



Universidade de Brasília  
Programa de Pós Graduação em Patologia Molecular  
Laboratório de Interação Parasito-Hospedeiro

# **Análise funcional preliminar da dipeptidil peptidase 8 e da otubaína de *Trypanosoma cruzi* por meio de nocaute gênico**

**Débora Torres Alves Figueirêdo**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Izabela Marques Dourado Bastos

Co-orientador: Prof. Dr. Sébastien Charneu

Brasília

**2013**



Universidade de Brasília  
Programa de Pós Graduação em Patologia Molecular  
Laboratório de Interação Parasito-Hospedeiro

# **Análise funcional preliminar da dipeptidil peptidase 8 e da otubaína de *Trypanosoma cruzi* por meio de nocaute gênico**

**Débora Torres Alves Figueirêdo**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Izabela Marques Dourado Bastos

Co-orientador: Prof. Dr. Sébastien Charneu

Dissertação Apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Patologia Molecular.

Brasília

**2013**

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é  
senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria  
menor se lhe faltasse uma gota”.

*Madre Teresa de Calcutá*

Dedico este trabalho aos grandes amores da minha vida:

Marcos Neto e Maria Alice. Vocês são meus amores!!!!

Dedico também aos meus pais e ao meu amado marido,

sem o qual minha vida não seria completa.

## **Agradecimentos**

A Deus, minha fonte de inspiração, de fortaleza espiritual e de refúgio e a Nossa Senhora pela intercessão.

À Profa. Dra. Izabela Marques Dourado Bastos, pelo seu incansável esforço e dedicação ao sucesso deste trabalho. Obrigada pela oportunidade de trabalhar ao seu lado e poder crescer cientificamente e pessoalmente, e por ser um exemplo de paixão pela pesquisa e pelo companheirismo.

Ao Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau, pela colaboração e auxílio prestados.

Ao Prof. Dr. Jaime Martins de Santana pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e por todo auxílio prestado durante este projeto.

À Profa. Dra. Flávia Nader, por todo ensinamento e por aceitar fazer parte da banca examinadora e à Profa. Dra. Carla Araújo pelos conselhos.

Ao Prof. Dr. Vicente Martins e ao Dr. Hugo de Almeida por aceitarem fazer parte da banca examinadora e por todas as contribuições.

Aos meus pais, Sonia Regina Torres Alves e José Paulo Alves, pelo amor incondicional, pelas conversas e conselhos, e principalmente por fazer de mim o que sou. Obrigada pelas noites em claro, pelos valiosos ensinamentos, pelo incentivo e carinho.

Ao meu marido companheiro de todas as horas, Marcos Antonio da Silva Figueirêdo Junior, obrigada por me aceitar do jeito que sou. Obrigada pelos conselhos, ensinamentos, carinhos, ombro amigo, pelas duras palavras de incentivo. Te amo muito!!!

Aos meus irmãos José Paulo, Felipe e Beatriz, por fazerem a minha vida ser mais leve. Obrigada pelo eterno apoio, amizade, cumplicidade, conselhos. Obrigada por fazerem parte da minha vida.

Às minhas avós Maria Katuco e a saudosa Ailce, por serem um exemplo de vida e perseverança.

À Dona Guiomar por permitir que eu pudesse chegar até aqui. Obrigada por cuidar tão bem dos meus filhos.

Aos meus sogros Marcos Antonio e Leniz Genil, por me acompanharem e me incentivarem durante esta caminhada, pelo apoio e principalmente por sempre estarem presentes na minha vida.

Aos meus cunhados, Carlos, Luciana, João Paulo e Lucianna. Obrigada por toda a contribuição, pelos bons momentos e por cuidarem de mim.

Aos meus colegas de trabalho, Brina, Raquel, Luz, Cissé, Marta, Paula, Tatiana, Juliana, Graziella, Camila, Maurício, Márcio, André, Hugo, Keyla, Viviane e todos os alunos de IC pela amizade, trocas de conhecimentos, incentivo, auxílio, e por fazerem do laboratório um local cada vez melhor e mais acolhedor.

Ao CNPq pelo financiamento deste trabalho.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

Da	Dalton
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA	Etileno bis(oxi-etilenonitrilo) do ácido tetraacético
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo
kb	Kilobase
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato 50 mM, NaCl 0,15 M pH 7,2
RNA	Ácido ribonucléico
UTR	Região não traduzida
AMC	7-amino-4-metil-cumarina
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
L6	Célula muscular murina
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LIT	Liver Infusion Tryptone
NBT	Nitro-azul-tetrazólico
N-terminal	Extremidade amino-terminal da cadeia polipeptídica
PCR	Reação de polimerização em cadeia
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosídeo

**SUMÁRIO**

INTRODUÇÃO .....	14
1. Doença de Chagas.....	14
1.1. Manifestações Clínicas.....	16
1.2. Tratamento Quimioterápico .....	16
2. O <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	17
2.1. Classificação do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	19
2.2. O genoma do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	21
2.3. Expressão gênica em <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	23
2.4. Manipulação genética em <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	24
3. Proteases .....	30
3.1. Dipeptidil aminopeptidase 8 / Dipeptidil aminopetidase 9 .....	31
3.2. Otubaína .....	35
JUSTIFICATIVA.....	41
OBJETIVO.....	43
METODOLOGIA .....	45
Análise genômica comparativa.....	45
Cultura de células .....	45
Extração de DNA genômico.....	45
Iniciadores .....	46
Obtenção dos cassetes .....	47
Eletroforese em gel de agarose.....	47
Clonagem dos fragmentos .....	47
Digestão dos vetores com enzimas de restrição .....	48
Transformação em bactérias competentes.....	48
PCR de colônias de bactérias transformadas.....	49
Sequenciamento.....	49



Extração plasmidial .....	49
Transfecção dos parasitos .....	50
Análise por PCR dos parasitos selecionados .....	51
Taxa de crescimento .....	51
Diferenciação de tripomastigotas .....	52
Teste de atividade enzimática .....	52
Teste de infecção <i>in vitro</i> .....	52
RESULTADOS .....	55
Avaliação de viabilização do nocaute físico .....	55
Amplificação das regiões 5'UTR e 3' UTR .....	57
Clonagem do cassete no vetor pGem .....	59
Deleção dos genes de <i>DPP</i> e <i>Otu</i> por nocaute gênico .....	62
Análise por PCR dos parasitos transfectados .....	63
Análise do crescimento dos parasitos nocauteados .....	68
Comparação da infectividade dos parasitos nocauteados .....	69
Verificação da atividade de DPP8 .....	71
Montagem do cassete para a realização do segundo turno de nocaute .....	72
Realização do duplo nocaute .....	72
DISCUSSÃO .....	75
CONCLUSÃO .....	83
PERSPECTIVAS .....	85
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	86

## RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é um problema de saúde pública, principalmente na América Latina, e os tratamentos disponíveis são muitas vezes ineficazes, além de causar efeitos colaterais graves. O nosso grupo de pesquisadores tem como objetivo identificar e caracterizar proteases do parasito para a identificação de potenciais novos alvos terapêuticos. Neste trabalho, apresentamos um estudo preliminar sobre a função dos genes da dipeptidil-peptidase 8 (*dpp8tc*) e da otubaína (*otutc*), uma serino e uma cisteína protease de *T. cruzi*, respectivamente. A DPP8 é uma protease da família DPPIV, que é conhecida pela sua importante função de clivar ligações peptídicas com prolina na segunda posição. Estas peptidases são importantes no processamento e degradação de peptídeos como hormônios e neuropeptídeos. A OTU pertence à família das enzimas deubiquitinantes, importantes na regulação de alguns genes relacionados em vários processos biológicos, como ativação da resposta imune. A DPP8 e a OTU são expressos em *T. cruzi* e se apresentam em cópia única no genoma deste parasito, o que nos permitiu realizar o estudo, por meio de nocaute físico, da função dessas proteínas na viabilidade e no processo de infecção do protozoário. Assim, cassetes para a realização do nocaute foram construídos com o gene de neomicina-fosfotransferase (*neo*) flanqueado pelas regiões 5'UTR e 3'UTR do gene *dpp8tc* ou *otutc*. Esses cassetes foram transfectados em parasitos epimastigotas da cepa CL-Brener, produzindo parasitos resistentes a G418. Algumas PCRs foram realizadas a fim de se verificar a presença dos genes *dpp8tc*, *otutc* e *neo* no genoma dos parasitos nocauteados, assim como no genoma dos parasitos controle não transformados (selvagens), que confirmaram a presença de uma outra cópia no genoma. Além disso, outras PCRs confirmaram a correta inserção do cassete no local do gene de interesse, indicando a ocorrência de nocaute simples (de um único alelo), o que demonstrou a eficácia do protocolo. O efeito do nocaute simples dos genes foi analisado por meio da observação do crescimento *in vitro*, em que os parasitos simples mutantes para *otutc* cresceram a uma taxa 22,5% inferior que o selvagem, ao passo que essa taxa nos mutantes simples para *dpp8tc* foi 25% superior à do selvagem. Os parasitos nocauteados foram ainda capazes de se diferenciar em tripomastigotas e desafiados a infectar células L6 de mioblastos de camundongos. Os mutantes para *otutc* foram capazes de infectar 1,65 e 3 vezes mais células em 3 e 24 horas de infecção, respectivamente, comparado ao selvagem, enquanto nos mutantes para *dpp8tc* este

aumento foi de 1,76 e 1,65 a mais que o selvagem. O teste enzimático *in vitro* para DPP8 no substrato Gly-Pro-AMC demonstrou haver atividade enzimática de 165% nos mutantes para o gene dessa enzima, sendo esse valor superior ao apresentado pelo selvagem (100%). Os resultados obtidos no presente estudo são preliminares e apontam estratégias futuras de pesquisa, tal como a análise do nocaute duplo (em ambos os alelos) para os genes *dpp8tc* e *otutc* e a infecção *in vivo* de forma a contribuir com o entendimento da função dessas proteínas no parasito.

## ABSTRACT

Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, is a public health burden, mainly in Latin America since available treatments are often ineffective and cause severe side effects. The aim of our research team is to study parasite proteases as potential new therapeutic targets. In this work, we present a preliminary functional study of dipeptidyl-peptidase 8-like (*dpp8tc*) and otubain (*otutc*), a serine and a cysteine protease of *T. cruzi*, respectively. DPPs are prolyl oligopeptidase family members involved in hormone processing or inactivation in mammals. Otu belong to the deubiquitylating enzymes (DUBs) family, important in gene regulation and reported in several biological processes such as immune response activation. The *dpp8tc* and *otutc* are expressed in *T. cruzi* and is present as a single copy gene in the genome, which allows us to study the genes by knockout (KO), the role of these proteins in the parasite viability and infection process. The KO cassettes were constructed with neomycin phosphotransferase gene (*neo*) flanked by 5'UTR and 3'UTR of *dpp8tc* or *otutc*. They were transfected into epimastigotes (CL-Brener strain) producing G418-resistant parasites. Several PCRs were carried out to verify the presence of *dpp8tc*, *otutc*, and *neo* in the KO and wild type (WT) parasite genome. In addition, other PCR confirmed the correct insertion of the cassette in place of the target gene, in a single-allele knockout, demonstrating the efficacy of the protocol. The effect of the single-allele knockout was analyzed by observation of *in vitro* growth, in which the single mutants for *otutc* grew at a rate 22.5% lower than the WT, whereas the rate for the *dpp8tc* single mutants was 25% higher than WT. The mutants could differentiate into trypomastigotes and when challenged to infect L6 cells of mice myoblasts, the *otutc* mutants were able to infect 165% and 290.57% of cells, 3 and 24 hours after infection, respectively, while WT was able to infect 100%. These values for the *dpp8tc* mutants were 176.89% and 165.21%, 3 and 24 hours after infection, respectively. The *in vitro* enzymatic test for DPP8 on the substrate Gly-Pro-AMC demonstrated enzymatic activity of 165% in the mutants for the gene of this enzyme, when compared to wild type, this value being higher than that presented by the WT (100%). The results obtained in this study are preliminary and suggest future research strategies, such as the analysis of double-allele knockout for the genes *dpp8tc* and *otutc* as well as *in vivo* mice infection in order to contribute to the understanding of the role of these proteins in *T. cruzi*.

# INTRODUÇÃO

## INTRODUÇÃO

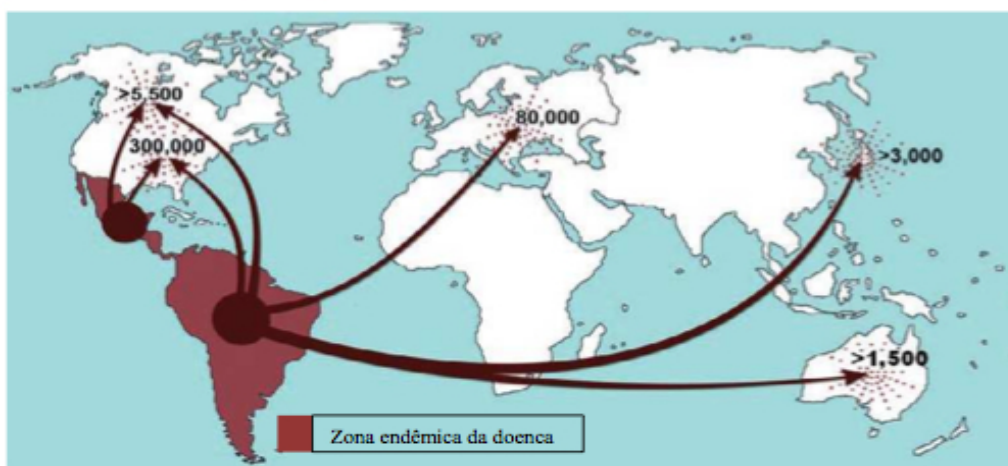
### 1. Doença de Chagas

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e estima-se que existam cerca de 10 milhões de pessoas infectadas no mundo, das quais aproximadamente 3 milhões estejam infectadas no Brasil (WHO, 2010; (Petherick, 2010)). Desde sua descoberta em 1909, a doença de Chagas continua sem vacina e com poucas opções terapêuticas (Steverding e Tyler, 2005), sendo considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) uma das mais importantes doenças infecto-parasitárias na América Latina e um grave problema de saúde pública.

A doença de Chagas é transmitida principalmente por insetos hematófagos da família Reduviidae e da subfamília *Triatominae*, conhecidos popularmente como “barbeiros” (Coura, 2003; Coura e Willcox, 2003) que, enquanto se alimentam liberam fezes que podem estar contaminadas com o *T. cruzi*. Este, invade o hospedeiro através da lesão ocasionada pela picada ou através de mucosas como, olhos, nariz e boca (Prata, 2001). A doença de Chagas pode ainda ser transmitida por via oral, através da ingestão de alimentos contaminados, por meio de transfusão sanguínea de forma congênita e por acidentes laboratoriais.

Diversas espécies de barbeiros já foram identificadas como prováveis transmissores da doença de Chagas porém, nem todos os barbeiros são considerados bons transmissores da doença (Perlowagora-Szumlewicz, Muller *et al.*, 1990). A metaciclogênese de *T. cruzi* é uma característica muito importante na dinâmica de transmissão e na qualidade do vetor, sendo de grande importância na transmissão da doença de Chagas (Coura e Borges-Pereira, 2012). Os melhores transmissores da doença de Chagas nem sempre são os vetores com maior número de *T. cruzi*, devido à metaciclogênese do *T. cruzi* no trato digestivo dos insetos. Por exemplo, de acordo com o estudo de Perlowagora-Szunlewicz e colaboradores (1990) em que nove espécies de vetores foram infectadas com sete cepas de *T. cruzi*, a fim de obter a porcentagem de cepas infectivas em cada espécie, o *Triatoma pseudomaculata* foi a espécie mais infectada. No entanto, ele converteu pouco mais do que 10% do *T. cruzi* na forma infectante demonstrando que uma espécie pode ser mais infectada tendo maior número de *T. cruzi*, mas não ser um bom vetor, ou seja, não transmiti-lo na forma infectante.

A distribuição geográfica da doença de Chagas, incluindo seus reservatórios e vetores, era limitada inicialmente ao Continente Sul-Americano em virtude da distribuição do vetor estar restrita a ele, razão pela qual a doença foi denominada tripanossomíase americana (Dias, 2009). Porém, novos casos estão sendo registrados nos Estados Unidos, Austrália, Japão, Canadá e Europa (Gascon, Bern *et al.*, 2010). Nos Estados Unidos estima-se que existam entre 300.000 a 1 milhão de pessoas infectadas, sendo mais frequentes entre pessoas mais pobres que não tem acesso a serviços médicos de saúde (Hotez, Bottazzi *et al.*, 2012). Na figura 1 observa-se a distribuição da doença de Chagas no mundo e uma estimativa de infectados em países não-endêmicos.



Fonte: COURA, 2010

**Figura 1: Distribuição mundial da doença de Chagas. Fonte: Coura, 2010**

A principal forma de controle da doença faz-se por meio de ações de combate aos insetos vetores e/ou melhorias habitacionais, complementadas por rigorosa seleção de doadores de sangue (Dias, 2001). Em 2006, o Brasil recebeu da organização Panamericana de Saúde (OPAS) e OMS a certificação internacional de interrupção da transmissão da doença de Chagas pelo *T. infestans*. Porém, esta certificação demonstra a interrupção momentânea da transmissão por este inseto e não a erradicação da doença. Entretanto espécies de vetores que anteriormente eram consideradas como secundários, tais como *T. sordida*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *Rhodnius prolixus*, têm-se demonstrado capazes de transmitir a doença e novos casos e surtos estão ocorrendo devido à transmissão oral (BRASIL, 2010).

### **1.1. Manifestações Clínicas**

A Doença de Chagas pode ser dividida em três fases distintas: a aguda, a indeterminada e a crônica (Rocha, Nunes *et al.*, 2009). Na fase aguda pode-se observar a formação de um edema no local de entrada do parasito chamado de chagoma de inoculação ou sinal de Romaña, que tende a desaparecer. Durante a fase aguda é observada alta parasitemia, devido à multiplicação de forma exponencial dos parasitos (Kropf e Sá, 2009). Quando apresenta sintomas, esta fase é caracterizada por intenso parasitismo e reações inflamatórias teciduais (Coura e Dias, 2009) que podem resultar em mal-estar, cefaléia, edema subcutâneo, disfunção cardíaca, hepatomegalia e/ou esplenomegalia (Andrade, 1999). A letalidade nesta fase da doença pode estar relacionada à meningoencefalite e insuficiência cardíaca (Rassi e Little, 2000).

Passada a fase aguda geralmente ocorre a redução espontânea da parasitemia, que pode levar ao desenvolvimento da fase indeterminada ou crônica, se não for realizado tratamento específico. Estima-se que cerca de 50-60% dos pacientes apresentam a fase indeterminada da doença, onde os pacientes não apresentam nenhum sintoma clínico predominante da doença (Ribeiro e Rocha, 1998). Aproximadamente 20-30% dos pacientes infectados podem evoluir para a fase crônica desta doença e apresentam distúrbios cardíacos, digestivos ou neurológicos (Dias, 2000). Os distúrbios cardíacos são os principais responsáveis pela alta morbidade e mortalidade da doença (Dias, 1989). Nos distúrbios digestivos é comum ocorrer dilatações do esôfago (megaesôfago) e/ou cólon (megacólon) como principais manifestações clínicas (Coura e Viñas, 2010). Durante o desenvolvimento da doença de Chagas pode ocorrer lesões, denervação e desordens funcionais no sistema nervoso autônomo. A denervação do sistema parassimpático é mais intensa e mais estudada que no sistema simpático e ocorre preferencialmente em neurônios periféricos, sendo mais evidente nos distúrbios cardíacos e digestivos (Prata, 2001).

### **1.2. Tratamento Quimioterápico**

Desde 1912, numerosas drogas têm sido utilizadas experimentalmente e em ensaios clínicos para o tratamento de Chagas. Porém, somente após os estudos de



Packachanian (1952 e 1957) e Brener (1961), chegou-se ao tratamento utilizando uma das drogas que estão disponíveis até hoje: nifurtimox e benzonidazol. Nifurtimox é um nitrofurano com um mecanismo de ação que impede o *T. cruzi* de desintoxicar os radicais livres que agem sobre ele (Docampo e Moreno, 1986), enquanto o benzonidazol atua por meio de ligações dos seus metabólitos no DNA do parasito, e aos seus lipídeos e proteínas (Polak e Richle, 1978; Díaz De Toranzo, Castro *et al.*, 1988). Ambas são mais eficazes na fase aguda da doença e sua eficiência pode variar em relação aos diferentes isolados (Urbina, 2002). O Nifurtimox não é utilizado no Brasil, visto que é pouco eficaz e possui vários efeitos adversos. Por outro lado, o Benzonidazol possui alta atividade entre as cepas existentes no Brasil, porém é pouco eficaz no tratamento de pacientes crônicos com cerca de 5% de cura (Prata, 2001; Fernandes, Tiecher *et al.*, 2009). Além disso, análise proteômica cuidadosa revelou que formas epimastigotas do parasito desenvolve resistência multigênica ao Benzonidazol (Andrade, Murta *et al.*, 2008).

