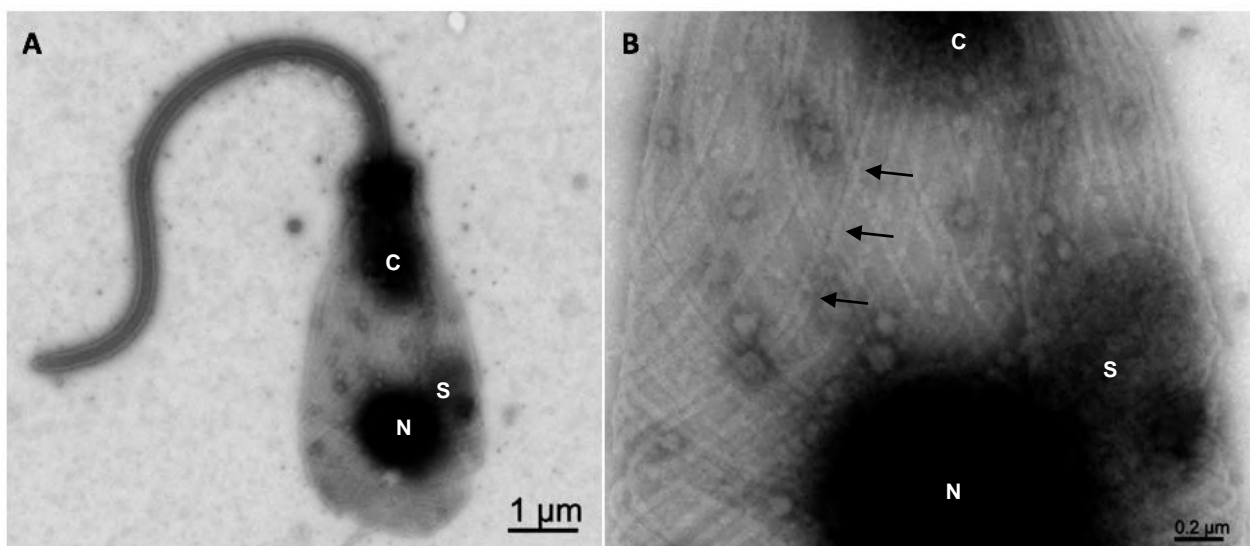


Figura 10: Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de *A. deanei* controle com membrana celular extraída após a realização do método de contrastação negativa. (A) Parasita com forma coanomastigota típica. Nota-se o simbionte (S) bem próximo ao núcleo (N) e o cinetoplasto (C) na região anterior do corpo celular. (B) Imagem evidenciando o arranjo de microtúbulos em treliça. Nota-se que os pontos de cruzamento dos microtúbulos apresentam regularidade (setas pretas).

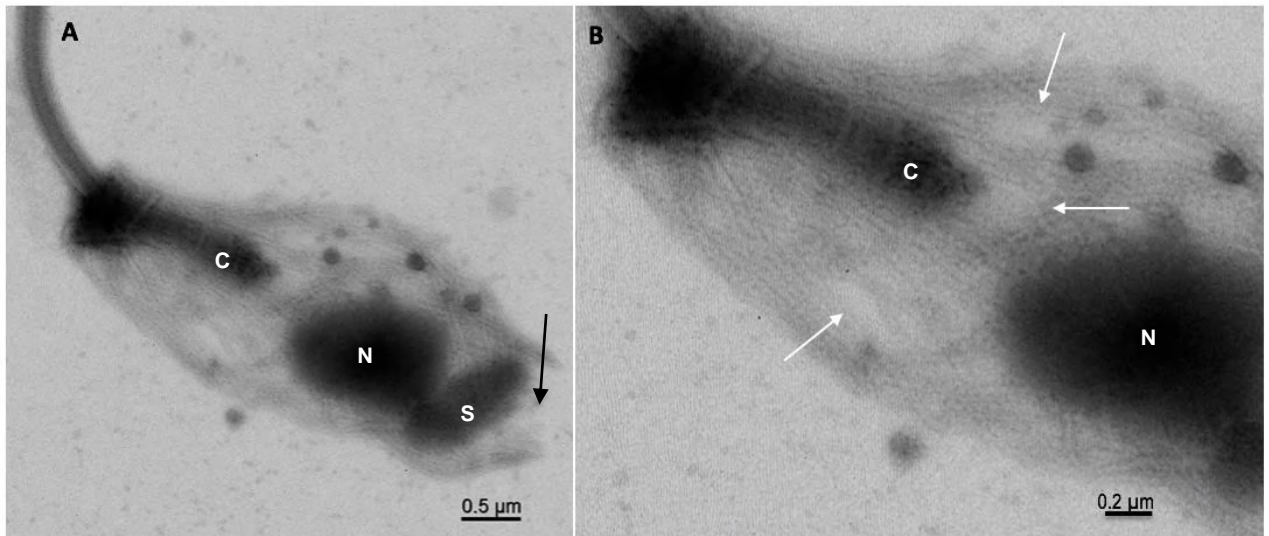


Figura 11: Imagens de MET de *A. deanei* tratada com TSA por 36 horas após a aplicação da técnica de contrastação negativa. (A) O parasita mantém a forma coanomastigota, mas a sua superfície se mostra irregular. A região posterior está aberta (seta preta), indicando a perda de microtúbulos. (B) Imagem evidenciando áreas do corpo celular que apresentam um maior espaçamento entre os microtúbulos (setas brancas).

5.5 Imunofluorescência

O uso de anticorpos que reconhecem tubulina acetilada mostra uma maior fluorescência na parte anterior do corpo celular dos tripanosomatídeos tratados com 100 μM de TSA por 36 horas quando comparados ao controle. Já as imagens obtidas com o DAPI indicam que o endossimbionte não sofreu alteração de formato ou de posicionamento após o tratamento (figura 12).

Já os protozoários tratados com 100 μM de TSA por 60 horas não apresentam diferença na marcação de fluorescência usando o anticorpo anti-tubulina acetilada, quando comparamos as regiões anterior e posterior do corpo celular. Não foi observada diferença na intensidade de fluorescência entre os protozoários tratados e os do grupo controle. Entretanto, é possível observar tripanosomatídeos tratados apresentando padrões celulares alterados (figura 13). Nas figuras 14 e 15 é possível observar mais claramente estes padrões atípicos, como protozoários contendo um núcleo, um cinetoplasto e um simbiote com três nucleoides ou ainda contendo dois simbioses com posicionamento incorreto em relação ao núcleo.