## **2. O *Trypanosoma cruzi***

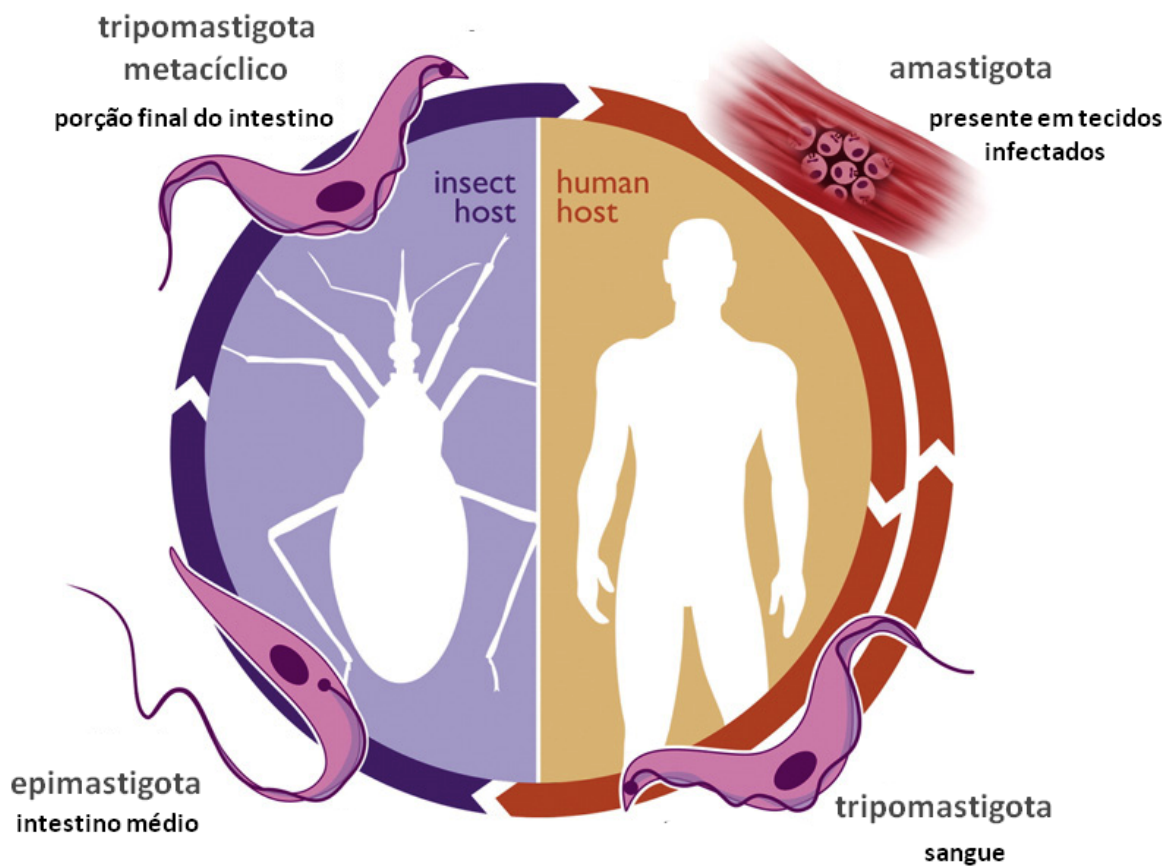
O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado, pertencente à ordem *Kinetoplastidae*, cuja principal característica é a presença de um cinetoplasto, uma estrutura singular que abriga uma massa de DNA extranuclear concentrado na única mitocôndria deste protista (Moreira *et al.*, 2004). Este protozoário pertence à família *Trypanosomatidae*, que possui outras espécies responsáveis por causar importantes doenças ao homem como a doença do sono causada pelo protozoário *Trypanosoma brucei* e as Leishmanioses (causada pelas Leishmanias) (Vickerman, 1994).

O ciclo biológico do *T. cruzi* é bastante complexo, e se caracteriza por diferentes formas presentes em hospedeiros vertebrados e invertebrados (Rodrigues Coura e De Castro, 2002). No hospedeiro invertebrado estão caracterizadas duas formas: epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos. Os epimastigotas são formas extracelulares flageladas, não infecciosas para os vertebrados, replicativas e que se dividem por fissão binária, enquanto que os tripomastigotas metacíclicos correspondem as formas não replicativa e infectante para o homem (De Souza, 2002). Por sua vez, amastigotas e tripomastigotas são as formas encontradas no hospedeiro vertebrados. A forma amastigota corresponde a células arredondadas, encontradas no citoplasma da célula do hospedeiro vertebrado capazes de se dividir, já a forma tripomastigota

corresponde a formas flageladas, não replicativas e infectivas liberadas após o processo de diferenciação das formas amastigotas dentro da célula do hospedeiro (De Souza, 2002).

Consideremos que o ciclo se inicia com um inseto triatomíneo alimentado do sangue de um vertebrado infectado com formas tripomastigotas circulantes no sangue. Uma vez ingerido, a maior parte dos tripomastigotas são lisados no estômago do inseto (Castro, Seabra *et al.*, 2007) e os parasitos sobreviventes se diferenciam em alguns dias em esferomastigotas ou em epimastigotas. Os epimastigotas migram para o intestino, onde se dividem intensivamente e se ligam as membranas perimicrovilares que são secretadas pelas células intestinais, na parte posterior do intestino (Alves, Albuquerque-Cunha *et al.*, 2007; Nogueira, Gonzalez *et al.*, 2007). Na região posterior do intestino, os epimastigotas se liberam da superfície intestinal, e se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas que são altamente infectivas para algumas espécies de mamíferos, incluindo o homem. Normalmente a infecção no mamífero ocorre pela inoculação direta destas formas na mucosa ocular, ou na pele lesionada durante o repasto. Os tripomastigotas metacíclicos invadem as células no local da inoculação (fibroblastos, macrófagos e células epiteliais) por meio do reconhecimento entre o parasito e as células hospedeiras, num processo que envolve uma grande variedade de moléculas presentes em ambas as células iniciando o ciclo de vida intracelular do *T. cruzi* (Lima, Oliveira *et al.*, 2010).

Na invasão o parasito penetra na célula formando uma vesícula parasitófora que irá se fundir com lisossomos formando o fagolisossomo. Para isso ele utiliza a oligopeptidase B que induz a liberação de  $Ca^{+}$  pela célula que resulta em modificações celulares, que promovem o recrutamento e fusão de lisossomos da célula hospedeira, facilitando sua entrada (Burleigh e Andrews, 1995). Por influência do ambiente ácido promovido pelo fagolisossomo, os tripomastigotas se diferenciam em amastigotas. Após várias divisões binárias, os amastigotas se diferenciam novamente em tripomastigotas, que serão liberados para o meio extracelular após o rompimento da célula, e entram na circulação sanguínea, podendo infectar outras células iniciando novamente este ciclo (Figura 2) (Lima, Oliveira *et al.*, 2010).



**Figura 2. Representação esquemática do ciclo de vida do *T. cruzi*.** Fonte: Motta, 2010 (Adaptado de Cuervo, Domont *et al.*, 2010).

### 2.1. Classificação do *Trypanosoma cruzi*

Apesar da ampla diversidade genética observada entre os diferentes isolados, os primeiros estudos com base em estratégias diferentes de genotipagem identificaram duas grandes linhagens na população dos parasitos, chamado *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (Souto, Fernandes *et al.*, 1996; Momen, 1999). Estas linhagens divergentes ocupam diferentes ambientes ecológicos, o silvestre (*T. cruzi* I) e doméstico (*T. cruzi* II) da doença de Chagas (Zingales, Souto *et al.*, 1998), bem como se associam a hospedeiros silvestres distintos (Buscaglia e Di Noia, 2003). Outras análises levaram alguns autores a propor a subdivisão de *T. cruzi* II em cinco sub-grupos: *T. cruzi* IIa, IIb, IIc, IID e IIE (Brisse, Barnabé *et al.*, 2000), sendo que alguns destes subgrupos são híbridos, consistentes com a hipótese de que houve mais de uma recombinação genética entre as linhagens de *T. cruzi* (Westenberger, Barnabé *et al.*, 2005; Ienne, Pedroso *et al.*, 2010).

Análises filogenéticas das cepas de *T. cruzi* tornaram-se mais confusas quando dados adicionais indicaram a existência de não apenas dois, mas três grandes grupos na população de *T. cruzi* (Miles, Souza *et al.*, 1978; De Freitas, Augusto-Pinto *et al.*, 2006). Após intenso debate, em 2009, um consenso internacional reconheceu a existência de seis linhagens principais, também conhecidas como discretas unidades de tipagem (Discrete Typing Units - DTUs) I-VI. O termo DTU foi proposto para descrever um conjunto de grupos que são geneticamente mais semelhantes entre si do que qualquer outro grupo, e são identificados por marcadores moleculares comuns (Zingales, Andrade *et al.*, 2009).

A existência de seis DTUs permitiu uma correlação direta com a divisão proposta por Brisse e colaboradores em 2000. Desta forma a linhagem *T. cruzi* I continuou sendo TcI, *T. cruzi* IIb seria TcII, *T. cruzi* IIc equivale a Tc III, *T. cruzi* IIa seria Tc IV, *T. cruzi* IId equivale a TcV e, por último, a linhagem *T. cruzi* IIe seria equivalente à linhagem Tc VI (Zingales, Andrade *et al.*, 2009). Alguns experimentos indicam que as DTUs de *T. cruzi* demonstram diferentes características de virulência e patogenicidade, no entanto, nenhum marcador genético demonstrou estar relacionado com a severidade da infecção.

Entre todas as DTUs de *T. cruzi*, TcI é o mais abundante e amplamente disperso nas Américas. TcI pode ser encontrado em toda a distribuição do vetor triatomíneo, e pode ser associado aos ciclos domésticos e silvestres. A infecção humana com TcI está concentrada no norte da América do Sul e na América Central, e está associada com a cardiopatia chagásica (Bosseno, Barnabé *et al.*, 2002; Montilla, Guhl *et al.*, 2002; Añez, Crisante *et al.*, 2004; Higo, Miura *et al.*, 2004; Sánchez-Guillén, Bernabé *et al.*, 2006).

TcII é encontrada predominantemente nas regiões sul e central da América do Sul, mas sua verdadeira extensão ainda precisa ser estudada. A TcII foi isolada principalmente em ciclos de transmissão domésticos, a maioria dos isolados reportados de TcII foram obtidos em fragmentos remanescentes da Mata Atlântica do Brasil, em primatas e esporadicamente em outras espécies de mamíferos. Tc II está associada com manifestações cardíacas, e pode apresentar concomitantemente megaesôfago e megacólon (Fernandes, Mangia *et al.*, 1999; Lisboa, Pinho *et al.*, 2007).

TcIII é geralmente associado com o ciclo silvestre no Brasil e em países vizinhos, e raras são as infecções humanas documentadas. TcIII está associado com o nicho terrestre, do oeste da Venezuela até o Chaco Argentino (Llewellyn, Lewis *et al.*, 2009; Marcili, Lima *et al.*, 2009). TcIII é ocasionalmente isolado de cães domésticos (Cardinal, Lauricella *et al.*, 2008). TcIV está distribuído basicamente na América do Sul e, diferentemente do TcIII, TcIV ocorre frequentemente em humanos e é a segunda causa de doença de Chagas na Venezuela (Miles, Cedillos *et al.*, 1981).

TcV e TcVI são duas DTUs híbridas associadas a doença de Chagas nas regiões Sul e Central da América do Sul. Genética Molecular comparativa provou que TcV e TcVI são híbridos de TcII e TcIII. TcV predomina na Argentina, Bolívia e Paraguai, enquanto TcVI predomina no Gran Chaco, sendo que pode desenvolver cardiopatia grave, e, em alguns casos megaesôfago e megacólon (Zingales, Stolf *et al.*, 1999; Brenière, Bosseno *et al.*, 2002; Diosque, Barnabé *et al.*, 2003; Freitas, Lages-Silva *et al.*, 2005).

TcI, TcII, TcVI são os principais agentes da doença de Chagas humana na América, e todos são capazes de causar cardiomiopatia, no entanto, apenas TcII, TcV e TcVI foram associados com as síndromes digestivas.

Estudos filogenéticos podem fornecer informações de grande importância epidemiológica, pois nos permitem entender melhor a estrutura populacional de *T. cruzi*, bem como explorar a origem dos polimorfismos genéticos observados nas linhagens distribuídas entre o ciclo silvestre e o ciclo doméstico do parasito (Brisse, Barnabé *et al.*, 1998).

## **2.2. O genoma do *Trypanosoma cruzi***

O genoma do *T. cruzi* foi publicado em 2005, sendo obtida a partir de um clone da cepa CL Brener. A cepa CL Brener é um membro do antigo subgrupo IIe, agora TcVI e foi escolhido para o sequenciamento genômico por ser bem caracterizado biologicamente e experimentalmente. O *T. cruzi* possui dois genomas distintos, situados em compartimentos bem definidos o núcleo e a mitocôndria, sendo o DNA mitocondrial (kDNA) encontrado numa estrutura peculiar chamada de cinetoplasto.

O conteúdo total de DNA composto pelo DNA nuclear e o kDNA do *T. cruzi* varia intensamente entre as diferentes cepas e clones, podendo ter implicações na organização genômica do parasito, como por exemplo, no número de repetições de determinados genes (Henriksson, Aslund *et al.*, 1996).

O sequenciamento completo do *T. cruzi* identificou a existência de 22.570 genes codificadores de proteínas, dos quais 12.570 formam pares alélicos. Desse total de proteínas, foi possível sugerir a função de 50,8% das sequências codificadoras com base na literatura e em resultados de similaridade com proteínas já caracterizadas, ou devido à presença de domínios funcionais característicos. Mais de 50% do genoma da cepa CL Brener corresponde a elementos repetitivos, constituindo de grandes famílias gênicas de proteínas de superfície, retrotransposons e repetições subteloméricas (El-Sayed, Myler *et al.*, 2005). Análises comparativas entre os genomas de *T. brucei* (Berriman, Ghedin *et al.*, 2005) e *Leishmania major* (Ivens, Peacock *et al.*, 2005) complementaram os conhecimentos sobre o genoma desses organismos.

Muitos genes estão presentes em duas ou mais cópias no genoma, que podem ser encontradas agrupadas ou dispersas e localizadas em um ou em diferentes cromossomos (Silveira, 2000). É importante ressaltar que as cópias de um determinado gene podem apresentar divergências entre si por consequência do processo evolutivo. O *T. cruzi* possui a tendência em duplicar e agrupar seus genes em tandem. Esta tendência pode ser explicada como sendo um mecanismo para evitar a perda de genes essenciais durante os vários ciclos celulares (Swindle & Tait, 1996). Ainda, a organização em tandem pode estar relacionada com a transcrição policistrônica existente em tripanossomatídeos, o que facilitaria a síntese e manutenção dos níveis de mRNAs na célula (Silveira, 2000).

O kDNA representa de 20-30% do DNA total dos tripanosomatídeos (Junqueira, Degraeve *et al.*, 2005) e é composto por 2 tipos de moléculas circulares que diferem em tamanho e função, os maxicírculos e os minicírculos, os quais estão interligados formando uma rede única (Simpson, Neckelmann *et al.*, 1987). De acordo com Teixeira (2007) a organização do kDNA lembra uma rede de pescar, onde a corda que puxa a rede seria o maxicírculo e as mechas finas da rede seria o minicírculo. Os maxicírculos são funcionalmente equivalentes ao DNA mitocondrial de eucariotos,

codificando genes para rRNAs mitocondrial e proteínas hidrofóbicas envolvidas na transdução de energia através da fosforilação oxidativa (Simpson, Neckelmann *et al.*, 1987).

Os minicírculos existem em milhares de cópias e possuem em média um tamanho de 1.4 kb e são compostos por quatro regiões conservadas intercaladas por 4 regiões variáveis (Lukes, Guilbride *et al.*, 2002). A região conservada carrega um bloco de sequência rico em CA (Carsb) que pode ser a origem da replicação, transcrição, recombinação e um sítio específico mediador da transferência de kDNA para o genoma do hospedeiro (Sturm, 2009). As sequências do minicírculo são transcritas em RNAs guias que auxiliam na editoração dos RNA (Madison-Antenucci, Grams *et al.*, 2002). A integração de kDNA do parasito no genoma da célula hospedeira tem sido documentada em mamífero e aves, nos quais fragmentos de sequências de minicírculos de kDNA integram em sítios de diversos cromossomos (Nitz, Gomes *et al.*, 2004; Hecht, Nitz *et al.*, 2010; Teixeira, Hecht *et al.*, 2011).

### **2.3. Expressão gênica em *Trypanosoma cruzi***

Os tripanossomatídeos possuem em geral as 3 RNA polimerases clássicas de eucariotos: a RNA polimerase I, que é responsável por transcrever os genes de RNAs ribossomais; a RNA polimerase II, transcreve o miniéxon e os RNAs mensageiros; a RNA polimerase III transcreve moléculas de RNA nuclear e de transferência.

Os genes dos tripanossomatídeos estão geralmente organizados em longos grupos ou clusters gênicos direcionais, que são co-transcritos em longas unidades policistrônicas e não apresentam interrupções por íntrons (Mair, Shi *et al.*, 2000). Esta organização dos genes de tripanossomatídeos sugere que o número de promotores destes organismos seja reduzido e que o controle da expressão gênica ocorra principalmente a nível pós-transcricional, baseada em mecanismos que controlam a estabilidade e a tradução dos mRNAs (Clayton, 2002).

Em tripanossomatídeos, os mRNAs são transcritos em unidades policistrônicas que deverão ser processados até mRNAs individuais e maduros, através de mecanismos de *trans-splicing* e poliadenilação (Agabian, 1990; Lebowitz, Smith *et al.*, 1993). O

*trans-splicing* foi inicialmente caracterizado em tripanossomatídeos em estudos sobre glicoproteínas variáveis de superfície (VSGs) de *T. brucei*, onde observaram que os mRNAs apresentavam aproximadamente 39 nucleotídeos na extremidade 5', denominada então de sequência líder - *spliced leader* (SL), ou miniéxon (Boothroyd e Cross, 1982; Nelson, Andrews *et al.*, 1983). Posteriormente, a presença de sequências homólogas de SL foi observada em transcritos de outros tripanossomatídeos como *T. cruzi* e *Leptomonas collosoma* (De Lange, Berkvens *et al.*, 1984).

Para a geração de um mRNA individual e maduro, uma sequência nucleotídica líder contendo 39 nucleotídeos (SL) é transferida para a extremidade 5' de cada RNA individual, em um sítio acceptor AG localizado à junção de um segmento de polipirimidinas e adquirem um caráter descontínuo devido à ligação de dois pré-mRNAs (Teixeira e Darocha, 2003). Uma vez reconhecido o sítio acceptor de SL, sugere-se que o complexo responsável pela adição da cauda de poliA seja recrutado para a proximidade do sítio acceptor do SL e este começa a examinar esta região intergênica na direção 3'-5' até identificar uma suposta sequência de adição da cauda de poliA (Liang, Haritan *et al.*, 2003). Deleções nos segmentos de polipirimidinas e no sítio acceptor AG impedem o correto processamento dos transcritos (Matthews, Tschudi *et al.*, 1994).

#### **2.4. Manipulação genética em *Trypanosoma cruzi***

Muito do que hoje se conhece sobre o processo de expressão gênica é resultado do desenvolvimento de técnicas de manipulação genética, baseada na inserção de genes exógenos (Teixeira e Darocha, 2003). As primeiras tentativas de manipulação genética em tripanossomatídeos foram complicadas, pois não se conhecia completamente como estes organismos regulavam sua expressão gênica. Na época, tinha-se evidenciado que a codificação de genes era submetida a transcrição policistrônica e que o *trans-splicing* da expressão dos transcritos resultava na adição de 39 nucleotídeos na sequência líder 5' para cada mRNA. Os primeiros experimentos de transfecção foram altamente empíricos, ocorrido na ausência de informações de onde a transcrição seria iniciada e quais sequências poderiam ser requeridas para o processamento de RNA. Um progresso preliminar foi alcançado nesta área por meio da transfecção de *Leptomonas seymouri* (Bellofatto e Cross, 1989) e *Leishmania enrietti* (Laban e Wirth, 1989), utilizando



eletroporação. Nestes experimentos, nenhuma tentativa foi feita para selecionar transformantes estáveis em vez, disso a inserção e expressão de um gene exógeno cloranfenicol transferase (*cat*) foi monitorada nos genes transfetados. Desde os primeiros experimentos de transfecção, a eletroporação permaneceu o método de escolha para a introdução de DNA exógenos em tripanossomatídeos, visto que na época nada se conhecia sobre RNA interferente e a utilização da eletroporação havia dado resultados satisfatórios em outros organismos (Kelly, 1997).

O primeiro estudo com transformação de tripanossomatídeo envolvendo o uso de vetores epissomais conferiu resistência a G418 em *Leishmania*, seguida pela expressão do gene de neomicina fosfotransferase (*neo*). Sequências flanqueadoras do gene de dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (Kapler, Coburn *et al.*, 1990) e do gene de  $\alpha$ -tubulina (Laban, Tobin *et al.*, 1990) foram usados em vetores plasmidiais. Dentro dos parasitos transformados, essas construções foram propagadas em múltiplas cópias extracromossomais, frequentemente formando grandes epissomas circulares compostas de repetições head-to-tail. Estudos seguintes mostraram que em *Leishmania*, origens específicas de replicação não são requeridas para a propagação do vetor e que a expressão dos genes transfetados não é dirigida por um promotor. Em vez disso, a iniciação da transcrição parece ser aleatória, com um sítio de uma sequência líder e um associado de um montante de polipirimidinas sendo requeridos para a expressão (Curotto De Lafaille, Laban *et al.*, 1992). Esta situação contrasta com *Trypanosoma brucei*, onde a expressão transiente dos epissomas é dirigida por um promotor (Clayton, Fueri *et al.*, 1990; Rudenko, Le Blancq *et al.*, 1990; Zomerdijk, Ouellette *et al.*, 1990).

Quando a integração do DNA transfetado dentro do genoma de *Leishmania* foi primeiramente reportado (Cruz e Beverley, 1990), esta mostrou ser mediada por recombinação homóloga. Este é o mecanismo predominantemente envolvido na transformação, quando um DNA linearizado contendo um marcador de droga selecionável flanqueada por uma sequência alvo apropriada é usado para eletroporação. Em *T. brucei*, a integração de um DNA vetor dentro do genoma de ambas as formas procíclica e sanguínea, poderia ser facilmente alcançada (Ten Asbroek, Ouellette *et al.*, 1990; Carruthers, Van Der Ploeg *et al.*, 1993).

A transfecção em *T. cruzi* foi primeiramente alcançada por eletroporação de epimastigotas utilizando a construção de um vetor de expressão transitória onde o gene cloranfenicol acetil transferase (*cat*) foi colocado à jusantede uma repetição intacta de um gene minixon (Lu e Buck, 1991). Estes experimentos demonstraram que a eletroporação é aplicável a *T. cruzi* e que os requerimentos para a expressão dos genes transfectados parecem ser mais similares a *Leishmania* do que a *T. brucei*.