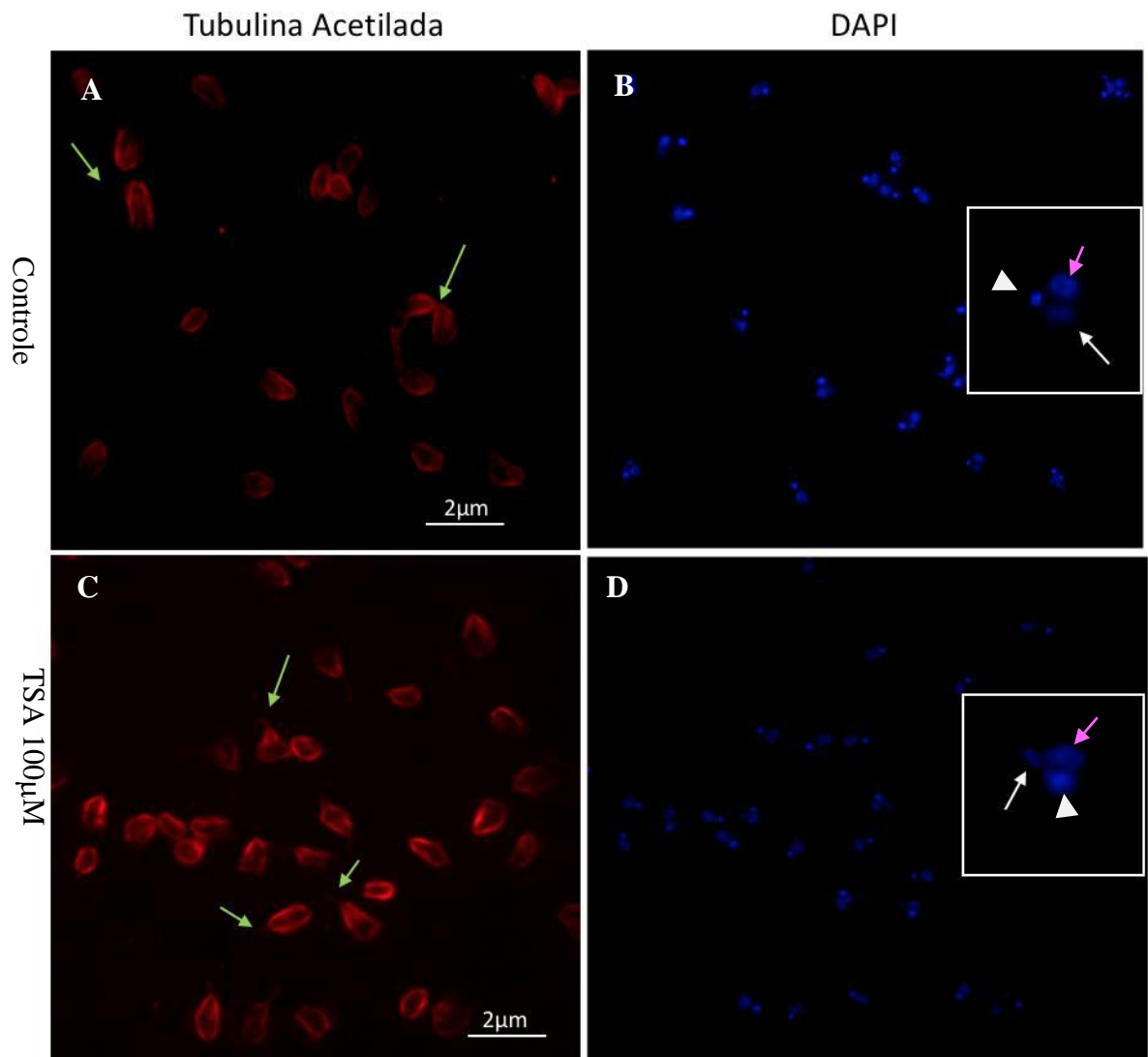


Figura 12: Imagens de Imunofluorescência de *A. deanei* controle (A e C) e tratada com TSA por 36 horas (B e D). (A e C) A região anterior é aquela de onde emerge o flagelo (setas verdes). Células marcadas com anticorpo anti-tubulina acetilada: nota-se marcação mais intensa na região anterior dos parasitas. (B e D) O uso do DAPI, um agente intercalante de DNA, mostra o simbionte (setas brancas) próximo ao núcleo. As setas rosas indicam o núcleo e as cabeças de seta os cinetoplasto.

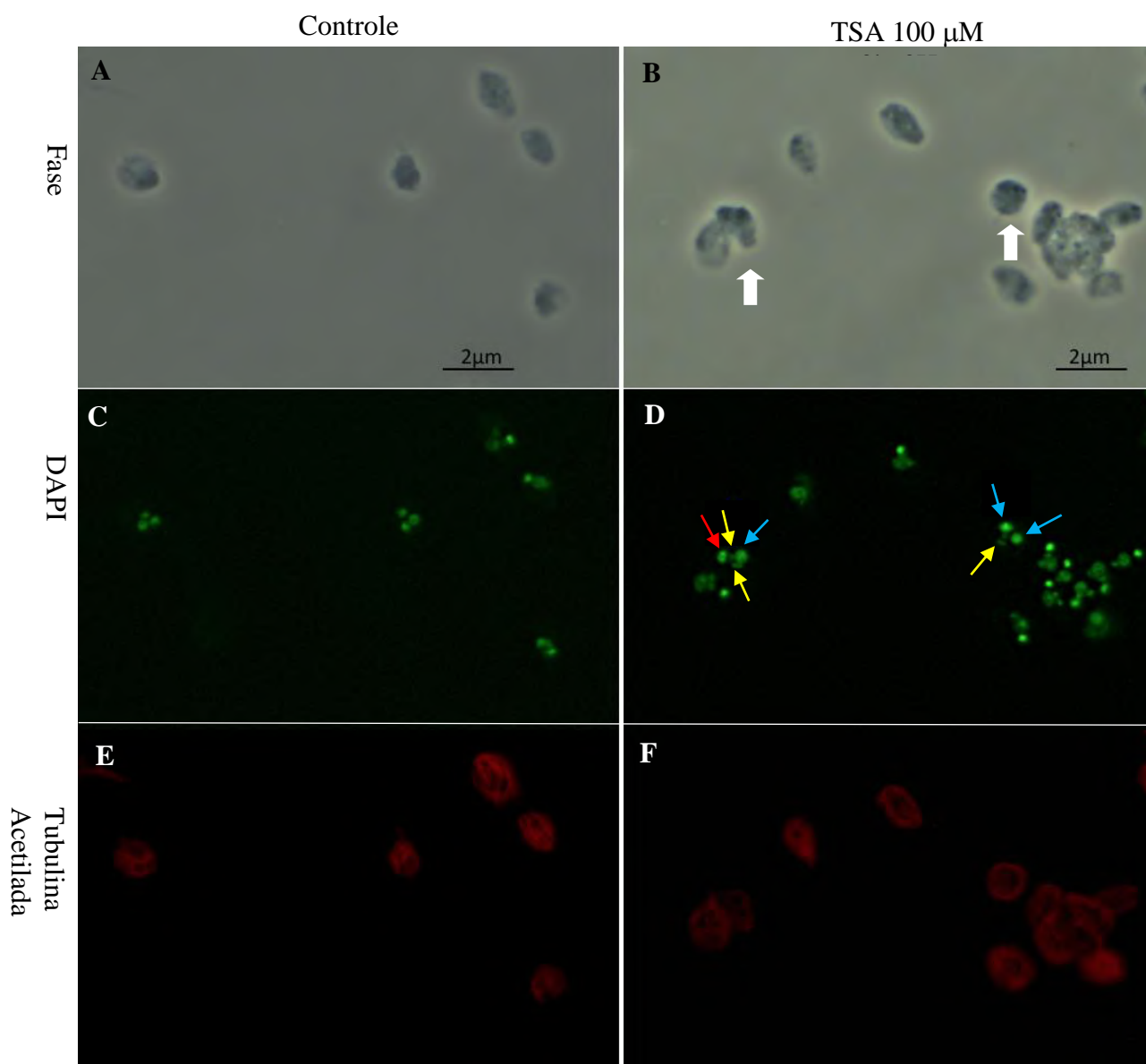


Figura 13: Imagens de Imunofluorescência de *A. deanei* controle (A, C e E) e tratada com TSA por 60 horas (B, D e F). (A-B) microscopia de contraste de fase, (C-D) células marcadas com DAPI e (E-F) protozoários marcados com o anticorpo anti-tubulina acetilada. Em B, as setas brancas indicam protozoários com padrões celulares alterados. Em D, é possível observar células com um cinetoplasto (seta vermelha), um núcleo (seta azul) e um simbionte com 3 nucleoides (setas amarelas).

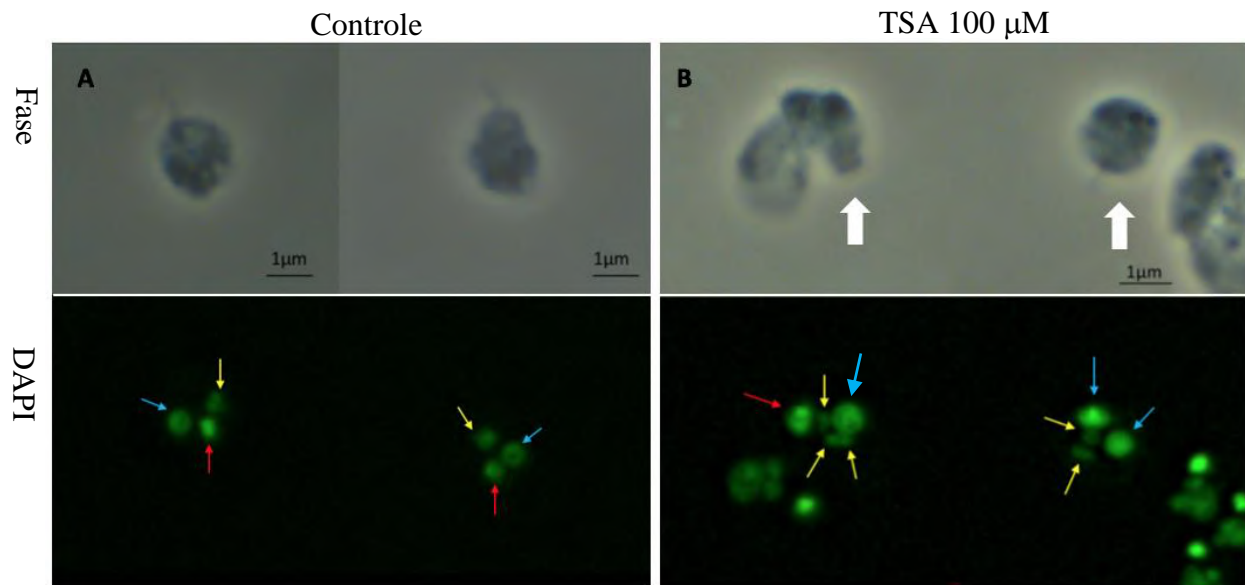


Figura 14: Maior aumento das imagens A, B, C e D da Figura 13. Quando comparadas ao controle (painel A), células tratadas com 100 μM de TSA por 60 horas (painel B), mostram padrões celulares atípicos quando observadas por microscopia óptica de fluorescência. As setas vermelhas indicam os cinetoplastos, as setas azuis indicam os núcleos e as setas amarelas apontam os nucleoides dos endossimbiontes. No painel B, as setas brancas indicam protozoários com padrões celulares atípicos em fase, e é possível observar protozoários contendo um simbionte com três nucleoides (célula da esquerda) ou dois simbiontes com posicionamento incorreto em relação ao núcleo (célula da direita).