A primeira transformação estável reportada para *T. cruzi* envolveu a utilização do vetor de expressão pTEX (Kelly, Ward *et al.*, 1992). Esta construção utilizando *neo* foi desenhada com sequências flanqueadoras derivadas de repetições em tandem do gene glicosomal gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase (gGAPDH) (Kendall, Wilderspin *et al.*, 1990). O número de cópias e o nível de expressão dos genes exógenos inseridos dentro do sítio múltiplo de clonagem poderiam ser aumentados significativamente pela cultura de células transformadas em meio contendo aumento nos níveis de G418. Isto ocorre provavelmente devido à vantagem seletiva conferidas as células filhas que tinham um número maior de cópias do vetor, um fenômeno que ocorre como um resultado da segregação randômica. O vetor pTEX poderia também ser usado para transformar *Leishmania*, mas não *T. brucei*. *T. cruzi* também foi capaz de suportar integração estável de DNA transfectado por meio de recombinação homóloga. Os primeiros experimentos reportados descrevem a ruptura direcionada do locus de poliubiquitina PUB12.5 (Hariharan, Ajioka *et al.*, 1993) e do gene TCR27 (Otsu, Donelson *et al.*, 1993), que codifica um antígeno contendo 14 aminoácidos repetidos. No último caso, embora os mutantes nulos fossem viáveis, eles cresciam mais lentamente dentro das células de mamíferos infectadas (Otsu, Donelson *et al.*, 1995).

O desenvolvimento de sistemas de transformação, tanto integrativo, como episomal para *T. cruzi* representou um importante avanço técnico que abriu o caminho para a aplicação de experimentos de genética reversa. A glicoproteína de superfície Gp72 foi uma das primeiras proteínas cuja função foi identificada utilizando estas técnicas de transfecção (Cooper, De Jesus *et al.*, 1993). Mutantes nulos foram caracterizados pelo fenótipo flagelar anormal, no qual a ligação à membrana celular do parasito foi interrompido. Isto foi associado a uma alta redução da habilidade de sobrevivência dentro dos insetos vetores triatomíneos. O papel de Gp72 foi confirmado pela reintrodução do gene em um vetor de expressão episomal. Isto resultou na

complementação do fenótipo mutante, incluindo a restauração da morfologia flagelar normal (Nozaki e Cross, 1994).

Genes que codificam para resistência a higromicina, fleomicina, puomicina e tunicamicina foram então adicionados a lista de marcadores estáveis avaliados para trabalhos com *T. cruzi*. No entanto, a principal limitação da tecnologia de transfecção apareceu desde o início. O tempo necessário para a geração de clones transformantes é de aproximadamente de 6-8 semanas, quatro vezes maior que o necessário para *Leishmania* e oito vezes maior que o requerido para a forma sanguínea de *T. brucei* (Kelly, Taylor *et al.*, 1995).

Para estender o repertório de vetores para transfecção de *T. cruzi* (Martínez-Calvillo, López *et al.*, 1997) modificaram o vetor de expressão pTEX por meio da inserção de 800 pb de um fragmento de DNA ribossomal a montante do múltiplo sítio de clonagem. O novo vetor (pRIBOTEX) encurtou em duas semanas o tempo requerido para a seleção de parasitos resistentes, e houve um modesto aumento nos níveis dos marcadores de expressão do gene. É interessante notar que este vetor não foi mantido como epissomal, mas integrado ao locus do DNA ribossomal. O nível de expressão alcançado pelo pRIBOTEX foi posteriormente aumentado pela inserção da região HX1 à jusante do promotor de rRNA, gerando um novo vetor denominado pTREX (Vazquez e Levin, 1999). HX1 é um sinal altamente eficiente para o processamento do mRNA por *trans*-splicing e é derivado do gene TcP2beta H1. O vetor pTEX também foi modificado para promover um método mais rápido de identificação de localização de proteínas subcelulares (Tibbetts, Klein *et al.*, 1995). Vetores de expressão epissomais foram modificados com a inclusão de sequências de proteínas fluorescentes verdes (GFP) ou vermelhas (RFP), que poderiam ser utilizadas para identificar localização subcelular de proteínas fusionadas, após a transfecção de parasitos (Wilkinson, Meyer *et al.*, 2002).

Em adição a estes vetores de expressão, um vetor cosmídeo (pcos-TL) foi produzido (Kelly, Das *et al.*, 1994). Os cosmídeos são plasmídeos modificados que permitem a clonagem seletiva de moléculas recombinantes contendo insertos de DNA entre 30 e 45 kb. Após a transfecção de *T. cruzi*, moléculas pcos-TL recombinantes foram mantidas em altos números de cópias como elementos extracromossomais

circulares. Genes contidos dentro destes insertos são co-expressos em altos níveis (Tomas, Miles *et al.*, 1997).

Em *T. brucei*, sistemas de expressão induzíveis foram construídos baseados na capacidade da proteína bacteriana repressora de tetraciclina (tetR) em bloquear a transcrição da T7 RNA polimerase de um promotor íntegro T7 na ausência de tetraciclina (Wirtz e Clayton, 1995; Wirtz, Leal *et al.*, 1999). A importação de maquinaria genética para expressão regulacional de tetraciclina nos parasitos foi necessária porque faltavam em tripanossomas promotores que poderiam ser facilmente adaptadas para este propósito.

Além do desenvolvimento de novos sistemas de vetores, alguns cuidados devem ser tomados para aumentar a eficiência e flexibilidade de processos de transformação de *T. cruzi*. Utilizando uma técnica com placa de agarose Mondragon e colaboradores (1999) foram capazes de otimizar as condições que permitiam o isolamento das colônias de parasitos em 21-28 dias. A expressão de GFP também tem sido utilizada para monitorar a eficiência da transfecção e outros parâmetros estão sendo otimizados para as transfecções como o tampão de eletroporação, a quantidade de DNA e a fase de crescimento utilizada no experimento (Ramirez, Yamauchi *et al.*, 2000). Com técnicas semelhantes, Da Rocha e colaboradores (2004) desenvolveram procedimentos que resultaram em mais de 8% de parasitos expressando fluorescência vermelha após a transfecção.

Recentemente, foi relatado que a estratégia *Multisite Gateway* poderia ser adaptada para aumentar a eficiência destes processos, particularmente quando utilizado em combinação com dispositivo de eletroporação AMAXA Nucleofector (Xu, Brandán *et al.*, 2009). O sistema de clonagem *Gateway*, que é baseado na recombinação em vez de ligação clássica com T4 ligase, também foi utilizado para facilitar a construção de uma série de vetores que podem ser utilizados para localização subcelular de proteínas de *T. cruzi* e para a purificação por afinidade de complexos de proteínas (Batista, Marchini *et al.*, 2010).

Outro processo que tem sido amplamente explorado como uma ferramenta de identificar a função de genes é o processo de RNA interferente. O *T. brucei* é particularmente capaz de realizar este processo de forma eficiente (Alsford e Horn,

2008). No entanto, apesar de diversas tentativas o RNAi não foi detectado em *T. cruzi* (Darocho, Otsu *et al.*, 2004). A razão para isto tornou-se clara quando as sequências do genoma dos tripanossomatídeos foram publicadas. O *T. cruzi* não possui os genes codificadores para o argonauta e para a Dicer (RNase III), genes estes relevantes para este processo, sendo incapaz de montar uma resposta RNAi para RNA de fita dupla (dsRNA) (Shi, Djikeng *et al.*, 2004).

Desde 1993 apenas 16 artigos foram publicados utilizando a técnica de nocaute gênico em *T. cruzi*. Após o primeiro experimento utilizando a técnica de nocaute, onde Cooper e colaboradores (1993) mostraram ser uma técnica possível em *T. cruzi*, os genes de calmodulina-ubiquitina (*cub*), Tc52, DHOD, TcGALE, TcSub2, CPSII foram estudados utilizando esta técnica. (Ajioka e Swindle, 1996; Allaoui, François *et al.*, 1999; Barrio, Van Voorhis *et al.*, 2007; Annoura, Nara *et al.*, 2005; Macrae, Obado *et al.*, 2006; Serpeloni, Moraes *et al.*, 2011).

Em 1998, Caler e colaboradores mostraram que a deleção do gene de oligopeptidase B resultava em um defeito na invasão celular e no estabelecimento da infecção em camundongos, visto que esta proteína está associada a mobilização de cálcio necessária para a invasão do parasito. Manning-Cela e colaboradores mostraram através do duplo nocaute de LYT1, que o produto deste gene está envolvido na lise celular e na infectividade do parasito. Em 2008, Wilkenson e colaboradores (2008) realizaram o nocaute simples de NTR e demonstraram que este era suficiente para causar no parasito uma significativa resistência a uma ampla variedade de drogas nitro-heterocíclicas, incluindo nifurtimox e benzonidazol. Hashimoto e colaboradores (2012) mostraram que o duplo nocaute de CPSII é viável e que é responsável pela significativa redução do crescimento do parasito (principalmente em amastigotas). Perez e colaboradores (2011) realizaram simples mutantes para o gene de *dhfr-ts*, e os mutantes demonstraram diminuição da virulência em camundongos. Estes parasitos foram capazes de conferir proteção contra futuras infecções com *T. cruzi*. Campos e colaboradores (2011) trabalharam com o gene MSH2 e identificaram sua função por meio do duplo nocaute deste gene que mostrou-se agir na resposta do parasito ao estresse oxidativo.

O duplo nocaute de genes como TcKAP3, MetIII, GT não possuem nenhum efeito ou quase nenhum efeito nos parasitos. TcKAP3 não possui nenhum efeito na proliferação, diferenciação e infectividade dos parasitos. MetIII não é necessário para o desenvolvimento de tripomastigotas metacíclico e não alteram o ciclo de vida dos parasitos. GT embora não tenha afetado o crescimento celular dos parasitos, mostrou-se capaz de afetar parcialmente a diferenciação e infectividade dos mesmos (Conte, Labriola *et al.*, 2003; Gluenz, Taylor *et al.*, 2007; De Souza, Rampazzo *et al.*, 2010).

### **3. Proteases**

As proteases ou peptidases são enzimas capazes de hidrolisar ligações peptídicas de proteínas ou oligopeptídeos em pequenos peptídeos e aminoácidos, modificando seus substratos causando consequências biológicas importantes (Barrett e Rawlings, 2001). As proteases são classificadas de acordo com a reação catalisada, a natureza química do sítio catalítico e divididas em dois grupos principais: as exopeptidases e as endopeptidases (Rao, Tanksale *et al.*, 1998).

As exopeptidases catalisam reações de hidrólise de aminoácidos das extremidades das cadeias protéicas podendo ser aminopeptidases ou carboxipeptidases. As aminopeptidases hidrolisam na região aminoterminal (N) da proteína podendo liberar um resíduo de um aminoácido (aminopeptidase), um dipeptídeo (dipeptidil peptidase) ou um tripeptídeo (tripeptidil peptidase). De forma similar as carboxipeptidases agem nas extremidades carboxiterminais (C) da cadeia polipeptídica. Já as endopeptidases são caracterizadas por catalisarem preferencialmente reações de hidrólise das ligações peptídicas localizadas nas regiões internas das proteínas.

As proteases podem ainda ser classificadas de acordo com o seu mecanismo catalítico. Hartley em 1960 foi o responsável por realizar a principal classificação das peptidases, reconhecendo 4 grupos que hoje são conhecidos como serino protease, cisteíno protease, aspártico protease e metalo protease. Recentemente, outros 2 grupos catalíticos foram reconhecidos: treonino protease (Seemüller, Lupas *et al.*, 1995) e glutâmico protease (Fujinaga, Cherney *et al.*, 2004). Algumas proteases, no entanto, ainda possuem seus processos catalíticos desconhecidos.

Uma importante ferramenta para o estudo de proteases é o sistema moderno de classificação proposta pelo MEROPS, que foi criado por Rawlins e Barrett em 1993 e tem sido aprimorado desde então. Se trata de um sistema que possui uma classificação baseada na homologia das proteases e reflete as similaridades nas estruturas moleculares e biológicas que derivam de relações evolucionárias (Rawlings, Rennebeck *et al.*, 2004). Este é um sistema hierárquico, onde as proteases são individualmente reconhecidas e então agrupadas em famílias e as famílias, por sua vez, são agrupadas em clãs.

As proteases são necessárias para a sobrevivência de todos os organismos vivos e são de grande importância para a humanidade nos campos da medicina, nutrição, agricultura e tecnologia (Barrett, Tolle *et al.*, 2003). Aproximadamente 2% dos genes codificam proteases em todos os organismos vivos. Estas enzimas catalisam uma série de processos biológicos importantes, como por exemplo, a coagulação sanguínea, apoptose, ativação e catabolismo de peptídeos bioativos, remodelagem tecidual e digestão de alimentos (Godofrey & West, 1996). Algumas proteases também estão envolvidas em algumas doenças como Alzheimer, cânceres, artrite reumatóide. Por isso, é bastante natural que as proteases representem um dos principais alvos de drogas da indústria farmacêutica atualmente.

Esta classe especializada de enzima desempenha diversas funções chave nos parasitos incluindo a invasão de células hospedeiras e tecidos, transição do ciclo de vida, desregulação hormonal, a degradação de mediadores da resposta imune e hidrólise de proteínas do hospedeiro para fins nutricionais (Grellier, Vendeville *et al.*, 2001; Klemba e Goldberg, 2002; Bastos, Motta *et al.*, 2010; Swenerton, Zhang *et al.*, 2011).

### **3.1. Dipeptidil aminopeptidase 8 / Dipeptidil aminopetidase 9**

A família das prolil oligopeptidases pertence à classe das serino peptidases, na qual se encontram a prolil oligopeptidase propriamente dita, a oligopeptidase B, a acylaminoacyl, a glutamyl endopeptidase C e as dipeptidil peptidases (DPPIV). Membros da família DPPIV são responsáveis pela remoção seletiva de dipeptídeo N-terminal com prolina ou alanina na segunda posição (Yaron e Naider, 1993; Busek, Malík *et al.*, 2004). A perda de um dipeptídeo N-terminal pode resultar na ativação,

inativação ou na modulação da atividade de peptídeos bioativos (Durinx, Lambeir *et al.*, 2000). Como a maioria dos hormônios peptídicos e neuropeptídeos possuem um ou mais resíduos de prolina, esta família de enzimas é útil para o processamento e degradação de tais peptídeos, como já sugerido em estudos anteriores sobre resposta imune e funções endócrinas (De Meester, Kestens *et al.*, 1995; Hegen, Kameoka *et al.*, 1997; De Meester, Korom *et al.*, 1999).

O grupo DPPIV pertence a subfamília S9B e comporta os membros: DPPIV, a proteína de ativação do fibroblasto (FAP), DPP8, DPP9 e as enzimas DPP6 e DPP10. DPPIV é o membro mais estudado da família e possui várias funções no metabolismo, imunidade, endocrinologia e biologia do câncer, sendo também um novo e bem sucedido alvo terapêutico da diabetes tipo 2 (Yu, Yao *et al.*, 2010). A DPPIV em mamíferos ocorre de duas formas: ancorada à membrana celular ou de forma solúvel (circulante). A forma ancorada é encontrada em diversos órgãos como fígado, intestino, rim, epidídimo e endotélio vascular, e também em células imunes, onde é conhecida como CD26 (Walborg, Tsuchida *et al.*, 1985; Darmoul, Lacasa *et al.*, 1992; Kettmann, Humbel *et al.*, 1992; Dubois, Van Ginneken *et al.*, 2009; Greischel, Binder *et al.*, 2010; Greischel & Binder 2011). Esta forma ancorada desempenha papel em reações autoimunes e diversas respostas celulares e cardiovasculares (Jackson, Dubinion *et al.*, 2008; Takasawa, Ohnuma *et al.*, 2010; Yu, Yao *et al.*, 2010; Ansorge, Nordhoff *et al.*, 2011; Pacheco, Crajoinas *et al.*, 2011; Shirakawa, Fujii *et al.*, 2011). A forma solúvel é encontrada em fluidos corporais, como sangue, soro, saliva e líquido seminal (Maes, Scharpé *et al.*, 1994; Ohkubo, Huang *et al.*, 1994) e desempenha um papel importante na regulação da glicemia (Ansorge, Nordhoff *et al.*, 2011). Os inibidores de DPPIV são capazes de prolongar o tempo de vida do hormônio glucagon-símile (glucagon-like-peptide 1 - GLP-1) e do peptídeo insulínico dependente da glicose (glucose dependent insulintropic peptide – GIP) (Mcintosh, Demuth *et al.*, 2005). O GLP-1 participa da regulação dos níveis endógenos de glicose, estimulando a liberação de insulina, inibindo a liberação de glucagon e retardando o esvaziamento gástrico. Desta forma, os inibidores de DPPIV melhoram a captação de glicose, diminuindo a glicemia em indivíduos com diabetes tipo 2 (Chen e Jiaang, 2011).

FAP é uma glicoproteína ligada à membrana e possui atividades endopeptidase e exopeptidase e é um membro pertencente a família DPPIV. Em geral, FAP está



ausente nos tecidos de adultos porém, ela é expressa em patologia que compreendem a remodelação de tecidos tais como tumores e doenças relacionadas ao fígado (Juillerat-Jeanneret e Gerber-Lemaire, 2009). Por essas razões, FAP vêm sendo investigado como possível alvo contra o câncer.

Os membros não enzimáticos desta família DPP6 (DPL1/DPX) e DPP10 (DPL2/DPY) são moduladores de canais de potássio voltagem dependentes em neurônios e são principalmente expressos no cérebro (Nadal, Ozaita *et al.*, 2003; Zaghera, Ozaita *et al.*, 2005; Chen, Ajami *et al.*, 2006; Clark, Kwon *et al.*, 2008). Embora sejam estruturalmente similares com DPPIV, DPP6 e DPP10 não possuem a serina catalítica e outros resíduos necessários para a atividade enzimática (Kin, Misumi *et al.*, 2001; Chen, Ajami *et al.*, 2006). Assim, eles são suscetíveis a exercer efeitos através de interações proteína-proteína, do mesmo modo que as enzimas DPPs que também possuem capacidades extra-enzimáticas (McNicholas, Chen *et al.*, 2009).

Comparado com FAP e DPPIV, relativamente pouco se sabe sobre DPP8 e DPP9 (Olsen e Wagtmann, 2002). Nem suas estruturas terciárias, ou seus substratos in vivo, ou sua função fisiológica foram seguramente estabelecidas. DPP8 e DPP9 demonstraram ter propriedades biológicas interessantes e, como DPPIV e FAP, parecem ser multifuncionais e possuem modos de ação enzimático e extra-enzimático (Yu, Yao *et al.*, 2010). Por causa da recém-descoberta que DPP8 e DPP9 possuem atividade enzimática semelhante à DPPIV é bastante provável que algumas funções atribuídas a DPPIV possam ser de fato atribuídas a DPP8 e/ou DPP9 (Yazbeck, Howarth *et al.*, 2009; Matheussen, Baerts *et al.*, 2011). Por exemplo, estudos envolvendo DPPIV em várias patologias como doenças inflamatórias do intestino, artrite reumática e esclerose múltipla foram realizados utilizando inibidores não seletivos de DPPIV. Suspeita-se que outras enzimas da família DPPIV poderiam ser responsáveis por esses efeitos da suposta inibição de DPPIV (Yazbeck, Howarth *et al.*, 2009).

DPP8 e DPP9 possuem a habilidade de clivar os substratos de DPPIV, GLP-1, NPY e o peptídeo YY in vitro (Bjelke, Christensen *et al.*, 2006; Frerker, Wagner *et al.*, 2007). Além disso, DPP8 pode clivar quatro quimiocinas (Proteína inflamatória 10, *Interferon-inducible T cell chemo-attractante* e fatores 1a e 1b derivado de célula estromal) (Ajami, Pitman *et al.*, 2008).

Estudos superexpressando DPP9 e DPP8 em células epiteliais HEK293T revelou papéis na adesão de células, em cicatrização *in vitro*, na migração de células e na proliferação e apoptose. No entanto, a superexpressão de DPP9 afetou o comportamento das células em uma gama mais ampla dos componentes da matriz extracelular do que DPP8 (Yu, Wang *et al.*, 2006). Apesar da proximidade de suas sequências, DPP8 e DPP9 exercem algumas diferenças em seus efeitos celulares, e podem ter diferentes funções e ligantes (Yu, Wang *et al.*, 2006; Yu, Ajami *et al.*, 2009).

A descoberta de que DPP8 e DPP9 são responsivas a espécies reativas de oxigênio pode fornecer uma indicação de uma função citoplasmática (Rettig, Garin-Chesa *et al.*, 1993) onde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é regulado, como na fosforilação, vias de sinalização, apoptose, câncer e função imune (Rhee, 1999; Hildeman, Mitchell *et al.*, 2003; Poole, Karplus *et al.*, 2004). Enquanto a superexpressão de DPP9 é associada a apoptose espontânea, a superexpressão de DPP8 e DPP9 elevam a indução da apoptose. Apoptose é um processo importante no remodelamento de tecidos, incluindo recuperação de lesão no fígado (Wright, Issa *et al.*, 2001). Em nível bioquímico a apoptose é um evento celular complexo que envolve atos coordenados de proteínas, algumas diferentes peptidases, nucleases, canais de íons associados à membrana e translocases de fosfolípídeos. As atividades de DPP8 e DPP9 são dependentes do estado redox de suas cisteínas, que pode levar a diferente regulação das vias de apoptose (J, Hm *et al.*, 2008). Além disso, sítios de fosforilação em DPP8 e DPP9 foram identificados utilizando o servidor NetPhos (Blom, Gammeltoft *et al.*, 1999) o que sugere a participação destas enzimas em sinalização celular. Essa hipótese é reforçada pelo estudo que mostra que a DPPIV citoplasmática pode ser fosforilada (Bilodeau, Fiset *et al.*, 2006).