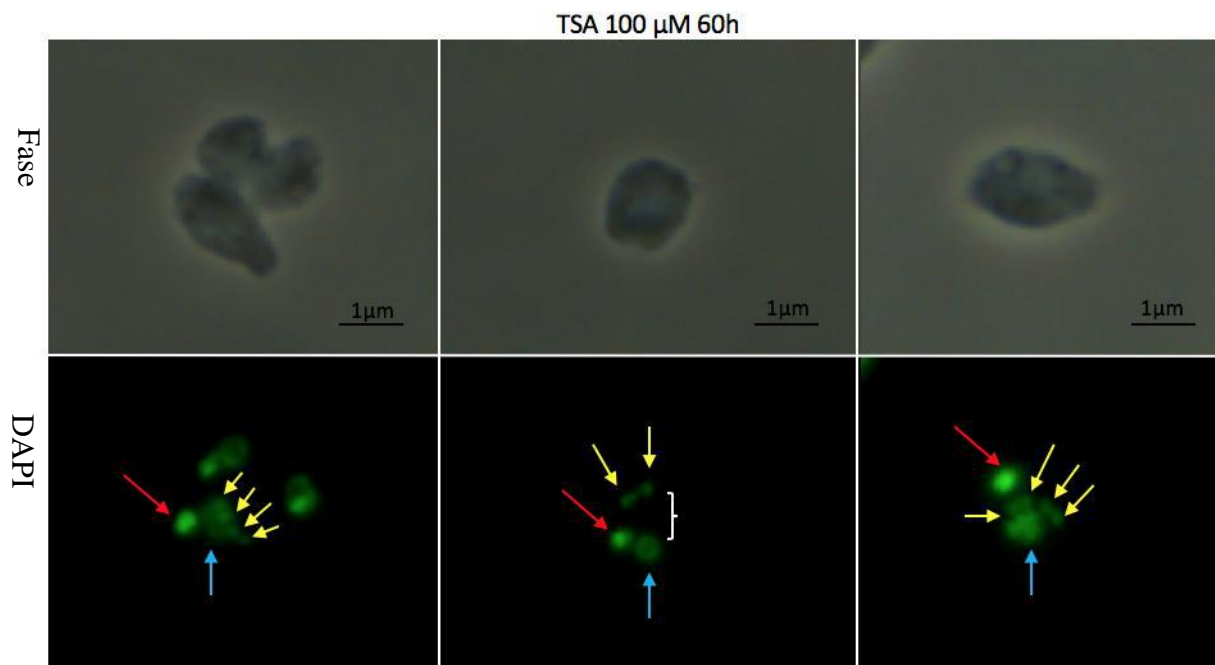


Figura 15: *A. deanei* tratada com TSA 100 μM por 60 horas. Assim como na figura 14, células tratadas apresentaram padrões atípicos. As setas vermelhas indicam os cinetoplastos, as setas azuis indicam os núcleos e as setas amarelas apontam os nucleoides dos endossimbionte. A chave indica uma maior distância entre simbiontes e núcleo.

As imagens obtidas por microscopia óptica de fluorescência foram utilizadas para a contagem dos padrões celulares de tripanosomatídeos, comparando os protozoários tratados com 100 μM por 60 horas com os protozoários do grupo controle (gráfico 3). No controle o percentual de protozoários com 1 simbiote, 1 núcleo e 1 cinetoplasto (1S1N1C), que representa células na fase G1, é de 65%. Já nas células tratadas este percentual cai para 40%. Já o percentual de células com 2 simbiotes, 1 núcleo e 1 cinetoplasto (2S1N1C) é de aproximadamente 35% no controle e aumenta para quase 55% nos protozoários tratados. Além disso, após o tratamento com TSA foi observado o surgimento de padrões atípicos como tripanosomatídeos apresentando 2 simbiotes, cada qual com 2 nucleoides, 1 núcleo e 1 cinetoplasto ($2\infty\text{S1N1C}$) em um percentual de 5%. Mais raramente foi encontrado também em protozoários tratados o padrão celular de 2 simbiotes, 2 núcleos e 1 cinetoplasto (2S2N1C) – gráfico 3. Juntos, estes dados indicam que o processo de divisão do simbiote foi alterado.

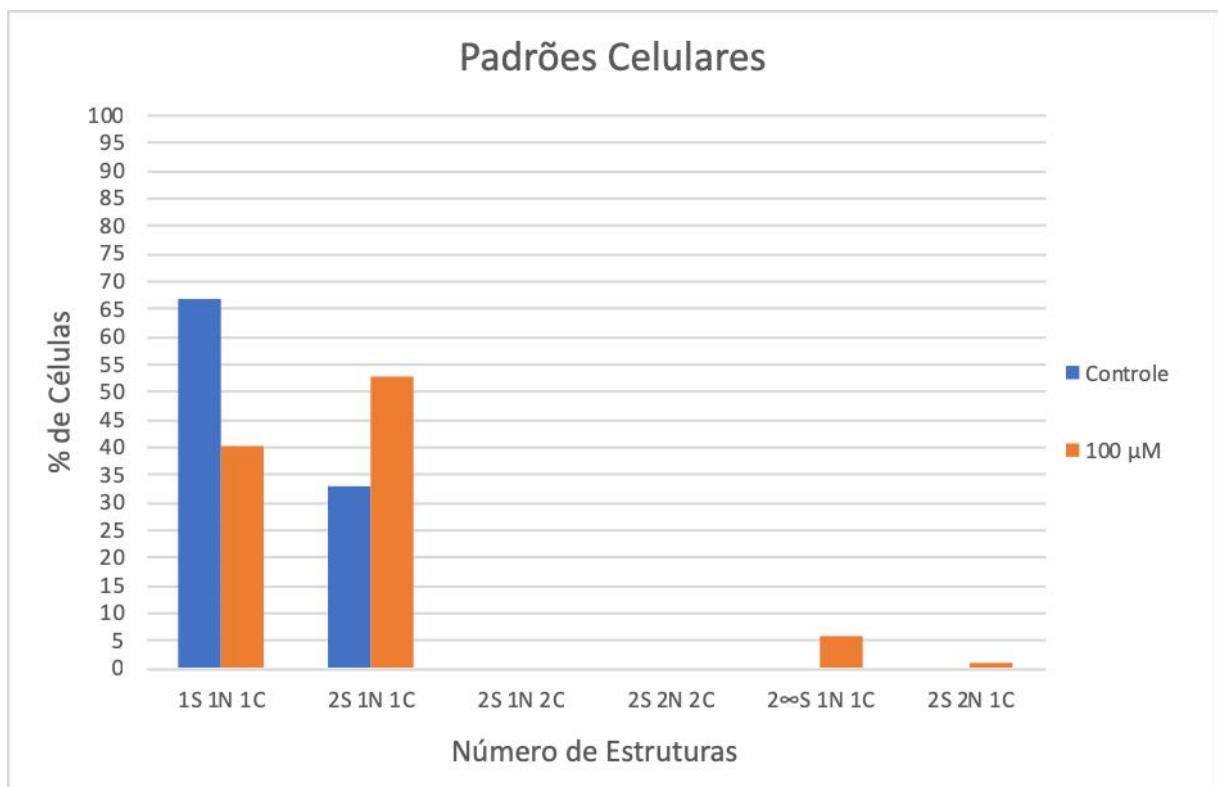


Gráfico 3: Contagem dos padrões celulares de *A. deanei* controle e tratada com TSA 100 μM por 60 horas. Estruturas principais como simbiote (S), núcleo (N) e cinetoplasto (C) foram contadas. O símbolo ∞ representa o simbiote com dois nucleoides, porém não-segregado.