Estudos envolvendo o uso de inibidores não seletivos CD26 em sistemas deficientes para CD26 reforçam que DPP8 e DPP9 são passíveis de desempenhar papéis imunes atribuídos a CD26, por exemplo, em proliferação *in vitro* (Von Bonin, Hühn *et al.*, 1998), artrite (Tanaka, Murakami *et al.*, 1997) e hematopoese (Jones, Adams *et al.*, 2003). Recentemente, houve mais evidências da função imune de DPP8 e DPP9, e seu potencial como alvo para doenças inflamatórias. DPP8 e DPP9 estão presentes em leucócitos e linhas celulares de leucócitos (Abbott, Yu *et al.*, 2000; Zagha, Ozaita *et al.*, 2005; Yu, Ajami *et al.*, 2009) mRNAs de DPP8 estão regulados positivamente em asma pulmonar induzida (Schade, Stephan *et al.*, 2008), e um inibidor de DPP8 e DPP9

atenua a proliferação de células T (Lankas, Leiting *et al.*, 2005) e suprimem a síntese de DNA em esplenócitos de camundongos selvagens e nocauteados para DPPIV (Reinhold, Gohl *et al.*, 2009).

O uso de inibidores nestes estudos sugeriu que enquanto a função no sistema imune de CD26 parece ser extra-enzimática, as funções imunológicas de DPP8 e DPP9 parecem ser enzimáticas, embora o mecanismo ainda precise ser elucidado. DPP8 poderia ser potencialmente liberado para o espaço extracelular durante a morte celular em lesões inflamatórias (Ajami, Pitman *et al.*, 2008). Além disso, DPP8 é expresso em células B durante a leucemia crônica, em vários tumores e em células T ativadas (Ajami, Abbott *et al.*, 2004). A capacidade de DPP8 e DPP9 de reagirem ao oxigênio podem ter um envolvimento na indução de apoptose de células T ativadas (Hildeman, Mitchell *et al.*, 2003).

### **3.2. Otubaina**

Outra protease de interesse deste estudo de mestrado é a otubaina, uma cisteíno protease que hidrolisa ligações peptídicas específicas de moléculas de ubiquitina. A seguir será descrita uma breve revisão bibliográfica sobre esta enzima

A ubiquitinação é uma das modificações pós traducionais mais versáteis e consiste na união covalente de uma (monoubiquitinação) ou várias (poliubiquitinação) moléculas de ubiquitina a um resíduo de lisina de uma proteína-alvo ou um substrato (Pickart, 2001; Glickman e Ciechanover, 2002). A ubiquitina é uma proteína de 76 aminoácidos altamente conservada entre as espécies podendo ser encontrada desde invertebrados até mamíferos, sendo extremamente estável permanecendo corretamente ligada a temperaturas superiores a 85°C e com uma ampla faixa de pH (6-13). A ubiquitina também faz parte de um sistema ubiquitina-proteassoma que é responsável pela degradação de mais de 80% de proteínas intracelulares normais e anormais (Wang e Maldonado, 2006). As proteínas a serem degradadas são identificadas, ubiquitinadas e entregues ao proteassoma, um complexo multiprotéico que degradará as proteínas marcadas e reciclará a ubiquitina (Wilkinson, 2000).

A marcação de uma proteína por ubiquitina ocorre por uma série de reações que envolve, no mínimo três tipos de enzimas, as ativadoras de ubiquitina ou E1, as conjugadoras de ubiquitina ou E2, e as ubiquitina ligases ou E3 (Pickart, 2001;

Weissman, 2001). Existem ainda os fatores E4, que fazem parte do processo global da via proteassomo-ubiquitina, e favorecem a extensão de uma cadeia de ubiquitina a partir de uma proteína monoubiquitinada (Hoppe, 2005).

Como na maioria dos processos regulatórios tal como a fosforilação, a ubiquitinação é uma reação reversível, devido à atuação de enzimas que desfazem esta modificação. Estas enzimas são conhecidas como deubiquinadoras (DUBs) e são responsáveis pelo resgate de proteínas que seriam degradadas pelo proteassomo, pela reciclagem de ubiquitina, pelo controle do tráfego proteico, e pelo processamento de moléculas precursoras de ubiquitina (Love, Catic *et al.*, 2007).

As DUBs podem ser divididas em cinco famílias de acordo com a estrutura de seus domínios, sendo 4 pertencentes ao Clan A das cisteíno proteases e uma família pertencente a metaloproteases dependente de zinco (Nijman, Luna-Vargas *et al.*, 2005). As DUBs pertencentes à família das cisteíno proteases são as ubiquitina carboxi-terminal hidrolases (UCHs), proteases ubiquitina específicas (USPs), proteases relacionadas com o tumor ovariano (OTUs), proteases com domínio proteico da doença Machado-Joseph (MJDs). Elas contêm uma díade ou tríade catalítica onde um resíduo His diminui o pKa da Cys catalítica, permitindo um ataque nucleofílico nas ligações isopeptídicas. Para completar a tríade, um Asp ou Asn se alinha e polariza o resíduo His, o que nem sempre é necessário para a atividade destas enzimas (Cotto-Rios, Békés *et al.*, 2012). As DUBs pertencentes à quinta família são as metaloenzima com o domínio JAB1/MPN/Mov34 (JAMM) que utilizam invariavelmente resíduos de His, Asp/Glu e Ser para coordenar dois íons de zinco para ativar uma molécula de água (Maytal-Kivity, Reis *et al.*, 2002; Tran, Allen *et al.*, 2003).

A superfamília OTU compreende um grupo de cisteíno proteases que tem homologia ao produto do gene do *tumor ovariano* das *Drosophila* (Makarova, Aravind *et al.*, 2000). Mais de 100 membros da família OTU já foram identificados incluindo proteínas de eucariotos, vírus e bactérias patogênicas. Dois membros desta família, conhecidos como OTUB1 e OTUB2, foram isolados de células HeLa (Balakirev, Jaquinod *et al.*, 2002). OTUB1 cliva a ligação do isopeptídeo em cadeias de poli-ubiquitina, mas não a ligação peptídica nas proteínas fusionadas com ubiquitina-GFP. A OTUB2 também foi capaz de clivar cadeias de poli-utibiquitina, mas apenas quando os cinco aminoácidos da região C terminal da proteína foram eliminados, sugerindo que a

região C-terminal pode funcionar na regulação da atividade da enzima. Zinc finger celular anti-NF- $\kappa$ B (Cezanne), que também pertence à família OTU, se mostrou capaz de clivar a ligação isopeptídica nas cadeias de poli-ubiquitina (Balakirev, Tcherniuk *et al.*, 2003). Estas proteínas contêm os resíduos Cys, His e Asp conservados. Estes resíduos são os que definem a tríade catalítica das cisteíno proteases (Makarova, Aravind *et al.*, 2000).

OTUB 1 mostrou-se envolvida na indução da anergia de linfócitos T CD4<sup>+</sup> por meio da interação com a proteína E3 ligase GRAIL, e que possui o papel de inibir a proliferação de células T. A OTUB1 regula o GRAIL, cuja expressão resulta na degradação de GRAIL e permite a proliferação de células T (Lin e Mak, 2007). Embora a otubaína seja uma DUB, ela promove a auto-ubiquitinação (K48) e a proteólise de GRAIL, e pode ser mediada por USP8, outra DUB. Consistente com sua habilidade em induzir a degradação de GRAIL por meio da poliubiquitinação da lisina 48, a otubaína promove a ativação das células T quando é superexpressa em células T de camundongos, enquanto a superexpressão de ARF1 (uma isoforma de OTUB1 que não possui o domínio OTU) inibe a ativação de células T (Soares, Seroogy *et al.*, 2004).

A primeira estrutura de uma proteína da superfamília OTU a ser cristalizada, foi a estrutura da OTUB2. Sua estrutura cristalográfica mostrou um dobramento típico das DUBs, com a fenda do sítio catalítico ocluída por uma conformação circular resultando em um buraco oxifênico, onde os resíduos que orientam e estabilizam a histidina do sítio ativo da OTUB2 são diferentes das outras cisteíno proteases. Esta reorganização do sítio ativo oferece uma possível explicação para a especificidade das otubaínas (Nanao, Tcherniuk *et al.*, 2004).

*Yersinia* codifica uma proteína quinase, YpkA (*Yersinia protein kinase A*), que interfere na transdução de sinais nas células do hospedeiro por controlar os níveis celulares de fosforilação (Galyov, Håkansson *et al.*, 1993; Hartland e Robins-Browne, 1998). Por meio da análise de espectrometria de massa, Juris e colaboradores (2006) mostraram que um possível substrato para o YpkA seria a OTUB1. A identificação da OTUB1 como substrato de YpkA sugere que esta seria capaz de induzir anergia em macrófagos suprimindo a fagocitose e favorecendo a sobrevivência da *Yersinia*. Além disso, Edelmann e colaboradores (2010), demonstraram que a susceptibilidade de

invasão de *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*, é dependente da atividade catalítica de OTUB1 e de sua habilidade em estabilizar a forma ativa de RhoA (membro da família gênica homóloga às ras A). Eles demonstraram que YpkA e OTUB1 modulam a estabilidade de RhoA de formas opostas, levando, portanto, ao rearranjo do citoesqueleto que pode estar envolvido na entrada da bactéria.

Xie e colaboradores (2007) observaram uma mudança significativa na expressão de OTUB1 e outras proteínas em células após tratamento com cicloporia A (CsA), um inibidor da replicação do vírus da hepatite B (HBV) *in vitro*. Sabe-se que a ubiquitina pode se ligar fracamente a CsA, mas se existe uma interação entre a replicação do HBV e a OTUB1, esta ainda permanece desconhecida e precisa ser melhor estudada. Xia e colaboradores (2008) também identificaram por espectrometria de massa comparativa, a presença de OTUB1 em corpus de Lewy, um marcador histológico de alterações degenerativas causado por doenças, porém permanece obscuro o envolvimento patológico desta enzima em doenças neurodegenerativas.

Estudos recentes mostraram que a OTUB1 de humanos também tem um papel que é independente de seu sítio catalítico. Nakada e colaboradores (2010) descobriram que a OTUB1 é um modulador fisiológico do reparo do DNA. De forma surpreendente, a OTUB1 inibe a resposta de quebra da dupla-fita do DNA independentemente de sua atividade catalítica (Blackford e Stewart, 2011). OTUB1 inibe a resposta a danos no DNA bloqueando a transferência de ubiquitina pela UBC13, a enzima cognitiva E2 para RNF168. OTUB1 também inibe as E2s das famílias UBE2D e UBE2E (Juang, Landry *et al.*, 2012).

Além disso a OTUB1 se mostrou importante regulando a atividade e expressão de p53. OTUB1 suprime a ubiquitinação de MDM2 em células e *in vitro*. A superexpressão de OTUB1 estabiliza e ativa p53, levando a apoptose e inibindo o marcador de proliferação celular de uma maneira dependente de p53. Este efeito é independente de sua atividade catalítica, porém requer o resíduo Asp88. Mutações neste resíduo, anulam a atividade de OTUB1 em suprimir a ubiquitinação de p53 (Sun, Challagundla *et al.*, 2012).

A participação de ubiquitina na via de degradação de proteínas pelo proteossomo em *T. cruzi* foi sugerida por estudos que mostraram um grande aumento no nível de

proteínas ubiquitinadas quando os tripomastigotas se diferenciam em amastigotas. A análise de proteínas do citoesqueleto de *T. cruzi* demonstraram um aumento na conjugação de ubiquitina nas proteínas flagelares durante a diferenciação de tripomastigotas para amastigotas. Também foi observado um acúmulo de proteínas ubiquitinadas na presença de lactacistina, um inibidor de proteassoma específico (Diego, Katz *et al.*, 2001). Além disso o genoma de *T. cruzi* possui mais de 100 sequências que codificam para ubiquitinas, um número muito superior que o encontrado em outros organismos.

O processo de ubiquitinação/proteassoma vem sendo estudado em tripanossomatídeos, porém ainda com poucas enzimas e substratos caracterizados (revisado por Huang e Burlingame, 2005; Alvarez, Niemirowicz *et al.*, 2012). O primeiro estudo de enzima de deubiquitinação de tripanossomatídeos foi realizado pelo nosso grupo de pesquisa, com a caracterização bioquímica, celular e estrutural de uma OTUB de *Leishmania chagasi* (Guido, 2011).

# **JUSTIFICATIVA**



## JUSTIFICATIVA

As doenças tropicais negligenciadas são causadas por agentes infecciosos (fungos, vírus, bactérias, protozoários, e helmintos) que são endêmicos em populações de baixa renda. Elas possuem ainda tratamento ineficaz, e que não instigam o interesse das autoridades, ou de indústrias farmacêuticas, pois atingem em sua maioria populações de países pobres. A falta de investimento nas áreas de saneamento básico, tratamento de água e serviços de saúde, associadas a moradias inadequadas e desnutrição são fatores que aumentam a vulnerabilidade das populações às essas infecções.

Durante 1975-2004, apenas 21 (1,3%) dos 1556 medicamentos aprovados, foram desenvolvidos especificamente para atender as doenças negligenciadas, embora estas representem 11,4% do total de doenças globais (Chirac e Torreale, 2006). Destes, apenas dois eram destinados à doença de Chagas, os já conhecidos nifurtimox e benzonidazol, que apresentam sérios efeitos colaterais e baixa eficácia para a fase crônica da doença, sendo utilizados para o tratamento desde os anos 70 do século passado. Devido a este panorama, diversos grupos de pesquisadores tem se esforçado para identificar e validar alvos no *T. cruzi* com potencial terapêutico para doença de Chagas. Dentre os alvos candidatos, várias enzimas do metabolismo e proteases do parasito têm tido destaque.

Dentre essas potenciais proteases, podemos destacar a DPP8 e a otubaína. Até agora pouco se sabe sobre o papel destas proteases em tripanossomatídeos, e sobre suas funções no *T. cruzi*. Entender estas funções e um possível papel na infecção poderia validá-las como possíveis alvos para novas drogas.

A utilização de nocaute em *T. cruzi* já se mostrou possível, porém é um processo complexo que demanda muito tempo e trabalho, o que desestimula as pesquisas com tal estratégia. Visto que o *T. cruzi* não possui a maquinaria necessária para processamento de RNAi, o nocaute se torna o processo mais viável para compreender e validar o papel de diversas proteínas. Neste panorama nós iniciamos o estudo funcional de otubaína e DPP8 por meio de nocaute gênico para elucidar o papel destas proteínas na patogenia da doença de Chagas.

# OBJETIVO

## OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo deletar os genes da DPP8 e/ou otubaína e avaliar a importância dos mesmos na biologia e no ciclo de vida do *T. cruzi*, para assim entender seu papel na patogenicidade da doença de Chagas.

Para alcançar este objetivo, as seguintes etapas foram traçadas:

- ⤴ Realizar a análise comparativa genômica das sequências disponíveis de cada gene;
- ⤴ Construir os cassetes contendo os genes que conferem resistência à neomicina e higromicina;
- ⤴ Sequenciar os cassetes;
- ⤴ Obter os mutantes simples através da seleção de clones resistentes à G418;
- ⤴ Realizar o mapeamento físico da presença de *neo*;
- ⤴ Analisar a taxa de crescimento dos mutantes e
- ⤴ Avaliar a infectividade dos parasitos transfectados em cultura de células.

# **METODOLOGIA**

## **METODOLOGIA**

### **Análise genômica comparativa**

O genoma da cepa CL-Brener de *T. cruzi* depositado no site [www.genedb.org](http://www.genedb.org) foi analisado quanto ao número de cópias de genes possíveis de serem nocauteados. Os genes que codificam para as proteínas DPP8 e otubaína foram alinhadas utilizando o programa o EMBOSS Needle no site: [http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_needle/nucleotide.html](http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html), que realiza o alinhamento entre duas sequencias utilizando o algoritmo Needleman-Wunsch.

### **Cultura de células**

Epimastigotas de *T. cruzi* da cepa CL-Brener foram cultivados de forma axênica em meio Liver Infusion Tryptone (LIT) suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino inativado (SFB) e 100µg/mL de gentamicina a 28°C.

Tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* foram cultivados por infecção de células L6 em meio DMEM (Meio Eagle modificado Dulbecco) suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino inativado e 100µg/mL de gentamicina incubadas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

### **Extração de DNA genômico**

O DNA genômico de *T. cruzi* foi extraído utilizando 1 x 10<sup>8</sup> epimastigotas coletados por centrifugação a 3600 x g por 10 minutos, lavados em PBS e ressuspendidos em 1 mL de tampão de lise. A amostra foi incubada com 100µg/mL de proteinase K por 16 horas a 50 °C. Igual volume de fenol/clorofórmio foi adicionado à amostra que foi centrifugada a 13000 x g por 10 minutos. A fase superior foi transferida para um tubo novo que foi novamente submetida à extração utilizando volume igual de fenol/clorofórmio e posteriormente com volume igual de clorofórmio. Em seguida o DNA genômico foi precipitado utilizando dois volumes de etanol 95% gelado e 1/10 de volume de acetato de sódio 3M pH 4,8. A amostra foi então homogenizada e incubada por 1 hora a -20°C e então centrifugada a 13000 x g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 500µL de etanol 70 % gelado e novamente centrifugado por 5 minutos a 13000 x g e 4°C. O sobrenadante foi

novamente descartado e o precipitado foi seco a temperatura ambiente e ressuspenso em 50 µL de tampão Tris-EDTA (TE).

### Iniciadores utilizados para as PCRs

Os iniciadores para as UTRs dos genes *otutc* e *dpp8tc* e para os genes adjacentes dos respectivos genes foram desenhados utilizando a sequência do clone CL Brenner depositada no site [www.genedb.org.br](http://www.genedb.org.br). Os iniciadores para o gene de resistência a G418 foram desenhados a partir da sequência do plasmídeo *pcdna-neo*. Os iniciadores foram sintetizados pela INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES (IDT) e diluídos em água milliQ na concentração de 100 µM, e subestocados na concentração de 10 µM.

Todos os iniciadores estão representados na Tabela 1.

**Tabela 1. Sequencia dos iniciadores utilizados para as PCRs**

	Iniciador	Sequencia
1	5'UTR Senso DPP	5' – GCGGCCGCCCCTTCCGCAGACGCATCCAGA – 3' a
2	5'UTR Antisenso DPP	5' – AGATCTggatecCTCGAGCACTGAAGACATCCCAACCCTCT – 3' b c d
3	3'UTR Senso DPP	5' – CTCGAGggatecAGATCTGTGAGATCCACCCACAACCTTA – 3' b c d
4	3'UTR Antisenso DPP	5' – GCGGCCGCGCAGAAGGTCAGCAGGACAG – 3' a
5	5'UTR Senso OTU	5' – GCGGCCGCGTGTGCTTGCAGCGAGTTTGG – 3' a
6	5'UTR Antisenso OTU	5' – AGATCTggatecCTCGAGGGAAGTCATGGATGCTGCCTT – 3' b c d
7	3'UTR Senso OTU	5' – CTCGAGggatecAGATCTCATTATCCTGCTCCAAAATTGTAAGC – 3' b c d
8	3'UTR Antisenso OTU	5' – GCGGCCGCCCCTTTTCCACTTTTCTCTAAGCG – 3' a
9	NEO Senso	5' – CTCGAGATGATTGAACAAGATGGATTGC – 3' d
10	NEO Antisenso	5' – AGATCTTCAGAAGAAGTTCGTCAAGAAGG – 3' b
12	Rsnodpp	5' – GGCATCAGCGTCACTATCTAACG – 3'
13	Fhipdpp	5' – GCGCTGCATGGCACGACTCATTG – 3'
14	Rmyotu	5' – CCACAGCGATGTCAAGTTCCGC – 3'
15	Fhipotu	5' – GGAAGTGCAGGATGCCTCAGAGG – 3'

<sup>a</sup> As sequencias em vermelho equivalem a um sítio de restrição para a enzima *NotI*.

<sup>b</sup> As sequencias sublinhadas indicam o sítio de restrição da enzima *XhoI*

<sup>c</sup> As sequências em letra minúscula representam o sítio de restrição da enzima *Bam*HI

<sup>d</sup> As sequências em negrito correspondem ao sítio de restrição da enzima *Bg*III

### **Obtenção dos cassetes**

O cassete foi construído utilizando a sequência dos genes de *dpp8tc* e *otutc* disponíveis no site [www.genedb.org.br](http://www.genedb.org.br). Primeiramente as regiões 5' UTR e 3'UTR de cada gene foram amplificadas separadamente utilizando 0,2 unidades de Taq DNA polimerase (Fermentas) e seu respectivo tampão adicionados a 25µM de dNTP, 0,1µM de iniciadores, 80ng de DNA de *T. cruzi* cepa CL Brenner, 1,25mM de MgCl<sub>2</sub> em um volume final de 50µL sob as seguintes etapas: 94°C por 3 min para desnaturação inicial do DNA e 35 ciclos à 94°C por 30 s, anelamento dos iniciadores à 55°C por 30 s, extensão à 72°C por 1 min e 30 s, seguidos de 10 min de extensão final à 72°C. Uma segunda PCR foi realizada utilizando os produtos de cada PCR das UTRs como molde a fim de unir os dois fragmentos gerando produto contendo as regiões 5' UTR e 3'UTR unidas por um fragmento contendo alguns sítios de restrição. Este fragmento resultante da ligação das UTRs foi então clonado.

### **Eletroforese em gel de agarose**

Para a realização de eletroforese em gel de agarose, as amostras foram aplicadas em gel contendo 0,8% ou 1,2% de agarose, dependendo do tamanho da amostra, corados com brometo de etídeo na concentração de 1µg/mL. A amostra foi dissolvida em tampão de amostra 1X (azul de bromofenol 25%, xileno cianol 25%, Tris 50mM pH 7,6 e glicerol 6%) e corrida usando o sistema de eletroforese horizontal com o tampão Tris-acetato 1X (Tris 17,8mM, Na<sub>2</sub> EDTA 1mM pH 8,0 e ácido acético 0,1%), sob 90V constante. Para analisar o tamanho das bandas de DNA, o marcador 1 Kb DNA ladder Invitrogen, com bandas diferenciadas entre 100 pb e 12 Kb, foi utilizado como padrão.

### **Clonagem dos fragmentos**

Os produtos de amplificação obtidos nas PCR de ligação das UTRs foram ligados a um vetor de clonagem pGEM®-T Easy (Promega) que possui em cada uma de suas extremidades uma cauda de timina livre complementar à adenina inserida pela Taq DNA polimerase na região 3' do fragmento amplificado, durante a etapa de extensão final. Este vetor possui ainda um gene de resistência a ampicilina como marcador de

seleção e o gene que codifica a enzima  $\beta$ -Galactosidase como gene repórter, onde está localizado um sítio múltiplo de clonagem. A quantidade de DNA necessária para a clonagem foi calculada utilizando a fórmula:

$$\frac{\text{ng de vetor} \times \text{tamanho do inserto em Kb}}{\text{tamanho do vetor em Kb}} \times \text{Razão inserto : vetor (3:1)} = \text{ng de inserto}$$

Para a clonagem foi utilizado 5  $\mu$ L de tampão T4 DNA Ligase 2X, 3 unidades de T4 DNA ligase, 50 ng de vetor, a quantidade de inserto indicado pela fórmula (48 ng de inserto), e água MilliQ para um volume final de 10  $\mu$ L. As reações de clonagem ocorreram por 16 h a 8°C gerando os vetores *pgem-utrsdpp8tc* e *pgem-utrsotutc*, com as regiões 5'UTR + 3'UTR do gene *dpp8tc* e com as regiões 5'UTR + 3'UTR do gene *otutc*, respectivamente.

### **Digestão dos vetores com enzimas de restrição**

Para a construção do cassete contendo o gene *neo* flanqueado pelas regiões 5' UTR e 3' UTR, os vetores *pgem-utrsdpp8tc* e *pgem-utrsotutc* e o vetor do gene de resistência a neomicina (já estava clonado em um vetor pGEM) *pgem-neo*, foram digeridos primeiramente com *Bgl*III usando 1 unidade de enzima para cada 1  $\mu$ g de vetor na presença do tampão indicado pelo fabricante a 37 °C por 2 horas ou 16 horas. Após essa primeira digestão os vetores foram analisados em gel de agarose 0,8% e depois purificados usando o kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), e então foram digeridos com a enzima *Xho*I de forma similar, e em seguida essa nova digestão foi analisada em gel de agarose 0,8%. O inserto liberado do vetor *pgem-neo* foi ligado nos vetores *pgem-utrsdpp8tc* e *pgem-utrsotutc* formando os vetores *pgem-5'neo3'dpp8tc* e *pgem-5'neo3'otu*.

### **Transformação em bactérias competentes**

Bactérias competentes de *Escherichia coli* XL1 Blue (100  $\mu$ L) foram incubadas com 2  $\mu$ L de ligação e colocadas no gelo por 45 min. Após esse período as células foram submetidas a choque térmico de 42°C por 1 min e incubação por 2 min no gelo, seguido de adição de 1 mL de meio LB (Luria-Bertani) e colocadas sob agitação constante por 1



h a 37°C. A amostra foi então plaqueada em placas seletivas de meio LB ágar contendo 100µg/mL de ampicilina, 80µg/mL de X-Gal e 0,5mM de IPTG. As placas foram incubadas por 16 horas a 37°C. As colônias brancas crescidas nestas condições foram analisadas por PCR de colônia.

### **PCR de colônias de bactérias transformadas**

A análise de transformantes foi realizada por PCR utilizando o DNA direto das colônias obtidas. Dez colônias foram coletadas parcialmente com o auxílio de uma ponteira estéril sendo transferidas para um tubo contendo 10µL de água MilliQ e para a superfície de uma placa contendo meio LB ágar com 100µg/mL de ampicilina para a obtenção de uma réplica das colônias analisadas. Os tubos contendo as colônias foram aquecidos por 5 min a 95°C e então submetidos a PCR utilizando 0,1 unidades de Taq DNA polimerase (Fermentas), tampão 1X da enzima, 12,5µM de dNTP, 0,1µM de iniciadores, 0,63mM de MgCl<sub>2</sub> gerando um volume final de 25µL. O ciclo foi realizado utilizando as mesmas condições citadas anteriormente e em seguida analisado em gel de agarose 0,8%.

### **Sequenciamento**

O sequenciamento dos vetores *pgem-5'neo3'dpp8tc* e *pgem-5'neo3'otutc* foi realizado pela empresa Genomic Engenharia Molecular. Os primers utilizados foram os T7 forward e SP6. Os resultados obtidos foram analisados utilizando o programa EMBOSS Needle disponibilizado no site: [http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_needle/nucleotide.html](http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html), que realiza o alinhamento entre duas sequências utilizando o algoritmo Needleman-Wunsch.

### **Extração plasmidial**

As colônias contendo o inserto do tamanho esperado foram crescidas por 16 h a 37 °C em 3 mL de meio LB líquido contendo 100 µg/mL de ampicilina para realização de preparação de DNA plasmidial em pequena escala (miniprep) e posterior digestão com enzimas de restrição para confirmação do inserto. Os clones de interesse foram inoculados em 3 ml de meio LB líquido contendo antibiótico ampicilina (100 µg/ml, concentração final) para a seleção do plasmídeo e incubadas durante 20 hs sob agitação

constante a 37°C. As células foram coletadas através de centrifugação a 13.000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi descartado. Ao sedimento resultante foram adicionados 200 µl de tampão TE (10 mM TRIS - 1 mM EDTA) gelado, que foi incubado por 5 min no gelo. A seguir foi realizado a lise alcalina pela adição de 360 µl da solução de NaOH/SDS fresca, e homogeneizada por inversão. Após incubação no gelo por 5 min, foi adicionado 300 µl de acetato de sódio 3 M pH 4,8, homogeneizando-se novamente por inversão, seguido por incubação no gelo por 5 min. A amostra foi então centrifugada por 15 min à 15.000 rpm e 4°C, e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo onde foi adicionado 750 µl de isopropanol. As amostras foram homogeneizadas gentilmente e incubadas a temperatura ambiente por 5 min. Após este período as amostras foram submetidas à centrifugação por 15 min a 15.000 rpm a 25°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em 200 µl de tampão TE e adicionado 110 µl de acetato de amônio 7,5 M, e após agitação foi centrifugado por 15 min a 15.000 rpm a 25°C. O sobrenadante foi recuperado em um tubo estéril onde foi adicionado 750 µl de etanol 100% gelado e então incubado durante a noite ou por 20 min à -20°C. As amostras foram centrifugadas por 15 min a 15.000 rpm e 4°C e os sobrenadantes descartados. O precipitado foi lavado (em ressuspensão) com 1 mL de etanol 70% gelado, centrifugado por 5 min a 15.000 rpm e 4°C. Após secagem por exposição ao ar por 5 min, as amostras foram ressuscitadas em 50 µl de água MilliQ com RNase A (1 µl de RNase A 10mg/mL para 50 µl de água) e incubadas a 37°C por 30 min. O DNA plasmidial foi estocado a -20°C até o uso. Após confirmação do inserto a colônia foi pré-inoculada em 3 mL de meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina por 4 h a 37°C em agitação, e posteriormente crescida em 200 mL de meio LB contendo 100µg/mL de ampicilina por 16 h a 37°C em constante agitação para extração de DNA plasmidial utilizando o kit *midiprep Hipure Plasmid DNA purification* (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante.

### **Transfecção dos parasitos**

Foram realizadas 3 transfecções, uma contendo o inserto *5'neo3'dpp8tc*, outra contendo o inserto *5'neo3'otu*, e um controle contendo apenas PBS estéril. Para cada transfecção, foram coletados  $3 \times 10^8$  epimastigotas de *T. cruzi* da cepa CL-Brenner por meio de centrifugação por 10 min a 3600 x g. Estes parasitos foram então lavados 2 X com PBS estéril e por fim lavados 1 X com CITOMIX gelado (120 mM KCl, 0,15 mM

CaCl<sub>2</sub>, 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM HEPES, 2 mM EDTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH final de 7,4). Após essas lavagens os parasitos foram ressuspendidos em 500µL de CITOMIX gelado, colocados em cubetas de 0,4 cm de espessura e adicionados 50µg de cada cassete previamente purificado e 50µL de PBS estéril gelado para o controle. Estas amostras foram então eletroporadas com dois pulsos de 500 µF, 1,5 kV e resistência (Ω) ao infinito através do *Bio-Rad Gene Pulser*. Imediatamente após a eletroporação os parasitos foram transferidos para garrafas de cultura de 50 mL contendo 10 mL de meio LIT condicionado e 10% de SFB e 100 µg/mL de gentamicina e incubados a 28°C durante 48 h. Após este período os clones foram selecionados com 200 µg/mL de G418 (Gibco) no meio LIT. As culturas foram repicadas regularmente com adição do antibiótico de seleção G418 até que fosse observada a inibição total do crescimento celular e morte dos epimastigotas da cultura controle. Estas células foram selecionadas em um intervalo de 15-20 dias.

### **Análise por PCR dos parasitos selecionados**

Os parasitos selecionados foram submetidos a PCR para confirmação da deleção de ao menos um alelo dos genes de interesse. As PCRs foram realizadas diretamente da cultura de parasitos, sendo necessário  $1 \times 10^5$  parasitos. Estes parasitos foram lavados três vezes com PBS estéril e lisados com 1% de Tween-80 (v/v), para terem seu DNA como molde. Foram desenhados primers a partir das sequências dos genes adjacentes, que foram utilizados para corroborar a correta localização do inserto. Os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

### **Taxa de crescimento**

Formas epimastigotas de *T. cruzi* selvagens e nocauteadas para os genes de otubaína e DPP8 foram inoculados em placa de 24 poços com 10.000 parasitos por mL de meio LIT adicionado ou não do antibiótico de seleção G418. A contagem das culturas foi realizada diariamente em câmara de Neubauer durante 5 dias, utilizando microscópio invertido. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados obtidos através da media dos três poços. O gráfico comparativo da curva de crescimento entre o selvagem e os nocauteados foi obtido utilizando o programa Microsoft Excel.

### **Diferenciação de tripomastigotas**

As formas tripomastigotas foram obtidas através de diferenciação *in vitro*, utilizando formas epimastigotas em final de fase exponencial. A cultura destes parasitos foi centrifugada a 3600 x g por 10 minutos a 25°C e ressuspensa em meio DMEM, e colocadas em garrafas de cultura de 250 mL que continham células L6 em 50-70% de confluência cultivadas em meio DMEM. Após 48 horas as células L6 foram lavadas 3 X com meio DMEM, e recolocadas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após cerca de 110 horas da infecção de células L6 com formas epimastigotas, ocorreu a liberação de formas tripomastigotas. Estas formas foram então utilizadas para a expansão do cultivo em células L6 na razão de 20 parasitos por célula. Este procedimento foi realizado com formas epimastigotas nocauteadas para os genes de otubaina e DPP8.

### **Teste de atividade enzimática**

O teste de atividade enzimática foi feito com os mutantes para DPP8, já que apenas este tem seu substrato fluorogênico bem descrito. A atividade enzimática para detecção da DPP8 nos parasitos selvagem e mutantes nulos para *dpp8tc* foi detectada por meio da incubação de seus extratos solúveis com o substrato fluorogênico Gly-Pro-AMC nas condições descritas por Bastos e colaboradores (2005) e Garcia e colaboradores (1998).

### **Teste de infecção *in vitro***

Para analisar a capacidade infectiva dos mutantes *in vitro*, estes foram testados em culturas contendo células L6 em placa de 24 poços. Os testes foram realizados em triplicata para cada parasito mutante e para o selvagem. As células foram colocadas para crescer 24h antes do experimento na proporção de 5 x 10<sup>4</sup> células por poço. Em cada poço foi acrescido 1 x 10<sup>6</sup> de formas tripomastigotas. Após 3 horas, os poços foram lavados três vezes com meio de cultura, e as células mantidas por 72-96 horas. Para observar o número de células infectadas, a placa foi corada com Giemsa e as células foram identificadas por seus núcleos. Foram contadas aproximadamente 500 células e a presença de formas amastigotas dentro da célula caracterizava uma célula infectada. A porcentagem de célula infectada foi dada a partir da contagem de células infectadas e

não infectadas em cada poço, e comparadas com a porcentagem de infecção do selvagem.

### **Análise estatística**

Os dados dos parâmetros avaliados foram expressos como média e desvio-padrão, sendo o teste t de *Student* independente aplicado para detectar diferenças entre os grupos.

# RESULTADOS

**RESULTADOS**

**Avaliação da viabilidade do nocaute físico**

O primeiro passo deste trabalho foi analisar o genoma de *Trypanosoma cruzi* da cepa CL-Brenner disponível no site [www.genedb.org](http://www.genedb.org), a fim de observar o número de cópias que cada gene de interesse continha. Desta forma, foi constatado que os genes *dpp8tc* e *otutc* apresentam duas sequências depositadas no banco de dados cada. Estas sequências foram analisadas por meio de alinhamento quanto à identidade com o auxílio do programa EMBOSS Needle. Observamos uma identidade de 94,7% (Figura 3) entre as duas sequências para *otutc* e 96,2% para as de *dpp8tc* (Figura 4) indicando que são dois alelos para cada gene, o que viabiliza a realização de nocaute físico.



**Figura 3. Alinhamento das sequencias *otutc* disponíveis no genedb. OTU1 corresponde ao gene com o código [TcCLB.507047.110](#), enquanto OTU2 corresponde ao gene com o código [TcCLB.509179.150](#). As sequências sublinhadas correspondem aos iniciadores desenhados nas regiões 5' e 3'UTR.**

#####
# Program: needle
# Length: 3304
# Identity: 3180/3304 (96.2%)
# Similarity: 3180/3304 (96.2%)
# Gaps: 35/3304 (1.1%)
# Score: 15460.0

Table with 3 columns: DPP1, DPP2, and sequence alignment. It shows a pairwise comparison of two DNA sequences, with positions 1 to 3304. The alignment is nearly perfect, with only a few gaps indicated by dashes. The scores for each alignment step are listed on the right side of the table.



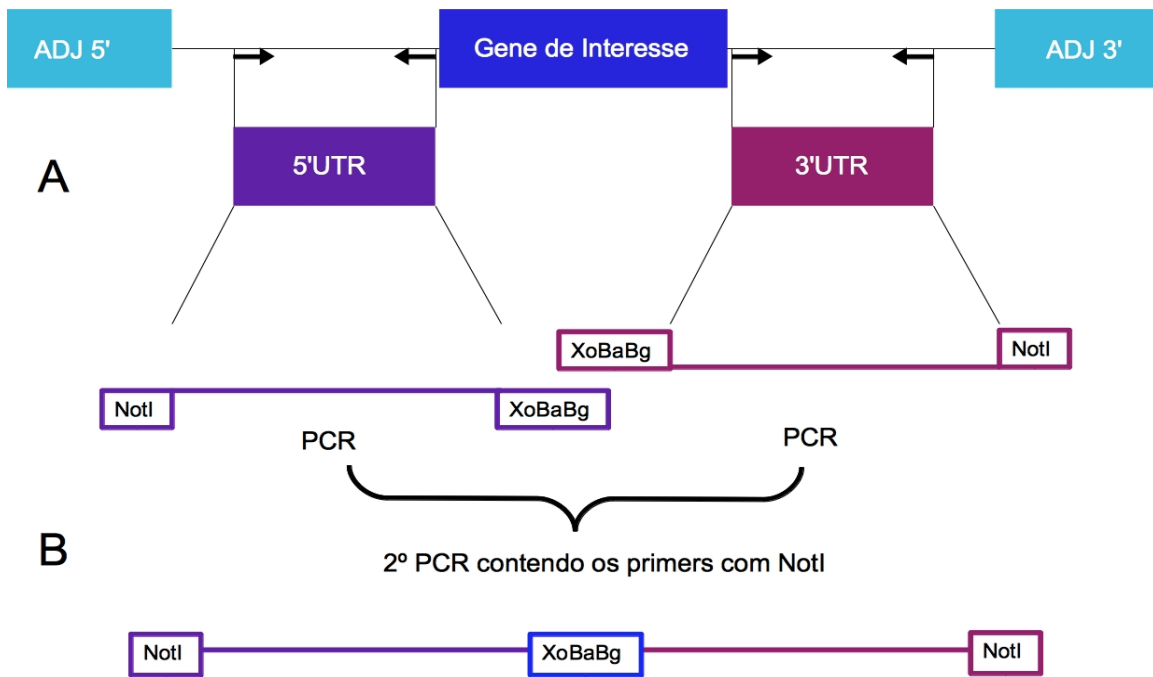
**Figura 4. Alinhamento das sequências de *dpp8tc* disponíveis no genedb.** DPP1 corresponde ao gene com o código TcCLB.510183.20, enquanto DPP2 corresponde ao gene com o código [TcCLB.503637.30](#). As sequências sublinhadas correspondem aos iniciadores desenhados nas regiões 5' e 3'UTR.

### **Amplificação das regiões 5'UTR e 3' UTR**

Após análise do número de cópias destes genes no genoma de *T. cruzi*, iniciamos a montagem do cassete para o nocaute físico. Para isso as regiões 5'UTR e 3'UTR tanto do gene de *otutc* como para o gene de *dpp8tc* foram analisadas a fim de se desenhar um par de iniciadores que amplificasse cada região (Tabela 1). No começo dos iniciadores senso 5'UTR foi inserido um sítio de restrição para a enzima *NotI* e os iniciadores antisenso 5'UTR possuíam na porção 3' um conjunto de sítios de restrição das enzimas *BglII*, *BamHI* e *XhoI* (Figura 5 A). Inversamente, os iniciadores senso 3'UTR detinham na porção 5' uma sequência para sítios de enzimas de restrição na ordem *XhoI*, *BamHI* e *BglII*, e os iniciadores antisenso 3'UTR continham uma sequência de *NotI* ao seu final (Figura 5 A).

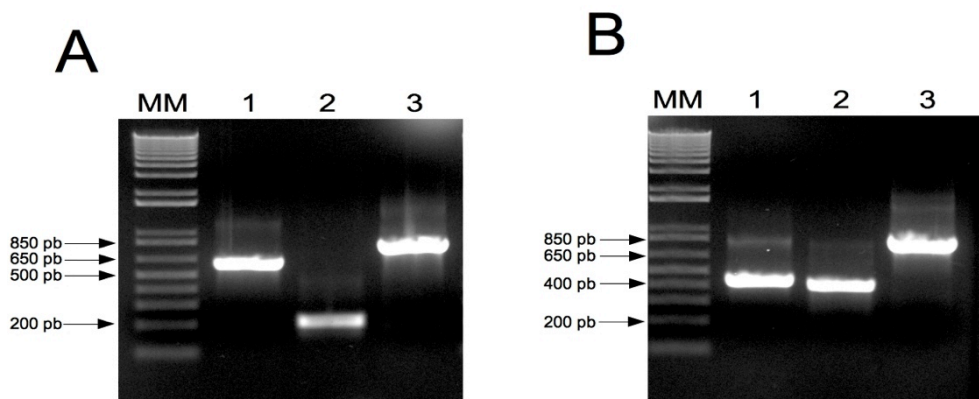
Os produtos de PCR da amplificação dos fragmentos 5'UTR e 3'UTR foram então submetidos a uma nova PCR sendo estes produtos utilizados como moldes na reação. Assim utilizando os iniciadores 5'UTR senso e 3'UTR antisenso foi gerado um novo fragmento que é produto da união entre as regiões 5'UTR e 3'UTR (Figura 5 B) por conta do anelamento dos sítios de restrição das enzimas *BamHI*, *XhoI* e *BglII*. A união dos fragmentos de *dpp8tc* gerou um cassete contendo 794 pb, enquanto a união dos fragmentos de *otutc* gerou um cassete contendo 813 pb (Figura 6).

Para *dpp8tc* obtivemos um par de iniciadores que amplificava teoricamente 612 pb na região 5'UTR e 182 pb na região 3'UTR, enquanto o par de iniciadores da região 5'UTR do gene de *otutc* amplificava 409 pb e 404 pb na região 3'UTR. Todos estes produtos foram amplificados por PCR com o tamanho esperado como mostrado na Figura 6.



**Figura 5. Estratégia de construção dos cassetes para nocaute.** A, posição dos iniciadores nas regiões 5'UTR e 3'UTR, contendo sítios de restrição para as enzimas *NotI* e *XhoI*, *BamHI* e *BglIII*. B, segunda PCR usando os produtos da primeira PCR como molde e os primers contendo o sítio de *NotI* o que resulta na ligação das duas regiões UTRs via sítios de *BamHI*, *XhoI* e *BglIII*.

Os resultados da amplificação das regiões 5'UTR e 3'UTR de cada gene nos tamanhos esperados, assim como a união dos fragmentos em um único produto no tamanho esperado podem ser observados na Figura 6



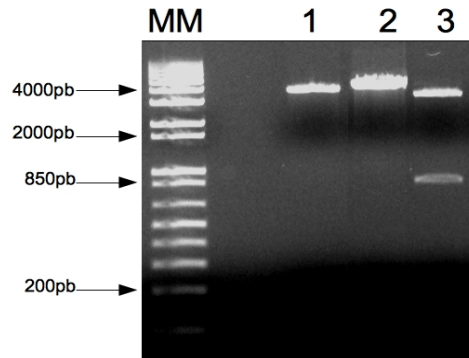
**Figura 6. Perfil eletroforético dos produtos de PCR para montagem do cassete.** Gel de Agarose 1,2%. A, Amplificação dos fragmentos de *dpp8tc*; 1 amplificação da região 5'UTR

corespondendo a 612 pb; 2, amplificação da região 3'UTR gerando um fragmento com 182 pb e 3, fragmento com 794 pb resultado da ligação de 1 e 2 por PCR. B, amplificação dos fragmentos de *otutc*; 1, amplificação da região 5'UTR com 409 pb; 2, amplificação da região 3'UTR com 404 pb e 3, fragmento de 813pb após 2ª PCR contendo a partir de 1 e 2. MM, marcador 1Kb DNA ladder Invitrogen.