5.6 Citometria de Fluxo para Ciclo Celular

Considerando os resultados obtidos após a contagem dos padrões celulares, resolveu-se verificar possíveis alterações no ciclo celular de protozoários tratados com TSA. Em parasitas controle, o histograma obtido por citometria de fluxo apresenta um padrão típico com um primeiro pico maior (fase G1), um vale (fase S) e o segundo pico menor (fase G2). Nas células incubadas com 100 μM de TSA por até 60 horas observamos um acúmulo progressivo das células em G1 na medida em que avança o tempo de tratamento, indicando parada de ciclo celular – Gráfico 4.

Em 60 horas, observou-se que a amostra controle apresentava 78,8% de suas células em G1, 5,2% em S e 16% em G2. Com o tratamento de 100 μM , ficou evidenciado apenas um pico no histograma, indicando que 100% dos protozoários da amostra se encontravam em G1/S – Gráfico 5.

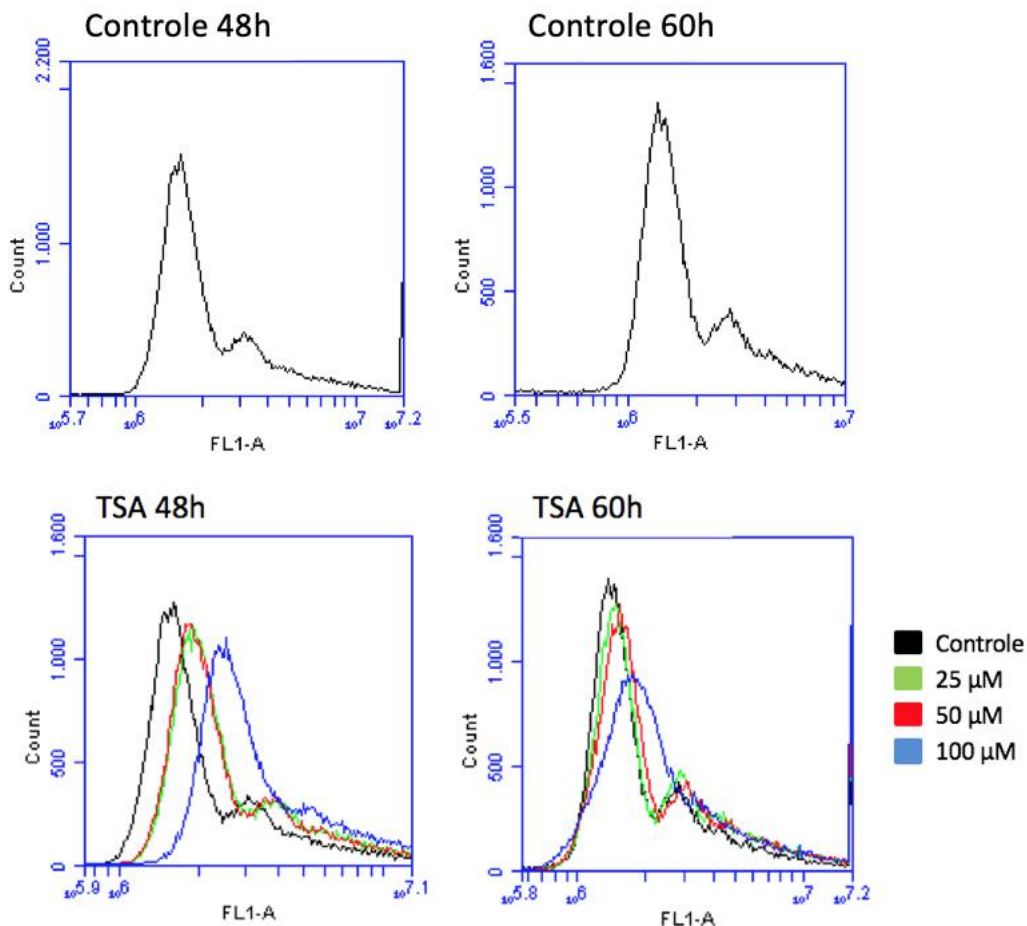


Gráfico 4: Análise do ciclo celular de *A. deanei*, protozoários controle e tratados. As células foram submetidas a diferentes concentrações de TSA e avaliadas através da citometria de fluxo por até 60 horas. No histograma, a linha preta representa os parasitas controle, enquanto as linhas verde, vermelha e azul representam os parasitas tratados com 25 μM , 50 μM e 100 μM do inibidor, respectivamente.

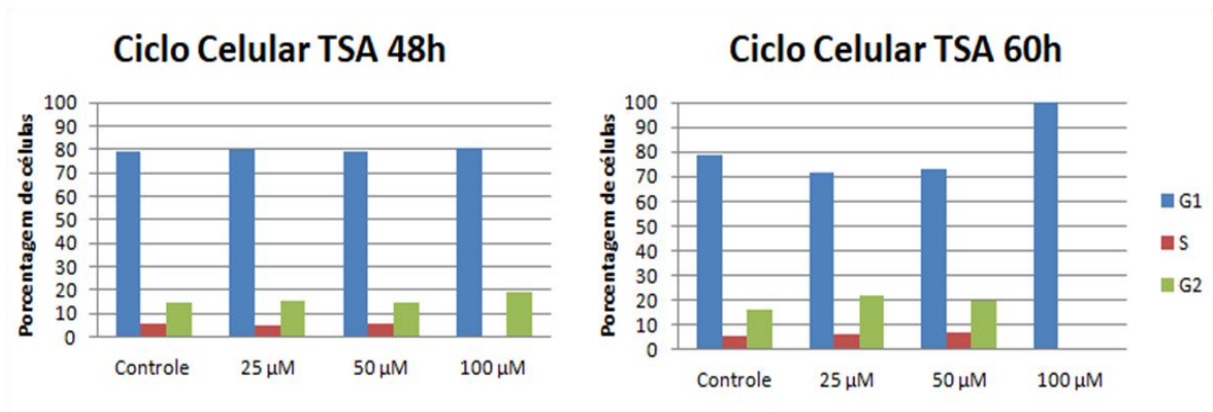


Gráfico 5: Porcentagem de células nas diferentes fases do ciclo celular comparando as células controle com as tratadas com TSA por até 60 horas. As barras azuis representam os protozoários em G1, enquanto que as barras laranja e verde representam, respectivamente, os protozoários que se encontram em S e em G2.

5.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

O próximo passo foi então, verificar se o tratamento com a TSA induziu alterações ultraestruturais em *A. deanei* e seu endossimbionte. Em *A. deanei* selvagem (controle) o endossimbionte está normalmente localizado próximo ao núcleo. Nas células tratadas há indícios de que a bactéria simbiótica se torna mais alongada (Figura 16 – C e D) quando comparados aos parasitas controle (Figura 16 – A e B). Ademais, é possível observar também uma maior eletrólucência na matriz do simbionte e a presença de vacúolos próximos a ele. Não foram observadas alterações ultraestruturais em outras organelas, tampouco alterações no arranjo de DNA tanto do cinetoplasto como do núcleo, que poderia apresentar uma maior descompactação da cromatina.