### **Clonagem do cassete no vetor pGem**

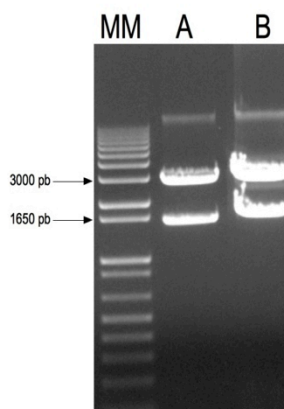
O produto da união das regiões 5'UTR e 3'UTR foi então purificado e inserido em um vetor pGEM T-easy gerando o vetor *pgem-utrsdpp8tc* e o vetor *pgem-utrsotutc* que corresponde ao vetor pGEM que contém as regiões 5'UTR e 3'UTR unidas do gene da *otutc* e *dpp8tc*. Estes vetores foram então usados para transformar a bactéria competente XL1Blue por meio de choque térmico. Este vetor possui um gene repórter que codifica a enzima  $\beta$ -Galactosidase, onde está localizado o sítio de clonagem. Esta enzima possui sua expressão induzida por IPTG e degrada o substrato X-gal, produzindo um substrato azul o que torna possível diferenciar as colônias (brancas) que carregam o plasmídeo ligado ao gene de interesse. Desta forma, várias colônias brancas foram produzidas, das quais 6 para cada gene foram submetidas a PCR de colônia a fim de confirmar a presença do cassete inserido. Todas as PCRs amplificaram os genes desejados e assim, os plasmídeos foram amplificados por midiprep para dar continuidade à produção final do cassete (dados não mostrados).

Os vetores *pgem-utrsdpp8tc* e *pgem-utrsotutc* foram digeridos com as enzimas de restrição *XhoI* e *BglII* no intuito de linearizar o vetor para receber o novo inserto, o gene que codifica a enzima neomicina fosfotransferase (*neo*) que confere resistência a geneticina (G418). As digestões foram confirmadas em gel de agarose onde foi visualizada uma banda de 3820 pb para o vetor *pgem-utrsdpp8tc* e 3840 pb para o vetor *pgem-utrsotutc* (Figura 7, linhas 1 e 2). O vetor *pgem-neo* também foi digerido com as mesmas enzimas, a fim de liberar o fragmento correspondente ao gene de *neo* de 818 pb (Figura 7, linha 3).



**Figura 7. Digestão de vetores com enzimas de restrição *XhoI* e *BglII*.** Gel de Agarose 0,8%. MM marcador 1Kb DNA ladder Invitrogen. 1, digestão do vetor *pgem-utrsdpp8tc* (3820 pb); 2, digestão do vetor *pgem-utrsotu* (3840 pb) e 3, digestão do vetor *pgem-neo* com liberação de um fragmento de 818 pb correspondendo ao fragmento de *neo* e um fragmento de 3015 pb que corresponde ao vetor pGEM T Easy.

O inserto de *neo* foi então ligado entre as regiões 5'e 3'UTR presentes nos vetores *pgem-utrsdpp8tc* e *pgem-utrsotutc* gerando os vetores *pgem-5'neo3'dpp8tc* e *pgem-5'neo3'otutc* contendo os cassetes finais. Estes vetores foram então usados para transformar bactérias competentes XL1Blue. Novamente, 6 colônias brancas foram submetidas a PCR de colônia usando os iniciadores contendo o sítio de *NotI* para confirmar o tamanho esperado de cada inserto. Uma colônia positiva de cada cassete foi submetida à midipreparação de DNA plasmidial que foi digerido com a enzima *NotI* liberando o cassete final no tamanho esperado (Figura 8).



**Figura 8. Digestão dos vetores contendo os cassetes finais para o nocaute.** Gel de Agarose 0,8%. MM Marcador 1Kb DNA ladder Invitrogen. A, digestão do vetor *pgem-5'neo3'dpp8tc* liberando o pGEM T Easy de 3015pb e o cassete final contendo 5'UTR,

neo e 3'UTR com um tamanho de aproximadamente 1612 pb. B, digestão do vetor *pgem-5'neo3'otutc* liberando o cassete final de *otutc* com 1631pb.

Estes plasmídeos foram sequenciados e o resultado do sequenciamento foi comparado com a sequência esperada da ligação 5'UTR+ *neo*+3'UTR para cada gene, como pode ser observado na Figura 9 para o vetor *pgem-5'neo3'dpp8tc*, e na Figura 10 para o vetor *e pgem-5'neo3'otutc*.

```

#####
# Aligned_sequences: 2
# 1: EMBOSS_001
# 2: EMBOSS_001
# Length: 904
# Identity: 742/904 (82.1%)
# Similarity: 742/904 (82.1%)
# Gaps: 110/904 (12.2%)
# Score: 4477.0
#####
EMBOSS_001 1 ATG-----ATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGANAGGCTATTCCGGCTATGACTGGGCACAACANACAATCGGCT 91
EMBOSS_001 1 ATGGGATCGGCCATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCT 100
EMBOSS_001 92 GCTCTGATGCCCGCGTGTTCGGGCTGTGACGCGAGGGCGCCCGGTTCTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCTGAATGAATGCANGACGAGGC 191
EMBOSS_001 101 GCTCTGATGCCCGCGTGTTCGGGCTGTGACGCGAGGGCGCCCGGTTCTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCTGAATGAATGCANGACGAGGC 200
EMBOSS_001 192 AGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGTGTGCTCGACGTTGCTCACTGAANCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGCGAATG 291
EMBOSS_001 201 AGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGTGTGCTCGACGTTGCTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGCGAATG 300
EMBOSS_001 292 CNNGGGCENNATCTNCTGTCTATCTCNNNNNNNGNCCGNCNANNAAGTATCCATCATGNNTGANGCAATGNNGCGGCTGCNNNNNNNNGATNNGCTACN 391
EMBOSS_001 301 CCGGGCAGGATCTCTGTCTACCTTCTCTCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGC-----ATAC- 383
EMBOSS_001 392 NNNCNCNNTNCNANNNNNNAANNNNNAANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN 491
EMBOSS_001 384 --GCTTGATC-----CG-----GCTACCT 400
EMBOSS_001 492 GCCCATTGNCACCNCNGGAANCATCGCATCGAGCGAGCAGTANTNGGATGNAAGCNCNGT-NTNTCGATCAGGATGATNNGGACGAAGAGCATCAGGG 590
EMBOSS_001 401 GCCCATTGNCACCNCAGGAAACATCGCATCGAGCGAGCAGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGG 500
EMBOSS_001 591 GCTCGCGCAGCCGAAGTTCNCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCTGTGACCCATGGCGATGCTGCTTGCAGAAATATCATG 690
EMBOSS_001 501 GCTCGCGCAGCCGAAGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCTGTGACCCATGGCGATGCTGCTTGCAGAAATATCATG 600
EMBOSS_001 691 GTGAAAATGCGCCGCTTTTCTGGATTTCATCGACTGTGGCCGCGTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTTGATATTGCTGAAG 790
EMBOSS_001 601 GTGAAAATGCGCCGCTTTTCTGGATTTCATCGACTGTGGCCGCGTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTTGATATTGCTGAAG 700
EMBOSS_001 791 AGCTTGGCGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGTCTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTGCGAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTT 890
EMBOSS_001 701 AGCTTGGCGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGTCTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTGCGAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTT 800
EMBOSS_001 891 CTGA 894
EMBOSS_001 801 CTGA 804

```

**Figura 9. Alinhamento do sequenciamento do cassete final para o gene de otubaína. Alinhamento da sequência do gene predito e do gene sequenciado** Entre os 409 pb da região 5'UTR próximo ao gene e os 404 pb da região 3'UTR após o gene de otubaína foi adicionado a sequência para o gene de resistência a neomicina, gerando a sequência correspondente ao cassete final. Esta sequência foi alinhada com o resultado do sequenciamento do cassete feito em laboratório através das PCRs. Este alinhamento gerou uma identidade e similaridade 82,1%.

```
#####
# Program: needle
# Aligned sequences: 2
# 1: EMBOSS_001
# 2: EMBOSS_001
# Length: 931
# Identity: 744/931 (79.9%)
# Similarity: 744/931 (79.9%)
# Gaps: 139/931 (14.9%)
# Score: 4476.0
#-----
EMBOSS_001 1 ATG-----ATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGANAGGCTATTCCGGCTATGACTGGGCACACAGANAATCNGCT 91
|
|
|
EMBOSS_001 1 ATGGGATCGGCCATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCCGGCTATGACTGGGCACACAGACAATCGGCT 100

EMBOSS_001 92 GCTCTGATGCCNNCNGTTCNCGGTGTGCAGCGC--NNGGCNNCANNNC--TTTTGTCAANACNNCNCNCCNNTNNCNTGANTNANTGCAGNNNAGNAC 189
|
|
|
EMBOSS_001 101 GCTCTGATGCCCGGCTTCCGGGTGTGCAGCGCAGGGGGCCCGGTTCTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGT----- 174

EMBOSS_001 190 NCGNTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN 289
|
|
|
EMBOSS_001 174 ----- 174

EMBOSS_001 290 NGCCCCGAATGAANTGCAGGANGAGNCAG--NNNNNTATCGTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN 388
|
|
|
EMBOSS_001 175 -GCCCTGAATGAAGTGCAGGACGAGGCAGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCAGAGTGTGCTCGACTTGTACTGAAGCGGGA 273

EMBOSS_001 389 AGGGACTGGCTGCTATTGGGGGAAGTGCCTGGGCGAGGATCTCCNGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGC 488
|
|
|
EMBOSS_001 274 AGGGACTGGCTGCTATTGGGGGAAGTGCCTGGGCGAGGATCTCCNGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGC 373

EMBOSS_001 489 GGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCAGCTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGTCATCA 588
|
|
|
EMBOSS_001 374 GGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCAGCTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGTCATCA 473

EMBOSS_001 589 GGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCCGACGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCTGACCCAT 688
|
|
|
EMBOSS_001 474 GGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCCGACGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCTGACCCAT 573

EMBOSS_001 689 GCGATGCCTGCTTGGCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTATCATGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAG 788
|
|
|
EMBOSS_001 574 GCGATGCCTGCTTGGCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTATCATGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAG 673

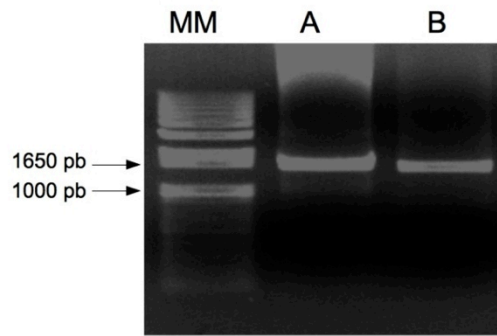
EMBOSS_001 789 CGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGTCTTTACGGTATCGCCGCTCCCATTGCGAGCGCATCGC 888
|
|
|
EMBOSS_001 674 CGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGTCTTTACGGTATCGCCGCTCCCATTGCGAGCGCATCGC 773

EMBOSS_001 889 CTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTCTTCTGA 919
|
|
|
EMBOSS_001 774 CTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTCTTCTGA 804
```

**Figura 10. Alinhamento do sequenciamento do cassette final para o gene de DPP8.** Entre os 612 pb da região 5'UTR próximo ao gene e os 182 pb da região 3'UTR após o gene de DPP8 foi adicionado a sequência para o gene de resistência a neomicina, gerando a sequência correspondente ao cassette final. Esta sequência foi alinhada com o resultado do sequenciamento do cassette feito em laboratório através das PCRs. Este alinhamento gerou uma identidade e similaridade de 79,9%.

**Deleção dos genes de *dpp8tc* e *otutc* por nocaute gênico**

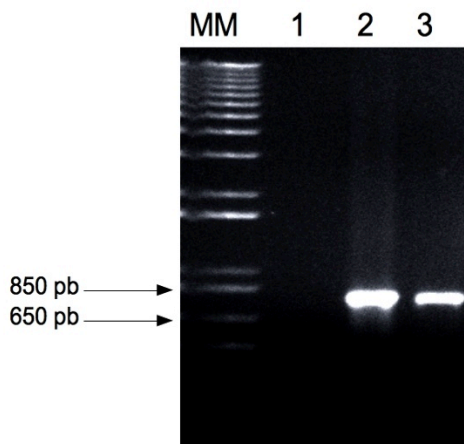
Uma vez que ambos os vetores estavam prontos e sequenciados, os cassetes foram amplificados por PCR, usando os iniciadores contendo *NotI*, precipitados e ressuspendidos em água estéril (Figura 11). Os cassetes finais foram então transfectados em *T. cruzi* selvagens da cepa CL-Brenner segundo as condições descritas na metodologia. Após a transfecção os parasitos foram selecionados com G418 durante cerca de 8 semanas, tempo onde foi possível obter populações resistentes ao antibiótico.



**Figura 11. Amplificação dos cassetes finais para transfecção.** Gel de Agarose 1.2%. MM marcador 1Kb DNA ladder Invitrogen. A, amplificação do cassete final para nocaute de *otutc* de 1631 pb e B, *dpp8tc* de 1612 pb.

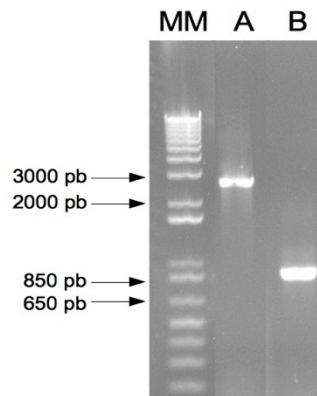
### Análise por PCR dos parasitos transfectados

De forma semelhante à PCR de colônia de bactéria, esta foi realizada direto das culturas dos parasitos, sem extração prévia do DNA genômico. Um fragmento no tamanho esperado para o gene de resistência a neomicina (818 pb) foi observado a partir das culturas de parasito transfectados com os diferentes cassetes utilizando os iniciadores que se alinham na região 5’UTR do gene *neo* na região 3’UTR do gene *neo*, no entanto nenhuma amplificação foi observada na cultura de parasitos selvagens (Figura 12), confirmando a inserção de *neo* nos referidos parasitos.



**Figura 12. Confirmação da presença do gene *neo* nos parasitos nocauteados.** Gel de Agarose 0.8%. MM marcador 1Kb DNA ladder Invitrogen. 1, amplificação do selvagem; 2, amplificação do gene *neo* em parasitos *otutc*<sup>+/-</sup>; 3, presença do gene *neo* nos parasitos *dpp8tc*<sup>+/-</sup>.

Tendo em vista a presença de dois alelos para ambos os genes foi realizada uma PCR para confirmar quantos alelos foram substituídos pelo cassette. O resultado pode ser observado na figura 13, onde verificamos que foram amplificados fragmentos do tamanho esperado para *dpp8tc* (2580 pb) e *otutc* (795 pb) indicando que ao menos um alelo não foi afetado, ou que existe uma cópia extra no genoma.



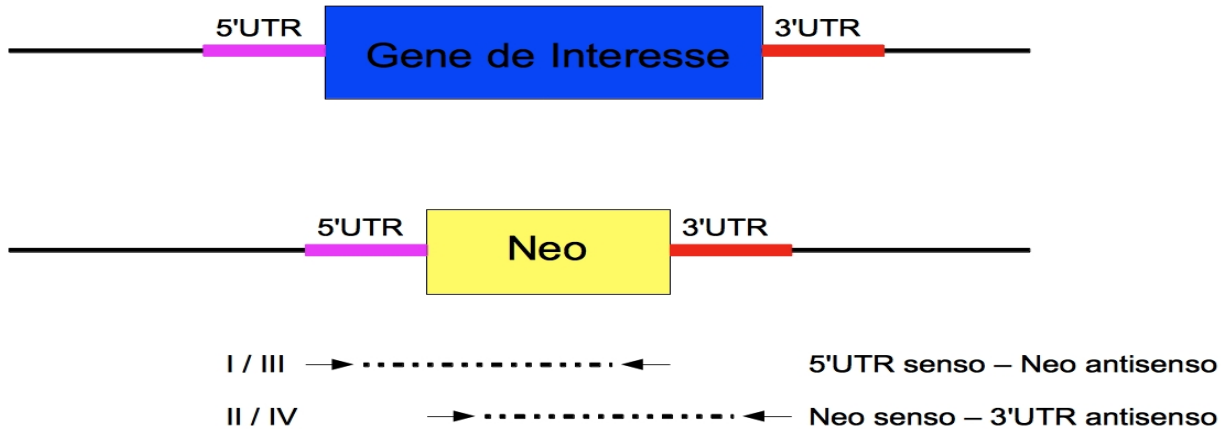
**Figura 13. Confirmação da presença de um alelo dos genes de interesse em parasitos nocauteados.** Gel de Agarose 1.2%. MM marcador 1Kb DNA ladder Invitrogen. Amplificação de *dpp8tc* (A) e *otutc* (B) em parasitos nocauteados para estes genes, confirmando a presença de mais um alelo.

Buscando confirmar se houve a substituição dos *dpp8tc* ou *otutc* por *neo* em ao menos um alelo, validando assim o simples nocaute, foi realizado uma PCR utilizando os iniciadores seguindo as seguintes combinações (Figura 14):

- I. O iniciador senso que se anela na região 5'UTR do gene de *otutc* com o iniciador antisenso que se anela na região 3' do gene de *neo* resultando em um fragmento com 1222 pb.
- II. O iniciador senso que se anela na região 5' do gene de *neo* com o iniciador antisenso que se anela na região 3' UTR do gene de *otutc* amplificando um fragmento com 1217 pb.

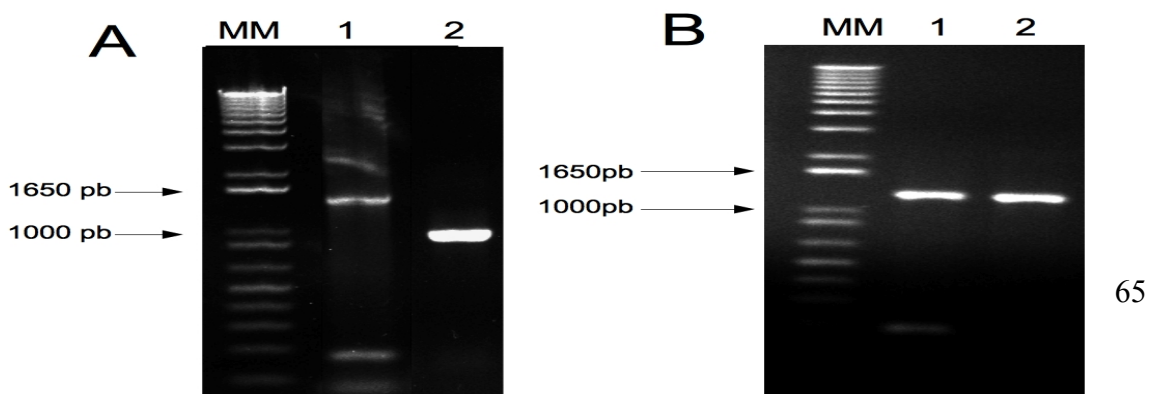


- III. O iniciador senso que se anela na região 5'UTR do gene de *dpp8tc* com o iniciador antisenso que se anela na região 3' do gene de *neo* gerando um fragmento com 1425pb.
- IV. O iniciador senso que se anela na região 5' do gene de *neo* com o iniciador antisenso que se anela na região 3' UTR do gene de *dpp8tc* resultando em um fragmento com 995pb.



**Figura 14. Representação das combinações dos iniciadores utilizados para confirmação da substituição dos genes de interesse.** Representação das combinações I / III utilizando os iniciadores senso da região 5'UTR do gene de interesse e o iniciador antisenso da região 3'UTR *neo*, e representação das combinações II / IV que utiliza dos iniciadores senso da região 5'UTR de *neo* e antisenso da região 3'UTR do gene de interesse.

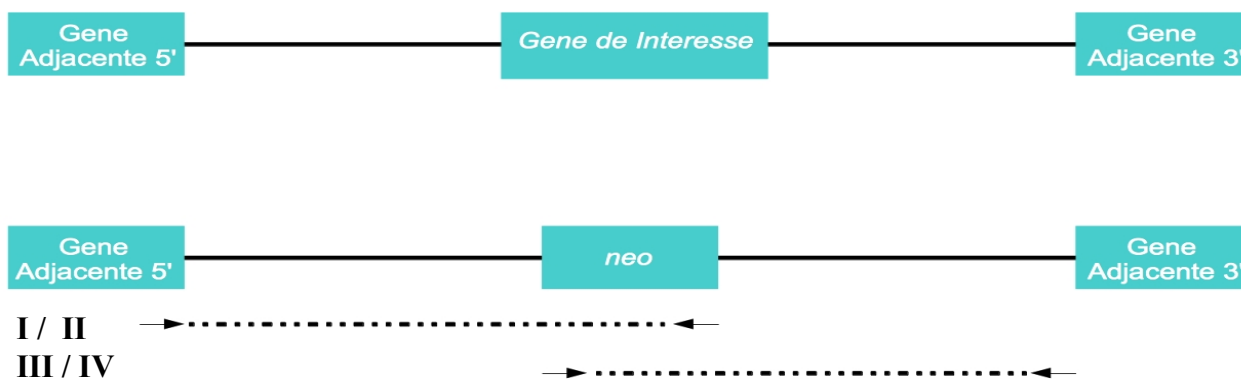
A figura 15 mostra que todas as PCRs amplificaram os fragmentos do tamanho esperado, confirmando que ocorreu a recombinação homóloga entre os cassetes e as regiões UTRs do gene de interesse, que resultou na sua substituição pelo gene de *neo*.



**Figura 15. Substituição dos genes de interesse por *neo*.** Gel de Agarose 0.8%. MM marcador 1Kb DNA ladder Invitrogen. A, ampliações de *dpp8tc*, 1, combinação I de iniciadores, 2, combinação de pares de iniciadores II; B, ampliações utilizando os parasitos *otutc*<sup>+/-</sup>, 1, combinação de iniciadores III, 2 combinação de pares de iniciadores IV.

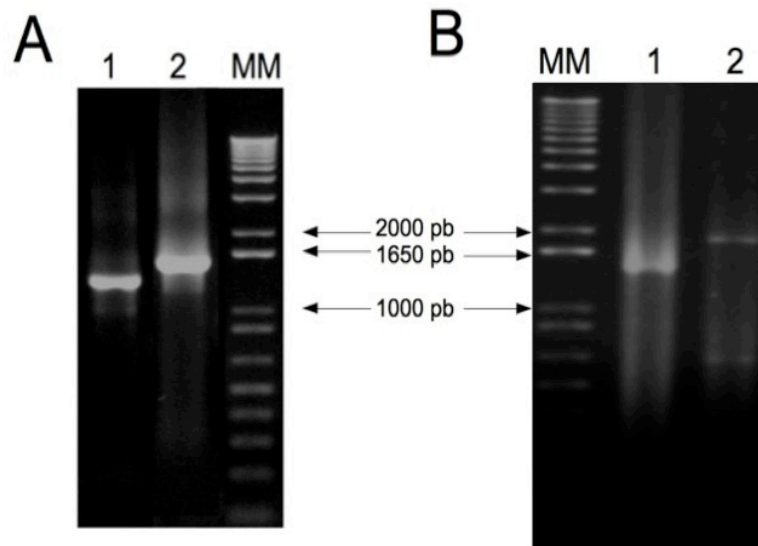
Para confirmar o local de inserção do cassete foi realizada uma PCR utilizando os genes adjacentes aos genes de interesse como molde. De acordo com o genoma sequenciado de *T. cruzi* da cepa CL-Brenner o gene *dpp8tc* está localizado entre os genes TcCLB.503637.20 que codifica uma proteína não conhecida e o gene TcCLB.503637.40 que codifica um pequeno RNA nucleolar (*snoRNA*). O gene *otutc* está localizado entre os genes TcCLB.509179.160 que gera uma proteína hipotética e pelo gene TcCLB.509179.140 que codifica uma myo-inositol-1-monophosphatase (*myo*). Assim, iniciadores foram desenhados nas extremidades destes genes de forma que as seguintes combinações foram realizadas (Figura 16):

- I. Iniciador senso que se anela na região 3' do gene hipotético TcCLB.503637.20 e o iniciador antisense que se anela na região 3' do gene *neo*, resultando em um fragmento com 1853 pb.
- II. Iniciador senso que se anela na região 5' do gene *neo* e o iniciador antisense que se anela na região 5' do gene *snoRNA*, gerando um fragmento com 1375pb.
- III. Iniciador senso que se anela na região 3' do gene hipotético TcCLB.509179.160 e o iniciador antisense que se anela na região 3' do gene *neo* amplificando um fragmento com 1291 pb.
- IV. Iniciador senso que se anela na região 5' do gene *neo* e o iniciador antisense que se anela na região 5' do gene *myo*, produzindo um fragmento com tamanho esperado de 1467 pb.



**Figura 16. Representação esquemática das combinações para confirmar o local de recombinação do cassete.**

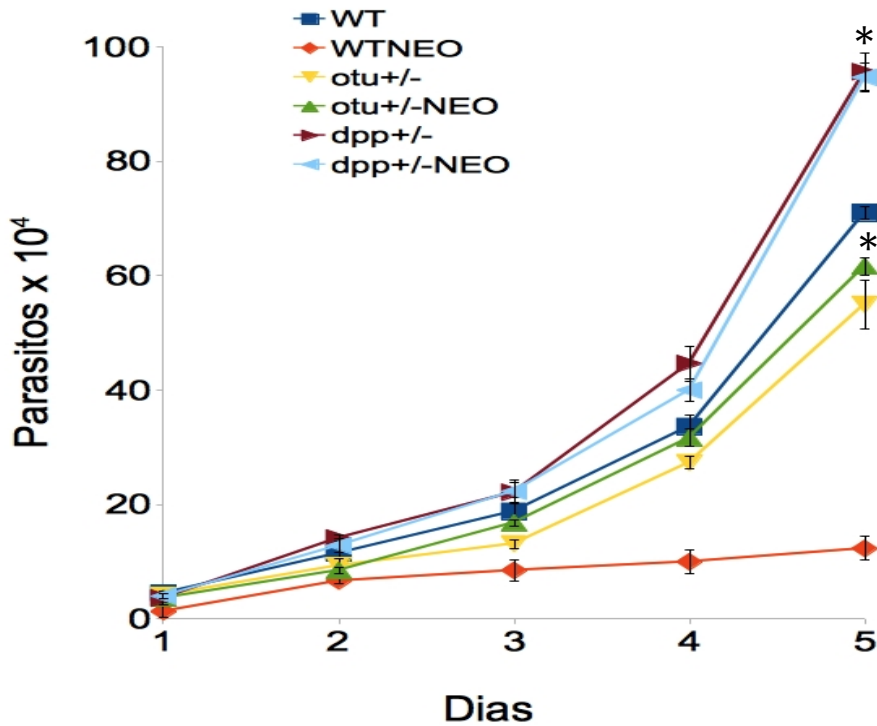
Desse modo, foi observada a amplificação da região 3' do gene adjacente esquerdo até a região 3' do gene de *neo* e da região 5' do gene de *neo* até a região 5' do gene adjacente direito, que seriam amplificadas apenas nos mutantes, confirmando o local de inserção do cassete. E ainda, foi amplificado um fragmento que corresponde ao final do gene adjacente esquerdo ao início do gene adjacente direito, sendo amplificada nos mutantes e no parasito não nocauteado, porém em tamanhos diferentes (dados não mostrados). A Figura 17 mostra o padrão das amplificações, nos tamanhos esperados. Estes resultados confirmam a recombinação homóloga dos cassetes construídos no locus gênico correto.



**Figura 17. Correta recombinação homóloga dos cassetes no locus gênico correto.** Gel de Agarose 0.8%. MM marcador 1Kb DNA ladder Invitrogen. A, ampliações de *otutc*<sup>+/-</sup>, 1, combinação de iniciadores IV, 2 combinação de pares de iniciadores V; B, ampliações utilizando os parasitos *dpp8tc*<sup>+/-</sup>, 1, combinação I de iniciadores, 2, combinação de pares de iniciadores II.

### **Análise do crescimento dos parasitos nocauteados**

Os epimastigotas transfectados (nocauteados) e selecionados e os parasitos selvagens foram analisados a fim de verificar se o simples nocaute foi suficiente para alterar a taxa de crescimento dos parasitos. Para isso, foi observado o perfil da curva de crescimento dos parasitos nocauteados para *dpp8tc* ou *otutc* comparados aos parasitos selvagens. Os parasitos foram analisados durante uma semana onde foi observada uma diferença na curva de crescimento dos *otutc*<sup>+/-</sup>, visto que estes cresceram de forma mais lenta (-23%) comparados com os parasitos selvagens como mostra a Figura 18. No entanto, os parasitos *dpp8tc*<sup>+/-</sup> apresentaram um crescimento de cerca de 25% maior quando comparados com o selvagem (Figura 18).



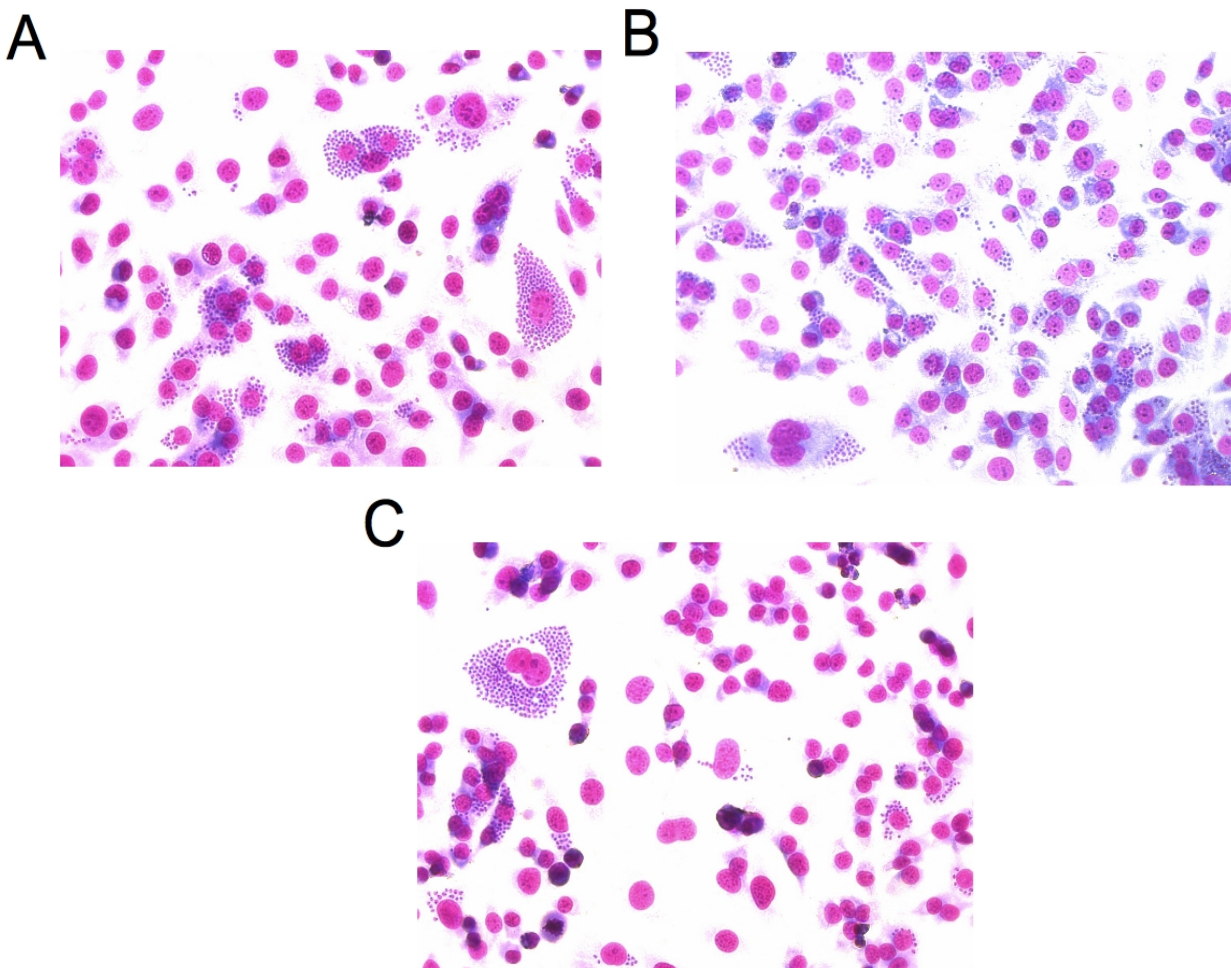
**Figura 18. Análise de crescimento dos parasitos nocauteados.** O crescimento dos parasitos epimastigotas selvagens, *dpp8tc*<sup>+/-</sup>, *otutc*<sup>+/-</sup> foi analisado durante 5 dias na presença ou não do antibiótico de seleção G418. \*  $P < 0.05$  sendo significativamente diferente do selvagem

### Comparação da infectividade dos parasitos nocauteados

As formas epimastigotas nocauteadas e selvagens foram submetidas à diferenciação em tripomastigotas metacíclicas por cultivo em fase estacionária no intuito de avaliar a infectividade destes parasitos. Esta diferenciação foi efetiva para os dois parasitos nocauteados *dpp8tc*<sup>+/-</sup> e *otutc*<sup>+/-</sup>, onde todos os parasitos demoraram o mesmo tempo para se diferenciar, não havendo alteração no processo de metaciclogênese *in vitro*. O teste de infectividade foi realizado por incubação dos tripomastigotas nocauteados com células L6 (mioblasto de camundongo) em dois tempos de infecção, 3 e 24h. A figura 19 mostra formas amastigotas dentro das células L6, mostrando que os parasitos nocauteados não perderam a capacidade de infecção.

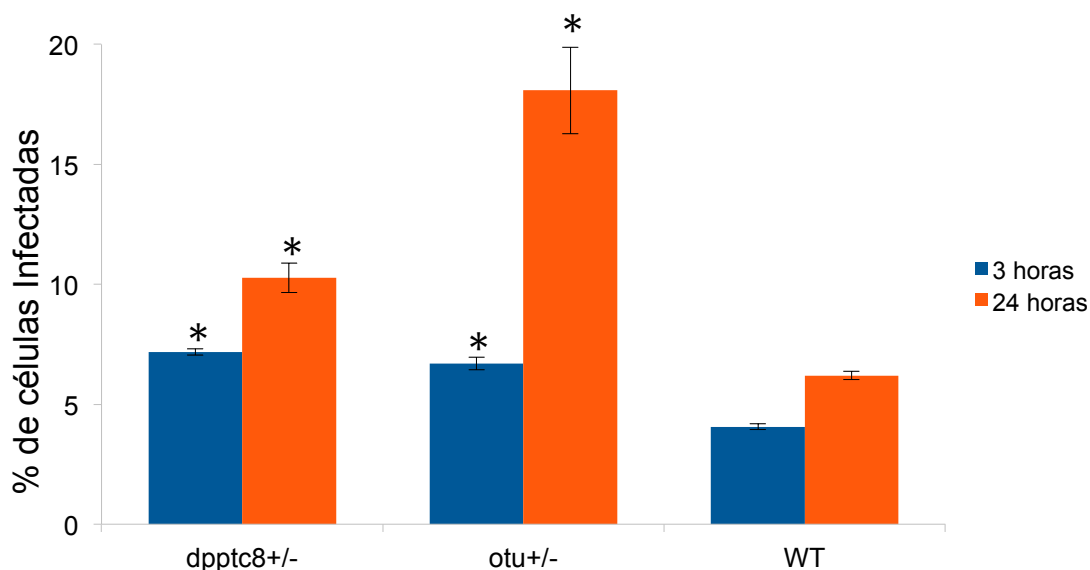
Com intuito de comparar a capacidade infectiva dos parasitos nocauteados com os parasitos selvagens, foi realizado um teste para estimar a frequência de infecção das células hospedeiras. Na figura 20, observamos a porcentagem de células infectadas por

cada mutante e pelo selvagem em diferentes tempos. Após 3 h de infecção observamos que ambos os mutantes infectam mais células que o selvagem, já que em todos os experimentos o mesmo número de células L6 foi infectado com a mesma quantidade de formas tripomastigotas. Após 3 horas de infecção observamos que a porcentagem de células infectadas pelos mutantes *dpp8tc*<sup>+/-</sup> foi 1,76 vezes superior que o selvagem, enquanto os parasitos *otu*<sup>+/-</sup> infectaram 1,65 vezes mais células que o selvagem. Resultado similar foi observado quando a infecção foi de 24 h, porém uma maior porcentagem de células infectadas é observada para a infecção com parasitos *otutc*<sup>+/-</sup>, a qual foi 3 vezes superior que a porcentagem de células infectadas pelo selvagem, enquanto os mutantes *dpp8tc*<sup>+/-</sup> apresentaram uma porcentagem de células infectadas similar a observada em 3 horas, sendo capazes de infectar 1,65 vezes mais células que o selvagem.



**Figura 19. Capacidade de infecção dos parasitos nocauteados em células L6.** Células fotografadas com a objetiva de 40x. Células infectadas em 3 horas de infecção

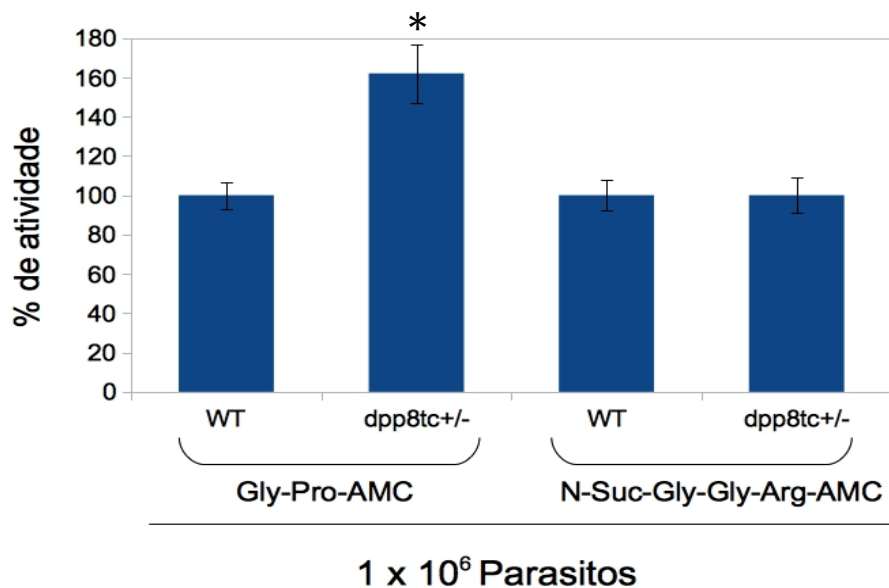
com parasitos nocauteados para *dpp8tc* (A), *otuc* (B) e células infectadas com selvagem (C).



**Figura 20. Teste de infecção de células L6 por tripomastigotas *in vitro*.** As células murinas L6 foram lavadas após 3h ou 24h da infecção com tripomastigotas selvagens (WT), *dpp8tc*<sup>+/-</sup>, *otu*<sup>+/-</sup> e analisadas quanto à presença de formas amastigotas após 96h do início do teste. \*  $P < 0.05$  quando comparado com o selvagem, sendo significativamente diferente.

### Verificação da atividade de DPP8

A atividade proteolítica da enzima DPP8 foi observada nos mutantes para o gene *dpp8tc* e comparada com a atividade da mesma enzima nos parasitos selvagens. Em vista disso, o teste de atividade foi realizado utilizando o substrato fluorogênico típico para DPPIV Gly-Pro-AMC. No intuito de validar o teste, outro substrato foi escolhido a fim de medir a atividade de outra enzima como controle (N-Suc-Gly-Gly-Arg-AMC substrato da enzima oligopeptidase B). Como resultado, observamos ao invés de uma diminuição, um aumento de 62% da atividade de DPP8 em extrato total do parasito nocauteado (Figura 21). Este resultado foi obtido por normalização usando como parâmetro o teste controle, considerando que a atividade de oligopeptidase B é constante entre os parasitos selvagens e nocauteados. Resultado semelhante foi obtido em testes usando como controle o substrato de prolil oligopeptidase (dados não mostrados).



**Figura 21. Teste de atividade de DPP8.** O teste enzimático foi realizado com os substratos Gly-Pro-AMC e N-Suc-Gly-Gly-Arg-AMC utilizando extrato contendo  $1 \times 10^6$  parasitos. \*  $P < 0.0001$  sendo significativamente diferente do WT.

### Montagem do cassete para a realização do segundo turno de nocaute

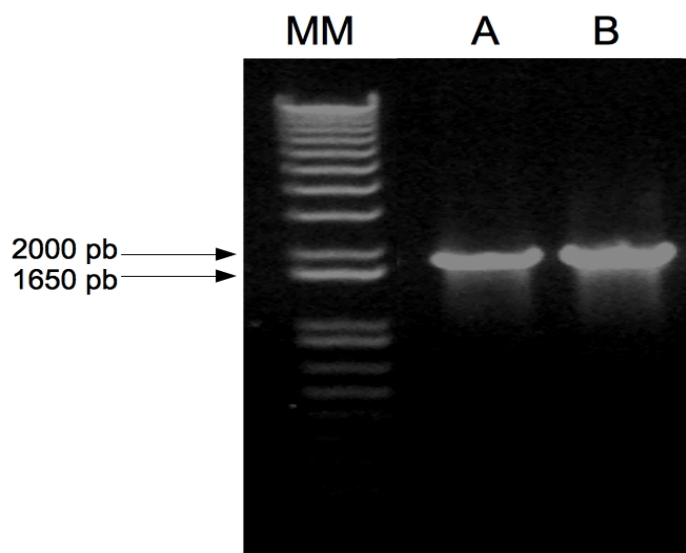
Os cassetes para o segundo turno de nocaute foram confeccionados a partir dos vetores *pgem-utrsdpp8tc* e *pgem-utrsotutc* que possuem as regiões 5'UTR e 3'UTR unidas dos genes *dpp8tc* e *otutc*. Estes vetores e o vetor *pgem-hyg* foram digeridos com as enzimas de restrição *XhoI* e *BglII*, de forma que o gene de resistência a higromicina (higromicina fosfotransferase, *hyg*) liberado foi ligado entre as UTRs de cada gene. A clonagem dos cassetes foi confirmada por PCR de colônias a partir das bactérias transformadas com cada ligação. O presença do inserto também foi confirmada por digestão dos plasmídeos obtidos com a enzima *NotI*. Estas ligações geraram os vetores *pgem-5'hyg3'dpp8tc* e *pgem-5'hyg3'otutc* que foram sequenciados e analisados (Dados não mostrados).

### Realização do duplo nocaute

O segundo cassete contendo o gene de resistência a higromicina flanqueado pelas regiões 5'UTR e 3'UTR foi amplificado em quantidade suficiente para a transfecção (cerca de 30  $\mu$ g) (Figura 22). Os parasitos que já haviam sido nocauteados e



que sofreram recombinação homóloga do gene de *otutc* ou *dpp8tc* pelo gene de *neo*, foram transfectados com o cassete contendo *hyg* e selecionados com ambos os antibióticos, G418 e higromicina. Apesar de duas tentativas, não foi possível isolar parasitos viáveis com a dupla seleção de antibióticos.



**Figura 22. Segundo cassete contendo *hyg*.** Gel de Agarose 0.8%. MM marcador 1Kb DNA ladder Invitrogen. A, amplificação do cassete final para nocaute de *otutc* de 1851 pb e B, *dpp8tc* de 1832 pb.