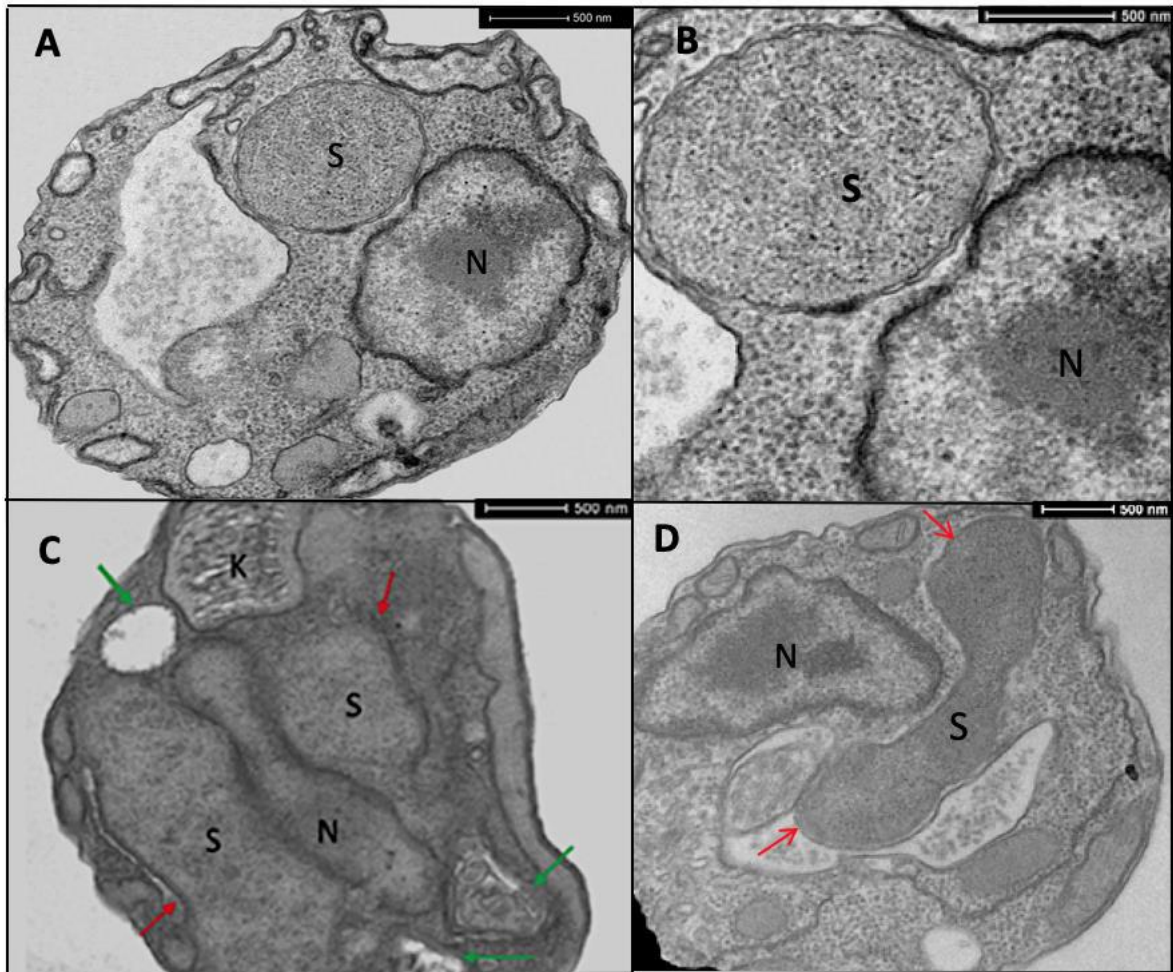


Figura 16: Ultraestrutura celular de *A. deanei* controle e tratada com TSA por 60 horas. (A) Parasitas não tratados; (B) Maior aumento evidenciando o endossimbionte com seu envoltório composto por duas membranas. (C-D) Parasitas tratados, respectivamente, com 50 μ M e 100 μ M do inibidor. As setas vermelhas indicam as extremidades dos endossimbiontes e a setas verdes aponta a presença de vacúolos.

6 DISCUSSÃO

Inibidores de histonas desacetilase, como o TSA, vêm sendo utilizados em estudos quimioterápicos contra o câncer e algumas parasitoses (Ehrenkauf et al., 2007; Song et al., 2017; Damaskos et al., 2017; Garmpis et al., 2017; Song et al., 2018). Neste trabalho, tais inibidores foram usados com o objetivo de perturbar a relação simbiótica mutualística entre a bactéria e o tripanosomatídeo hospedeiro. Como reportado por Catta-Preta et al (2015), sabe-se que nestes protozoários a divisão do simbionte é microtúbulo dependente e há indícios de que a TSA é capaz de afetar o citoesqueleto de tripanosomatídeos, como relatado pelo nosso grupo em *Trypanosoma cruzi* (Santos et al., 2018). Esta é a primeira vez que um inibidor de

histonas desacetilases é utilizado em um tripanosomatídeo monoxênico e com a finalidade de entender um processo evolutivo, como a manutenção da simbiose nesta família.

Com os resultados apresentados neste trabalho, é possível inferir que, em relação à proliferação, a inibição de *A. deanei* quando tratada com a maior dose de TSA era esperada. Isto porque, sabe-se através de estudos prévios, que este inibidor é capaz de diminuir não só a proliferação celular, mas também induzir a parada de ciclo celular e a apoptose em células eucarióticas (National Center for Biotechnology Information, 2005; Song et al., 2018). Nos estudos feitos previamente com *T. cruzi*, em sua forma epimastigota, a TSA causou inibição na proliferação de forma dose-dependente, nas concentrações de 1, 5, 10, 50 e 100 μM (Santos et al., 2018), diferentemente do ocorrido com *A. deanei*, quando a queda no crescimento foi observada apenas a partir do uso de 25 μM do inibidor.

É importante mencionar que, quando usada como agente antitumoral, a TSA causa efeitos inibitórios já com doses a níveis de nanomolar. Em estudos realizados com Câncer de Mama Triplo Negativo (CMTN), um tipo de câncer de mama agressivo e resistente aos tratamentos convencionais, a TSA causou inibição de proliferação de maneira dose-dependente na concentração de 500 nM (0,5 μM) (Song et al., 2018). No caso de *A. deanei*, como também no de *T. cruzi*, o inibidor se mostrou eficiente apenas em doses a níveis de μM , o que indica uma maior resistência deste tripanosomatídeo monoxênico. Essa resistência pode estar relacionada ao fato dos microtúbulos subpeliculares apresentarem um arranjo diferenciado nestes protozoários, do tipo "malha ou treliça", como visto por contrastação negativa.

A TSA não afetou de forma expressiva a viabilidade de *A. deanei* a nível mitocondrial, inclusive quando doses mais altas foram utilizadas. Em estudos com *Trichomonas vaginalis*, protozoário causador da tricomoníase, ficou evidenciado que o tratamento com TSA, na dose de 1 μM por até 4 horas, não foi capaz de alterar a viabilidade celular ou induzir a apoptose. Isto indica que nestes protozoários patogênicos, as alterações celulares não foram causadas por toxicidade ou morte parasitária (Song et al., 2017). Já em *T. cruzi*, a viabilidade celular se mostrou afetada de forma mais expressiva quando a dose mais elevada do inibidor foi utilizada por maior tempo de tratamento (100 μM por 72 horas) (Santos et al., 2018).

Pelas imagens de MEV obtidas, foi possível inferir que, em *A. deanei*, a TSA causou efeito expressivo na ultraestrutura do protozoário, principalmente na parte posterior do corpo celular, que se mostrou mais achatada e torcida, e que representa a região mais dinâmica e

mais instável do citoesqueleto. O flagelo dos protozoários tratados apresentou grande redução de comprimento quando comparado ao do grupo controle. Juntos, estes dados sugerem fortemente que a TSA é capaz de remodelar o citoesqueleto de microtúbulos deste protozoário. A mudança estrutural do corpo celular foi observada anteriormente em *T. cruzi*, onde o uso da TSA originou células com um espaçamento irregular dos microtúbulos subpeliculares, além de gerar uma torção da extremidade posterior (Santos et al., 2018). Em estudo sobre a função da acetilação em microtúbulos, ficou evidenciado que a introdução de radicais acetil nestes filamentos os tornam mais maleáveis e resistentes à quebra (Xu et al., 2017). No presente estudo, pode-se deduzir que a inibição da retirada de radicais acetil da tubulina pela TSA, em maiores tempos de tratamento, causa uma maior maleabilidade dos microtúbulos subpeliculares, principalmente na parte posterior de *A. deanei*. Deste modo, estes filamentos se tornariam mais suscetíveis à dobras, ocasionando achatamento e torções celulares.

Corroborando com este resultado, o método de contrastação negativa evidencia que o citoesqueleto de *A. deanei* apresenta arranjo diferente daquele observado em outros tripanosomatídeos, como *T. brucei* e *T. cruzi*. Nestes tripanosomatídeos patogênicos, os microtúbulos subpeliculares estão distribuídos paralelamente ao longo do eixo antero-posterior, enquanto que em *A. deanei* estes filamentos se cruzam de modo regular ao longo de todo o corpo celular. Apesar disso, a utilização da TSA provocou uma desordem nos microtúbulos do protozoário, que se mostraram mais afastados em alguns pontos da região anterior e rompidos em determinadas áreas da região posterior. Em *T. cruzi*, a contrastação negativa também revelou que o tratamento com TSA em doses mais altas provoca um desarranjo dos microtúbulos e uma desorganização do citoesqueleto na parte posterior do protozoário, culminando por vezes com o rompimento desta região da célula (Santos et al., 2018).

Com os dados obtidos por imunofluorescência, pode-se sugerir que a marcação mais intensa para tubulina acetilada, observada na parte anterior dos parasitas tratados com TSA por 36 horas, está diretamente relacionada à inibição da desacetilação dos microtúbulos. Sabe-se que a acetilação de microtúbulos se inicia pelas suas extremidades, em α -tubulina polimerizada (Janke e Montagnac, 2017). Nestes tripanosomatídeos os centros organizadores de microtúbulos, como o corpo basal, se encontram nesta parte anterior da célula e que, por ser uma região menos dinâmica e mais especializada onde a divisão celular e a polimerização se iniciam, se mostrou mais susceptível à inibição de desacetilação pela TSA em primeiro momento. Já com 48 horas de tratamento, a acetilação dos microtúbulos ocorreu de forma

mais difusa e homogênea por todo o corpo celular, inclusive na parte posterior, a qual é mais dinâmica quanto a polimerização dos microtúbulos. Além disso, os dados adquiridos por imunofluorescência também revelaram que alguns parasitas não conseguiram completar a segregação do seu endossimbionte e/ou completar o seu ciclo celular, ou seja, a divisão do simbionte e a citocinese completa do protozoário hospedeiro foram impedidas pela utilização da TSA. Considerando que os microtúbulos estão intimamente relacionados ao tráfego intracelular de organelas e à divisão celular, a inibição da retirada de radicais acetil os deixam menos dinâmicos, além de mais maleáveis, o que poderia afetar a citocinese e gerar padrões celulares atípicos, como os aqui observados. Foi evidenciada, por exemplo, a não-segregação da bactéria simbiótica: 6% das células apresentaram dois simbiontes no formato de constrição e apenas um núcleo e um cinetoplasto. Além disso, foram observadas bactérias com o posicionamento alterado em relação ao núcleo. O surgimento destes padrões celulares corrobora com os resultados de ciclo celular mencionados mais à frente. Em *T. cruzi*, a TSA também causou falha na citocinese, causando o aparecimento de protozoários polinucleados (Santos et al. 2018).

Neste trabalho, os ensaios de ciclo celular mostraram o acúmulo de *A. deanei* em G1 após o tratamento com TSA, tal como previamente descrito na literatura para outros modelos biológicos (Kim et al., 2000; Song et al., 2018). Este acúmulo ocorreu principalmente com o uso da dose mais alta do inibidor por um tempo mais prolongado. Como a parada de ciclo celular em *A. deanei* se deu em G1/S, há a ocorrência de um maior número de células com dois simbiontes, e cujos cinetoplastos e núcleos não se encontram divididos (2S1C1N), visto que a divisão destas duas últimas estruturas ocorre mais tardiamente no tempo de geração do parasita. Isto reforça a ideia de que a TSA perturba a sincronia de divisão destas estruturas do protozoário. E isto corrobora com a diminuição da proliferação, mostrando que, com a parada de ciclo, as células não são capazes de se dividir e aumentar em número, porém conseguem manter sua atividade celular metabólica e sobreviver neste estado, dado os resultados de viabilidade celular.

A relação de divisão sincronizada entre a bactéria e o protozoário também pode ser vista através do uso da Afidicolina e da Camptotecina. O primeiro inibidor, que impede a síntese de nucleotídeos, causa parada de ciclo celular de *A. deanei* na fase G1/S e impede a divisão do simbionte (Catta-Preta et al., 2015). O segundo, que provoca a filamentação da bactéria simbiótica, induz o bloqueio do ciclo em G2/M. Desta forma, o uso de distintos inibidores com especificidade para as diferentes fases do ciclo celular indica que em *A. deanei* a divisão do simbionte é sincronizada com a do núcleo em G1. No presente trabalho, através

dos dados obtidos por citometria de fluxo, que mostraram parada de ciclo em G1 nas células tratadas, nota-se que a segregação do simbiote também foi impedida, reforçando a ideia de que a divisão coordenada entre o simbiote e o protozoário ocorre logo no início do ciclo celular. Essa sincronização é essencial para que cada célula hospedeira carregue apenas um único simbiote.

Já os ensaios com CMTN mostraram que as células cancerosas tiveram o seu ciclo celular inibido após o tratamento com TSA em dois momentos: tanto em G0/G1, quanto em G2/M (Song et al., 2018). Neste caso, o inibidor atuou sobre proteínas reguladoras de transição das diferentes fases do ciclo. Porém, além da parada de ciclo celular, houve também morte celular por apoptose através de diferentes mecanismos, indicando que a TSA provoca aumento na expressão de proteínas indicativas de apoptose, como CASPASEs e PARPs (Song et al., 2018). Por outro lado, em *T. cruzi*, o ciclo celular sofreu parada em G2/M com o tratamento de TSA por até 72 horas, gerando células polinucleadas (dois ou mais núcleos) contendo apenas um cinetoplasto e células que não realizaram sua divisão, com mais de um núcleo e 4 cinetoplastos (Santos et al., 2018).

Não foi possível inferir, através da metodologia aplicada neste estudo, se houve algum tipo de modificação na acetilação de histonas que pudesse afetar a compactação da cromatina em células tratadas com TSA. Por atuar também sobre a desacetilação de histonas nucleares, era esperado que este inibidor também promovesse o relaxamento da cromatina devido à hiperacetilação das histonas. Entretanto, estas alterações não foram observadas a nível ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão (MET). No estudo com *T. vaginalis*, alterações na expressão gênica foram descritas, indicando que a TSA induz modificações transcricionais profundas nos protozoários tratados e que, conseqüentemente, a regulação da expressão de determinados genes é dependente de acetilação e desacetilação de histonas devido à hiperacetilação global destas proteínas (Song et al., 2017). Neste caso, essas modificações foram captadas através de análises moleculares como PCR em tempo real (qRT-PCR).

Já em estudos realizados com *Entamoeba histolytica*, agente etiológico da amebíase, mostrou-se que o tratamento com TSA causou mudanças no padrão da expressão gênica de determinadas cepas do parasita, alterando significativamente a transcrição de 163 genes (aproximadamente 2% dos genes testados no estudo), também devido à hiperacetilação de histonas (Ehrenkauffer et al., 2007). Em ambos estudos, não ficaram demonstradas alterações de ordem morfológica nos parasitas através de microscopia. Em *T. cruzi*, análises ultraestruturais não mostraram alterações no núcleo, entretanto dados de proteômica

revelaram um aumento da acetilação das histonas indicando que a TSA é um *dual inhibitor* que age tanto na acetilação destas proteínas como na de tubulinas (Santos et al., 2018). Tendo isto em vista, fica evidenciado que se torna necessária a realização de ensaios moleculares com *A. deanei*, para a confirmação das prováveis mudanças de expressão gênica dos protozoários tratados com Tricostatina.

Com os resultados de MET, foi possível verificar que a principal estrutura afetada após o tratamento com a TSA foi o endossimbionte. A bactéria simbiótica se mostrou muitas vezes mais alongada e mais eletrólucida do que nas células controle. Além disso, foi observada a presença de vacúolos próximos aos simbiotes que mostravam formato atípico, indicando uma possível destruição desta bactéria por processo de autofagia. O filo Apicomplexa, que engloba parasitas como *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium falciparum*, pode ser usado como modelo comparativo para entender questões evolutivas, como o surgimento de estruturas celulares. Nestes protozoários, há a ocorrência de uma organela de origem simbiótica chamada apicoplasto, que descende de uma alga vermelha. Em estudo realizado por He et al. (2001), que evidencia que quando o apicoplasto tem a sua correta segregação inibida, não ocorre alteração na proliferação, tampouco na sobrevivência de parasitas a curto prazo, mas sim a longo prazo. Tendo isto em vista, o presente estudo reforça a ideia de que, através do uso da TSA, problemas relacionados à divisão do simbiote podem impedir a proliferação e a sobrevivência do protozoário hospedeiro e bloquear o seu ciclo celular em tempos mais longos. Neste sentido, o uso de inibidores de desacetilação se mostram ferramentas interessantes para explorar a simbiose mutualística em tripanosomatídeos.

7 CONCLUSÃO

Dado tudo que foi exposto, pode-se concluir que a Tricostatina A causa inúmeros efeitos sobre o protozoário *Agomonas deanei* e seu endossimbionte. Apesar de afetar a proliferação do tripanosomatídeo, o inibidor não altera a viabilidade das células tratadas a nível mitocondrial. Para mais, a TSA afeta o arranjo de microtúbulos subpelículas e a segregação do endossimbionte, evidenciando que a sincronia de divisão da bactéria simbiótica depende do dinamismo do citoesqueleto de microtúbulos.

Para a elucidação de questões como a alteração da compactação da cromatina e alteração nos níveis de acetilação tanto das histonas como de tubulinas totais, serão

necessários estudos moleculares e a realização de ensaios de maior especificidade, como o qPCR e Western Blot, para a quantificação de tubulinas acetiladas. A análise proteômica para inferir quais genes estão sendo transcritos e quais proteínas estão sendo traduzidas nos parasitas tratados são também essenciais para esclarecer os alvos deste inibidor de desacetilases.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. e Walter, P. (2010). *Biologia Molecular da Célula*, 5ª Edição.

Alves J.M.; Klein, C.C.; da Silva, F.M.; Costa-Martins, A.G.; Serrano, M.G.; Buck, G.A.; Vasconcelos, A.T.; Sagot, M.F.; Teixeira, M.M.; Motta, M.C. e Camargo, E.P. (2013) Endosymbiosis in trypanosomatids: the genomic cooperation between bacterium and host in the synthesis of essential amino acids is heavily influenced by multiple horizontal gene transfers. *BMC Evol Biol* 13, 190.

Alves, J.M.; Voegtly, L.; Matveyev, A.V.; Lara, A.M.; da Silva, F.M.; Serrano, M.G.; Buck, G.A.; Teixeira, M.M. e Camargo, E.P. (2011) Identification and phylogenetic analysis of heme synthesis genes in trypanosomatids and their bacterial endosymbionts. *PLoS One*. 6, e23518.

Azevedo-Martins, A.C.; Machado, A.C.; Klein, C.C.; Ciapina, L.; Gonzaga, L.; Vasconcelos, A.T.; Sagot, M.F.; de Souza, W.; Einiker-Lamas, M.; Galina, A. e Motta, M.C.M. (2015). Mitochondrial respiration and genomic analysis provide insight into the influence of the symbiotic bacterium on the host trypanosomatid oxygen consumption. *Parasitology* 142, 352-362.

Brum, F.L.; Catta-Preta, C.M.; De Souza, W.; Schenkman, S.; Elias, M.C. e Motta, M.C.M. (2014) Structural characterization of the cell division cycle in *Strigomonas culicis*, an endosymbiont-bearing trypanosomatid. *Microsc Microanal.* 3, 1-10.

Butler, K.V.; Kalin, J.; Brochier, C.; Vistoli, G.; Langley, B. e Kozikowski, A.P. (2010). Rational design and simple chemistry yield a superior, neuroprotective HDAC6 inhibitor, Tubastatin A. *J Am Chem Soc* 132, 10842-10846.

Camargo, E.P. e Freymuller, E. (1977). Endosymbiont as supplier of ornithine carbonyl transferase in a trypanosomatid. *Nature* 270, 52-53.

Campo, V.A. (2017). Comparative effects of histone deacetylases inhibitors and resveratrol in *Trypanosoma cruzi* replication, differentiation, infectivity and gene expression. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 7, 23-33.

Catta-Preta, C.M.C; Brum, F.L.; da Silva, C.C.; Zuma, A.A.; Elias, M.C.; de Souza, W.; Schenkman, S. e Motta, M.C.M. (2015). Endosymbiosis in trypanosomatid protozoa: the bacterium division is controlled during the host cell cycle. *Frontiers in Microbiology* 6, 520.

Catta-Preta, C.M.C.; Pascoalino, B.S.; de Souza, W.; Mottram, J.C.; Motta, M.C.M. e Schenkman, S. (2016). Reduction of tubulin expression in *Angomonas deanei* by RNAi modifies the ultrastructure of the trypanosomatid protozoan and impairs division of its endosymbiotic bacterium. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 0, 1-10.

Cavalcanti, D.P.; Thiry, M.; De Souza, W. e Motta, M.C.M. (2008). The kinetoplast ultrastructural organization of endosymbiont-bearing trypanosomatids as revealed by deep-etching, cytochemical and immunocytochemical analysis. *Histochem Cell Biol* 130, 1177-1185.

- Celis, J.E. (2006). Cell Biology: A laboratory handbook, 3rd Edition, Volume1, Cytotoxicity and Cell Growth Assays. Chapter 38, 315-324.
- Chang, Z.; Li, Y.; He, W.; Liu, B.; Duan, X.; Halaweish, J.; Bambakidis, T.; Pan, B.; Liang, Y.; Nikolian, V.C.; Georgoff, P. e Alam, H.B. (2016). Inhibition of histone deacetylase 6 restores intestinal tight junctions in hemorrhagic shock. *J trauma Acute Care Surg* 81, 512-519.
- Da Cunha, J.P.; Nakayasu, E.S.; de Almeida, I.C. e Schenkman, S. (2006). Post translational modification of *Trypanosoma cruzi* histone H4. *Molecular and Biochemical Parasitology* 150, 268-277.
- Damaskos, C.; Garmpis, N.; Valsami, S.; Kontos, M.; Spartalis, E.; Kalampokas, T.; Kalampokas, E. et al. (2017). Histone deacetylases inhibitors: na attractive therapeutic strategy against breast cancer. *Anticancer Res* 37, 35-46.
- de Jesus, T.C.; Nunes, V.S.; Lopes, Mde C.; Martil, D.E.; Iwai, L.K.; Moretti, N.S.; Machado, F.C.; de Lima-Stein, M.L.; Thiemann, O.H.; Elias, M.C.; Janzen, C.; Schenkman, S. e da Cunha, J.P. (2016) Chromatin Proteomics Reveals Variable Histone Modifications during the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*. *J Proteome Res.* 15, 2039-2051.
- De Souza, W. & Motta, M.C.M. (1999). Endosymbiosis in protozoa of the Trypanosomatidae family. *FEMS Microbiology Letters* 173, 1-8.
- Ehrenkauf, G.M.; Eichinger, D.J. e Singh, U. (2007) Trichostatin A effects on gene expression in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *BMC Genomics* 8, 216.
- Faria-e-Silva, P.M.; Attias, M. e de Souza, W. (2000). Biochemical and ultrastructural changes in *Herpetomonas roitmani* related to the energy metabolism. *Biol Cell* 92, 39-47.
- Frey Müller, E. & Camargo, E.P. (1981). Ultrastructural differences between species of trypanosomatids with and without endosymbionts. *J Protozool.* 28, 175-182.
- Gadelha, C.; Wickstead, B.; de Souza, W.; Gull, K. e Cunha-e-Silva, N. (2005) Cryptic paraflagellar rod in endosymbiont-containing kinetoplastid protozoa. *Eukaryot Cell* 4, 516-525.
- Garmpis, N.; Damaskos, C.; Garmpi, A.; Dimitroulis, D.; Spartalis, E.; Margonis, G.A.; Schizas, D. et al. (2017). Targeting histones deacetylases in malignant melanoma: a future therapeutic agente or just great expectations?. *Anticancer Res* 37, 5355-5362.
- Gomes, A.S.G. (2014) Estudo comparativo dos perfis proteômicos de cepas selvagem e aposimbótica de *Strigomonas culicis*. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 213f.
- Gonçalves, R.E.G. (2008). Caracterização de proteínas da maquinaria de divisão do endossimbionte do protozoário tripanosomatídeo *Crithidia deanei*. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Guimarães, M. (2015) Parceiros inseparáveis, associação simbiótica entre protozoário e bactéria ajuda a entender a origem de organelas celulares. *Pesquisa FAPESP* 236, 53.
- Gull, K. (1999). The cytoskeleton of trypanosomatid parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* 53, 629-655.
- He, C.V.; Shaw, M.K.; Pletcher, C.H.; Striepen, B.; Tilney, L.G. e Roos, D.S. (2001) A plastid segregation defect in protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *EMBO Journal* 20, 330-339.
- Hubbert, C.; Guariola, A.; Shao, R.; Kawaguchi, Y.; Ito, A.; Nixon, A.; Yoshida, M.; Wang, X.F. e Yao, T.P. (2002). HDAC6 is a microtubule associated deacetylase. *Nature* 417, 455-458.
- Jackson, A.P., Vaughan, S. e Gull, K. (2006). Evolution of tubulin gene arrays in Trypanosomatid parasites: genomic restructuring in *Leshmania*. *BMC Genomics* 7, 261.

- Janke, C. e Bulinsk, J.C. (2011). Post Translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12, 773-786.
- Janzen, C.J.; Fernandez, J.P.; Deng, H.; Diaz, R.; Hake, S.B. e Cross, G.A. (2006). Unusual histone modifications in *Trypanosoma brucei*. *FEBS Lett* 580, 2306-2310.
- Kaufer, A.; Ellis, J.; Stark, D. e Barratt, J. (2017). The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasites and Vectors* 10, 287.
- Kim, Y.B.; Ki, S.W.; Yoshida, M. e Horinouchi, S. (2000). Mechanism of cell cycle arrest caused by histone deacetylase inhibitors in human carcinoma cells. *J. Antibiot.* 53, 1191-1200.
- Klein, C.C.; Alves, J.M.; Serrano, M.G.; Buck, G.A.; Vasconcelos, A.T.; Sagot, M.F.; Teixeira, M.M.; Camargo, E.P. e Motta, M.C. (2013) Biosynthesis of vitamins and cofactors in bacterium-harboring trypanosomatids depends on the symbiotic association as revealed by genomic analyses. *PLoS One* 8, e79786.
- Kuo, M.H. e Allis, C.D. (1998). Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *BioEssays* 20, 615-626.
- Lernoux, M.; Schneckeburger, M.; Dicato, M. e Diederich, M. (2017). Anti-cancer effects of naturally derived compounds targeting histone deacetylase 6-related pathways. *Pharmacol Res* [epub ahead of print].
- Li, B. e Yang, X.J. (2015). Tubulin acetylation: responsible enzymes, biological functions and human diseases. *Cell and Molecular Life Sciences* 72, 4237-4255.
- Lodish, H.; Berk, A.; Kaiser, C.A.; Krieger, M.; Bretscher, A.; Ploegh, H. e Amon, A. (2014). *Biologia Celular e Molecular* 7ª edição, Acetilação de Tubulina, páginas 844 e 845.
- Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, S.L. et al. (2000). *Molecular Cell Biology* 4th Edition, Chapter 19, Section 19.2 Microtubule Dynamics and Associated Proteins.
- Loyola-Machado, A.C.; Azevedo-Martins, A.C.; Catta-Preta, C.M.C.; de Souza, W.; Galina, A. e Motta, M.C.M. (2017). The symbiotic bacterium fuels the energy metabolism of the host trypanosomatid *Strigomonas culicis*. *Protist* 168, 253-269.
- Loyola-Machado, A.C.; Azevedo-Martins, A.C.; Catta-Prte, C.M.C.; de Souza, W.; Galina, A. e Motta, M.C.M. (2017). The symbiotic bacterium fuels the energy metabolism of the host trypanosomatid *Strigomonas culicis*. *Protist* 168, 253-269.
- Martínez-Calvillo, S.; Vizuet-de-Rueda, J.C.; Florencio-Martínez, L.E.; Manning-Cela, R.G. e Figueroa-Angulo, E.E. (2010). Gene expression. In trypanosomatid parasites. *J Biomed Biotechnol* 2010, 15 páginas.
- Matsuyama, A.; Shimazu, T.; Sumida, Y.; Saito, A.; Yoshimatsu, Y.; Seigneurin-Berny, D.; Osada, H.; Komatsu, Y.; Nishino, N.; Khochbin, S. et al. (2000). *In vivo* destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *EMBO J* 21, 6820-6831.
- Matthews, K.R. (2005). The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *Journal of Cell Science* 118, 283-290.
- Mattila, P.K. e Lappalainen, P. (2008). Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 446-454.
- Motta, M. (2010). Endosymbiosis in Trypanosomatids as a Model to Study Cell Evolution. *Open Parasitol J* 4, 139-147.
- Motta, M.C.M.; Catta-Preta, C.M.C.; Schenkman, S.; Martins, A.C.A.; Miranda, K.; de Souza, W. e Elias, M.C. (2010). The bacterium endosymbiont of *Crithidia deanei* undergoes coordinated division with the host cell nucleus. *PLoS ONE* 5, e12415.

- Motta, M.C.M.; Leal, L.H.M.; Souza, W.D.; De Almeida, D.F. e Ferreira, L.C.S. (1997a) Detection of Penicillin-binding Proteins in the Endosymbiont of the Trypanosomatid *Crithidia deanei*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 44, 492–496.
- Motta, M.C.M.; Martins, A.C.D.A.; de Souza, S.S.; Catta-Preta, C.M.C.; Silva, R.; Klein, C.C et al. (2013). Predicting the proteins of *Angomonas deanei*, *Strigomonas culicis*, and their respective endosymbionts reveals new aspects of the Trypanosomatidae family. *PLoS ONE* 8, e60209.
- Motta, M.C.M.; Soares, M.J.; Attias, M.; Morgado, J.; Lemos, A.P. et al. (1997b). Ultrastructural and biochemical analysis of the relationship of *Crithidia deanei* with its endosymbiont. *Eur J Cell Biol* 72, 370-377.
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database (2005); CID=444732, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/444732> (accessed Jan. 16, 2018).
- Nature Education (Scitable) (2014). Microtubules and Filaments. Disponível em <https://www.nature.com/scitable/topicpage/microtubules-and-filaments-14052932>
- Ogbaboyi, E.; Ersfeld, K.; Robinson, D.; Sherwin, T. and Gull, K. (2000). Architecture of the *Trypanosoma brucei* nucleus during interphase and mitosis. *Mol Biol Cell* 14, 1769-1779.
- Perdiz, D.; Mackeh, R.; Poüs, C. e Baillet, A. (2011). The ins and out of tubulin acetylation: more than just a post-translational modification?. *Cellular Signaling* 5, 763-771.
- Saito, S.; Zhuang, Y.; Shan, B.; Danchuk, S.; Luo, F.; Korfei, M.; Guenther, A. e Lasky, J.A. (2017). Tubastatin ameliorates pulmonary fibrosis by targeting the TGF β -PI3K-Akt pathway. *PLoS ONE* 12, e0186615.
- Santos, J.O. (2017) Tricostatina e Tubastatina: o efeito de inibidores de desacetilases sobre o esqueleto de microtúbulos em *Trypanosoma cruzi*. Dissertação (Mestrado em Biofísica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Santos, J.O.; Zuma, A.A.; Vitorino, F.N.L.; Cunha, J.P.C.; de Souza, W. e Motta M.C.M. (2018). Trichostatin A induces *Trypanosoma cruzi* histone and tubulina acetylation: effects on cell division and microtubule cytoskeleton remodelling. *Parasitology* [epub ahead of print].
- Song, M.G.; Kim, M.; Yi, M.; Kim, J.; Park, S.J.; Yong, T.S. e Kim, H.P. (2017) Epigenome mapping highlights chromatin-mediated gene regulation in the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *Scientific Reports* 7, 45365.
- Song, X.; Wu, J.Q.; Xu, X.F.; Yang, X.S. e Yang, Y. (2018) Trichostatin A inhibits proliferation of triple negative breast cancer cells by inducing cell cycle arrest and apoptosis. *Neoplasma*, epub ahead of printing.
- Song, Y. e Brady, S.T. (2015) Post-translational modifications of tubulin: pathways to functional diversity of microtubules. *Trends Cell Biol* 25, 125-136.
- Sunter, J.D. e Gull, K. (2016). The Flagellum Attachment Zone: 'The Cellular Ruler' of Trypanosome Morphology. *Trends Parasitol* 32, 309-324.
- Timmis, J.N.; Ayliffe, M.A.; Huang, C.Y. e Martin, W. (2004). Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat Rev Genet* 5, 123-135.
- Timmis, J.N.; Ayliffe, M.A.; Huang, C.Y. e Martin, W. (2004). Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat Rev Genet* 5, 123-136.
- UESC (2014). Universidade Estadual de Santa Cruz. Curso Técnico Prático de Técnicas em Microscopia Eletrônica.
- Vidal, J.C. e de Souza, W. (2017). Morphological and functional aspects of cytoskeleton of trypanosomatids. *Cytoskeleton – Structure, Dynamics, Function and Disease*, 1-340.

Vogelauer, M.; Wu, J.; Suka, N. e Grunstein, M. (2000). Global histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nature* 408, 495-498.

Wallace, F.G. e Hoare, C.A. (1966). Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. *Nature* 212, 1385-1386.

Watson, J.D.; Baker, T.A.; Gann, A.; Levine, M. e Losik, R. (2014). *Molecular biology of the gene*, 7th Edition.

Whittle, N. e Singewald, N. (2014). HDAC inhibitors as cognitive enhancers in fear, anxiety and trauma therapy: where do we stand?. *Biochemical Society Transactions* 42, 569-581.

Woodward, R. e Gull, K. (1990). Timing of nuclear and kinetoplast DNA replication and early morphological events in the cell cycle of *Trypanosoma brucei*. *Journal of Cell Science* 95, 49-57.

Xu, Z.; Schaedel, L.; Portran, D.; Aguilar, A.; Gaillard, J.; Marinkovich, M.P.; Théry, M. e Nachury, M.V. (2017) Microtubules acquire resistance from mechanical breakage through intraluminal acetylation. *Science* 356, 328-332.

Zhang, G. e Gan, Y.H. (2017). Synergistic antitumor effects of the combined treatment with an HDAC6 inhibitor and a COX-2 inhibitor through activation of PTEN. *Oncol Rep* 38, 2657-2666.