# DISCUSSÃO

## DISCUSSÃO

A caracterização experimental da função de genes em tripanossomatídeos tem fortemente abordado as técnicas de genética reversa que tem sido facilitada pelo desenvolvimento e otimização de estratégias de manipulação genética e protocolos de transfecção (Teixeira e Darocha, 2003). Em contraste com as técnicas robustas e extensivas para manipulação genética documentada para *Trypanosoma brucei* e *Leishmania*, as técnicas validadas para *T. cruzi* são ainda pouco relatadas. A deleção de genes alvos tem sido uma das mais importantes ferramentas para o estudo da função de genes, principalmente em organismos onde a técnica para silenciamento de genes por RNA interferente falhou (Militello, Refour *et al.*, 2008). O primeiro *T. cruzi* mutante carregando uma deleção de um gene alvo foi gerado a mais de 18 anos (Cooper, De Jesus *et al.*, 1993), e infelizmente, a lista de genes que foram alterados por estudos de genética reversa em *T. cruzi* até então, não aumentou consideravelmente (Cooper, De Jesus *et al.*, 1993; Ajioka e Swindle, 1996; Caler, Vaena De Avalos *et al.*, 1998; Allaoui, François *et al.*, 1999; Manning-Cela, Cortés *et al.*, 2001; Conte, Labriola *et al.*, 2003; Annoura, Nara *et al.*, 2005; Macrae, Obado *et al.*, 2006; Gluenz, Taylor *et al.*, 2007; Wilkinson, Taylor *et al.*, 2008; Xu, Brandán *et al.*, 2009; De Souza, Rampazzo *et al.*, 2010; Campos, Silva *et al.*, 2011; Collins, Craft *et al.*, 2011; Serpeloni, Moraes *et al.*, 2011). Apesar das dificuldades em se deletar genes em *T. cruzi*, o propósito inicial deste trabalho de mestrado foi não somente estudar por nocaute gênico dois alvos quimioterápicos potenciais, DPP8 e otubaína, mas igualmente, aprimorar um protocolo de nocaute para este parasito.

A partir da análise e do alinhamento das duas sequências disponíveis para o gene de otubaína e DPP8 no banco de dados genedb, foi possível iniciar o nosso estudo sobre a função desta proteína por meio do nocaute físico, visto que estes genes apresentam única cópia no genoma do parasito. Ao alinharmos as sequências dos dois alelos observamos uma discreta diferença entre elas (6% para *otutc* e 4% para *dpp8tc*), que se deve ao fato do clone CL Brener, escolhido para o sequenciamento e utilizado neste trabalho, ser derivado de um evento de hibridização entre as linhagens *T. cruzi* II e *T. cruzi* III (De Freitas, Augusto-Pinto *et al.*, 2006), tendo portanto divergência entre os próprios genes.

Para a montagem dos cassetes utilizamos as regiões intergênicas 5' e 3' UTR anexas aos genes de interesse que variaram em respectiva extensão 5' e 3' UTR de 612 pb e 182 pb para *dpp8tc* e para *otutc*, 409 pb e 404 pb. A escolha destas extensões foi ponderada tendo em vista o tamanho total da região intergênica e que 78 nucleotídeos específicos do gene *dhfr-ts* ou do gene *ech* não foram suficientes para a recombinação homóloga em *T. cruzi* (Xu, Brandán *et al.*, 2009) e que estudos com *Leishmania* demonstraram que no mínimo 150 nucleotídeos são necessários para guiar a recombinação homóloga (Papadopoulou e Dumas, 1997). No entanto, é importante ressaltar que diferentemente destes dois parasitos, em *T. brucei* uma recombinação foi obtida utilizando apenas 42 nucleotídeos de homologia (Gaud, Carrington *et al.*, 1997). Além disso, a utilização de PCR para a amplificação e ligação das UTRs, mostrou-se uma estratégia simples e rápida para utilização na montagem do cassete e posterior transfecção no parasito *T. cruzi*.

O resultado do sequenciamento dos cassetes não foi longo o suficiente para analisarmos a sequência dos cassetes completos. Porém foi o suficiente para analisarmos as regiões 5' e 3' UTR, mostrando alta identidade entre a sequência obtida do sequenciamento e a sequência da cepa CL-Brener depositada no banco de dados.

O conhecimento prévio das sequências dos genes adjacentes aos genes de interesse, e até mesmo a sequência dos próprios genes de interesse e das suas respectivas UTRs demonstra a importância de se ter o genoma de *T. cruzi* conhecido. Por isso se faz necessário o conhecimento do genoma de mais cepas visto a grande diversidade genética apresentada pelo parasito, para assim viabilizar o estudo de mais possíveis genes com potencial quimioterápico.

Graças a estas informações do genoma, a análise obtida através das PCR dos parasitos nocauteados mostrou ser uma abordagem muito útil, visto que os parasitos possuem o gene de resistência *neo*, que o cassete está correto e que integrou no local correto,. Porém essa técnica não permite inferir quantas cópias do gene o parasito possui, nem se o gene de interesse foi, por exemplo, duplicado em outro local, como já relatado em estudo de nocaute em *Leishmania* (Tovar, Wilkinson *et al.*, 1998; Mukherjee, Langston *et al.*, 2011). Para isso faz-se necessário a técnica de *Southern Blot*, que ainda não foi realizada.

A ubiquitina é uma proteína altamente conservada em diversos organismos, e sua ligação a uma proteína alvo, ubiquitinação, é requerida para diversos processos biológicos, tais como regulação da estabilidade de proteínas, progressão do ciclo celular, transcrição de genes e respostas imunes (Haglund e Dikic, 2005). Após a marcação da proteína com a ubiquitina, ela pode ser então encaminhada para a proteólise, onde esta proteína marcada será entregue ao proteassoma, um complexo multiprotéico que irá degradar a proteína e reciclar a ubiquitina (Wilkinson, 2000). A contribuição do proteassoma para os processos de diferenciação do *T. cruzi* foi previamente demonstrado utilizando um inibidor de proteassoma, como a lactacistina, que inibiu a diferenciação de tripomastigotas em amastigotas, e a diferenciação intracelular de amastigotas em tripomastigotas, interferindo assim na metaciclo genese do *T. cruzi* (De Diego, Katz *et al.*, 2001; Barboza, Cardoso *et al.*, 2012). Além disso, as transições entre os hospedeiros, bem como as mudanças no ambiente são acompanhadas de extensas mudanças metabólicas e morfológicas no parasito (El-Sayed, Myler *et al.*, 2005), onde a ubiquitinação ou deubiquitinação de proteínas deve ter um papel fundamental.

Análises de crescimento mostraram que os parasitos simples mutantes para *otutc* tiveram uma discreta diferença na taxa de crescimento, crescendo 22,5% mais lentos que o selvagem. Esta curva foi realizada 5 vezes de forma independente, e resultados similares foram encontrados. Os parasitos nocauteados para *otutc* foram ainda capazes de se diferenciar em tripomastigotas, e desafiados a infectar células L6 de mioblastos de camundongos. Os mutantes foram capazes de infectar 1,65 vezes mais células que os parasitos selvagens em 3 horas de infecção, e em 24 de infecção este aumento foi de cerca de três vezes superior em relação ao selvagem. Este fato pode ser explicado pela observação que os mutantes *dpp8tc*<sup>+/-</sup> se multiplicam mais rápido e que apesar de termos uma alta porcentagem de células infectadas pelos mutantes para o gene *otu* eram observadas poucas formas amastigotas dentro das células. No entanto estes fatos serão corroborados através do teste *in vivo*, no qual a parasitemia do animal será analisada. Além disto, estes resultados poderiam ser explicados visto que a otubaína poderia estar interferindo na ubiquitinação de proteínas o que levou o parasito a crescer de forma mais lenta. Outra hipótese seria a de que estaria ocorrendo uma redução dos níveis da otubaína e que isto estaria interferindo na expressão de alguns genes que regulariam o

crescimento e a infecção. No entanto, o nível de expressão de otubaína não pode ser estimado por teste enzimático devido à inexistência de um substrato fluorogênico para esta enzima e pela dificuldade de se realizar um *Western blot* como será discutido mais adiante.

A família DPPIV é composta por seis membros: a DPPIV propriamente dita, proteína de ativação do fibroblasto (FAP), DPP8, DPP9, DPP6 e DPP10. Alguns membros desta família possuem atividade peptidásicas específicas únicas entre as proteases por serem capazes de clivar uma ligação peptídica flanqueado por um resíduo de prolina, aminoácido que torna uma ligação peptídica relativamente resistente a ação de outras proteases (Van Goethem, Matheussen *et al.*, 2011). A importância biológica destas peptidases é reforçada pelo fato de que muitos peptídeos bioativos, como hormônios quimiocinas e neuropeptídeos, contém um ou mais resíduos de prolina e o processamento e degradação de tais peptídeos regulatórios biologicamente importantes requerem peptidases específicas (Rosenblum e Kozarich, 2003). Apesar de suas semelhanças estruturais e enzimáticas, estas proteínas possuem funções fisiológicas distintas, como indicado pela sua diferente expressão e localização.

As funções de DPP8 e DPP9 são as menos estudadas, e por isso relativamente pouco se sabe sobre elas. Diferentemente de DPPIV e FAP, DPP8 é uma proteína solúvel localizada no citoplasma (Abbott, Yu *et al.*, 2000), o que também foi visto em nosso estudo através de uma imunofluorescência realizada durante este trabalho (dados não mostrados). Em nossos estudos com DPP8 observamos que *T. cruzi* mutantes para o gene de *dpp8tc* apresentaram um crescimento relativamente superior ao observado no selvagem (25% superior). O teste de atividade também demonstrou alta atividade para os nocauteados quando comparados com o selvagem, sendo que os mutantes para DPP8 tiveram uma atividade enzimática 62% superior que os parasitos selvagens. Os parasitos tripomastigotas nocauteados para o gene de DPP8 não perderam sua capacidade infectiva, conseguindo infectar células L6 de mioblastos de camundongos. No teste de infectividade, estes parasitos nocauteados infectaram cerca de 1,76 vezes mais células L6 comparados aos parasitos selvagens em 3 horas de infecção e este aumento se manteve praticamente constante com 1,65% vezes mais em 24 horas de infecção.

A alta atividade e alta proliferação observadas nos parasitos nocauteados para *dpp8tc* poderiam ser explicadas por: 1) aumento da expressão do alelo restante ou 2) aumento da expressão de genes com atividade similar a DPP8, sem, no entanto, haver diferença na atividade de prolil oligopeptidase ou 3) pela presença de uma cópia extra no genoma, que poderia sugerir uma estratégia de evasão pelo parasito a fim de evitar a perda de um gene essencial. A hipótese de que o parasito estaria tentando compensar a perda deste gene através do aumento da expressão do segundo alelo ou de outro gene poderá ser confirmada por meio da análise de espectrometria de massa, que nos mostraria quais seriam as possíveis proteínas que estariam sendo superexpressadas. Uma possível proteína que poderia estar sendo superexpressa seria a X-Pro, visto que esta possui uma atividade similar a DPP8, e poderia estar influenciando o resultado observado para a atividade de DPP8. Para confirmar se a X-Pro estaria sendo superexpressada um *western blot* deverá ser realizado utilizando anticorpos anti- X-Pro, detectando assim, o nível de expressão destas proteínas.

Kangethe e colaboradores (2011) observaram que parasitos *T. brucei brucei* nulos para o gene de oligopeptidase B (TbOPB) tiveram um aumento da atividade de outra enzima prolil oligopeptidase, sugerindo que a enzima POP poderia estar compensando a perda da atividade de OPB nos mutantes nulos.

Várias tentativas foram realizadas a fim de se obter um *Western Blot* que nos mostraria a expressão diferenciada entre as amostras de parasitos nocauteados e selvagens. Porém os anticorpos disponíveis em nosso laboratório são de outros organismos, sendo que o anticorpo para DPP8 foi produzido a partir da DPP8 recombinante de *T. brucei* e o anticorpo de otubaína foi produzido a partir da OTU recombinante de *Leishmania chagasi*, uma vez que as recombinantes de *T. cruzi* ainda não foram produzidas. Estes anticorpos apresentaram atividade cruzada baixa para as proteínas de *T. cruzi*, o que dificultou a marcação em um nível suficiente para a quantificação. Porém um *western blot* deverá ser realizado utilizando anticorpos anti-ubiquitina que poderia revelar um aumento de prote'inas ubiquitinadas.

A hipótese de que o parasito poderia produzir cópia(s) extra(s) de um gene foi observada na tentativa de se obter o duplo mutante de *T. cruzi* para os genes de enoil-CoA hidratase (*ech*) e UDP-Glc6p 4'-epimerase (*tcgale*) e *dhfr-ts* (Macrae, Obado *et al.*,

2006; Xu, Brandán *et al.*, 2009; Perez Brandan, Padilla *et al.*, 2011). O papel da DPP8 humana na proliferação foi avaliado por Yu e colaboradores (2006), que utilizaram células transfectadas com o vetor com GFP comparado com os vetores DPP8-GFP, DPP9-GFP. As células transfectadas com os vetores DPP8-GFP e DPP9-GFP tiveram suas médias de proliferação maior do que aquelas obtidas apenas com o vetor GFP. A hipótese de duplicação do gene *dpp8tc* só poderá ser confirmada através da realização de um *Southern Blot*, que indicaria quantas cópias deste gene os parasitos selvagens e nocauteados teriam. Outra hipótese seria a de que o parasito estaria tentando compensar a perda deste gene através do aumento da expressão de outro gene. Esta superexpressão de um outro gene poderia estar levando a estes resultados observados. Porém estas hipótese só seria confirmada através da análise por espectrometria de massas que nos mostraria quais seriam as possíveis proteínas que estariam sendo superexpressadas.

A completa deleção de um gene através da recombinação homóloga não é uma tarefa fácil. Os parasitos que haviam sido nocauteados e que sofreram recombinação homóloga do gene de *otu* pelo gene de *neo*, e foram transfectados com o cassete contendo o gene de resistência a higromicina, foram selecionados com ambos os antibióticos. Da mesma forma os parasitos que haviam sido nocauteados para o gene *dpp8tc* foram transfectados com o cassete contendo o gene de resistência a higromicina, e também selecionados com ambos antibióticos. Estes parasitos não foram viáveis, visto que após a seleção com os antibióticos as culturas de *dpp8tc*<sup>-/-</sup>, *otutc*<sup>-/-</sup> e selvagens morreram. Isto poderia ter ocorrido visto que estes genes poderiam ser essenciais ao parasito. Porém este experimento deverá ser repetido para posterior análise.

Aparentemente, as duplicações do gene alvo ou do cromossoma inteiro durante um experimento de nocaute com *T. cruzi* acontecem com alguma frequência. Identificar a frequência na qual os eventos de duplicação acontecem seria de grande valia para realização de protocolos de deleção e para sondar a plasticidade do genoma deste parasito intrigante. Possivelmente, a trissomia e a poliploidia são eventos mais frequentes do que o esperado neste parasito o que dificulta bastante o estudo da função de genes utilizando a técnica de nocaute.

Um experimento realizado sem sucesso foi o de seleção dos parasitos duplo nocaute, após transfecção com o segundo cassete contendo *hyg*, que não sobreviveram.



Isto poderia ter ocorrido visto que estes genes poderiam ser essenciais ao parasito. No entanto, este experimento foi realizado duas vezes e novas estratégias serão testadas em breve, como a de repetir o nocaute começando pela transfecção com o cassete contendo *hyg* e a segunda transfecção com o cassete contendo *neo*. Ainda, será realizada uma transfecção contendo quantidades equimolares dos dois cassetes, seguida de dupla seleção com os antibióticos. Outro experimento sem sucesso foi um teste de infectividade *in vivo* utilizando camundongos Balb C machos com 8 semanas que foram infectados com tripomastigotas selvagens e nocauteados oriundos da cultura em células L6. A dificuldade deste experimento foi a de determinar a parasitemia, visto que esta era baixa mesmo nos animais infectados com os parasitos selvagens. Mesmo com o cultivo prévio de tripomastigotas infectivos isolados dos camundongos, não foi possível obter uma parasitemia satisfatória. Novos testes deverão ser realizados para padronizar estes experimentos *in vivo*.

Finalmente, é importante ressaltar que os resultados do estudo funcional destes dois genes, aqui apresentados, são preliminares. Vários desafios ainda terão de ser superados, porém este foi o primeiro passo de um longo caminho. Os resultados e ferramentas aqui obtidos poderão contribuir significativamente no entendimento da função destas proteínas.

# CONCLUSÃO

## CONCLUSÃO

Os resultados preliminares apresentados neste trabalho nos permitem concluir que:

- ♣ O protocolo de transfecção utilizado no trabalho é válido;
- ♣ Os genes *dpp8tc* e *otutc* foram corretamente substituídos por *neo* contido nos cassetes;
- ♣ Os parasitos nocauteados para o gene de *otutc* apresentaram uma taxa de crescimento ligeiramente inferior da apresentada pelo selvagem na forma epimastigota;
- ♣ A taxa de crescimento observada para os mutantes do gene de *dpp8tc* foi superior a observada nos parasitos selvagens epimastigotas;
- ♣ Foi possível observar que os parasitos nocauteados para o gene *dpp8tc* apresentam atividade *in vitro* no substrato Gly-Pro-AMC superior a atividade observada no selvagem;
- ♣ As análises dos mutantes para os genes de *dpp8tc* e *otutc* indicam que eles não perderam sua capacidade de diferenciação em formas tripomastigotas metacíclicos;
- ♣ De acordo com o teste de infecção *in vitro* em células L6, os parasitos nocauteados para *dpp8tc* e *otutc* foram muito mais infectivos que os parasitos selvagens

# PERSPECTIVAS

## PERSPECTIVAS

Para dar continuidade ao estudo deste trabalho é necessário aperfeiçoar e complementar alguns dados e para isso as seguintes perspectivas são propostas:

- ⤴ Realizar um *Southern blot* no intuito de analisar quantas cópias dos genes de *dpp8tc* e *otutc* existem nos respectivos parasitos nocauteados.
- ⤴ Repetir o duplo nocaute dos parasitos;
- ⤴ Produzir anticorpos anti-DPP8 e anti-OTU de *T. cruzi*;
- ⤴ Realizar um *Western blot* utilizando agora os novos anticorpos no intuito de detectar a expressão diferencial das proteínas nocauteadas, além de utilizar os anticorpos anti-ubiquitina e anti X-Pro
- ⤴ Repetir um novo teste *in vivo* utilizando os parasitos tripomastigotas simples nocaute e duplo nocaute;
- ⤴ Realizar uma análise de espectrometria de massa para verificar a expressão das proteínas nos parasitos simples e duplo nocaute comparada aos parasitos selvagens.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, C. A. et al. Cloning, expression and chromosomal localization of a novel human dipeptidyl peptidase (DPP) IV homolog, DPP8. **Eur J Biochem**, v. 267, n. 20, p. 6140-50, Oct 2000. ISSN 0014-2956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11012666> >.

AGABIAN, N. Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. **Cell**, v. 61, n. 7, p. 1157-60, Jun 1990. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2142018> >.

AJAMI, K. et al. Dipeptidyl peptidase 9 has two forms, a broad tissue distribution, cytoplasmic localization and DPIV-like peptidase activity. **Biochim Biophys Acta**, v. 1679, n. 1, p. 18-28, Jul 2004. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15245913> >.

\_\_\_\_\_. Stromal cell-derived factors 1alpha and 1beta, inflammatory protein-10 and interferon-inducible T cell chemo-attractant are novel substrates of dipeptidyl peptidase 8. **FEBS Lett**, v. 582, n. 5, p. 819-25, Mar 2008. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18275857> >.

AJIOKA, J.; SWINDLE, J. The calmodulin-ubiquitin (CUB) genes of *Trypanosoma cruzi* are essential for parasite viability. **Mol Biochem Parasitol**, v. 78, n. 1-2, p. 217-25, Jun 1996. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8813691> >.

ALLAOU, A. et al. Intracellular growth and metacyclogenesis defects in *Trypanosoma cruzi* carrying a targeted deletion of a Tc52 protein-encoding allele. **Mol Microbiol**, v. 32, n. 6, p. 1273-86, Jun 1999. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10383767> >.

ALSFORD, S.; HORN, D. Single-locus targeting constructs for reliable regulated RNAi and transgene expression in *Trypanosoma brucei*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 161, n. 1, p. 76-9, Sep 2008. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18588918> >.

ALVAREZ, V. E.; NIEMIROWICZ, G. T.; CAZZULO, J. J. The peptidases of *Trypanosoma cruzi*: digestive enzymes, virulence factors, and mediators of autophagy and programmed cell death. **Biochim Biophys Acta**, v. 1824, n. 1, p. 195-206, Jan 2012. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21621652> >.

ALVES, C. R. et al. Trypanosoma cruzi: attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of Rhodnius prolixus. **Exp Parasitol**, v. 116, n. 1, p. 44-52, May 2007. ISSN 0014-4894. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17250827> >.

ANDRADE, H. M. et al. Proteomic analysis of Trypanosoma cruzi resistance to Benzimidazole. **J Proteome Res**, v. 7, n. 6, p. 2357-67, Jun 2008. ISSN 1535-3893. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18435557> >.

ANDRADE, Z. A. Immunopathology of Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94 Suppl 1, p. 71-80, 1999. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10677693> >.

ANNOURA, T. et al. The origin of dihydroorotate dehydrogenase genes of kinetoplastids, with special reference to their biological significance and adaptation to anaerobic, parasitic conditions. **J Mol Evol**, v. 60, n. 1, p. 113-27, Jan 2005. ISSN 0022-2844. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15696374> >.

ANSORGE, S. et al. Novel aspects of cellular action of dipeptidyl peptidase IV/CD26. **Biol Chem**, v. 392, n. 3, p. 153-68, Mar 2011. ISSN 1437-4315. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21194362> >.

AÑEZ, N. et al. Predominance of lineage I among Trypanosoma cruzi isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas' disease. **Trop Med Int Health**, v. 9, n. 12, p. 1319-26, Dec 2004. ISSN 1360-2276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15598264> >.

BALAKIREV, M. Y. et al. Deubiquitinating function of adenovirus proteinase. **J Virol**, v. 76, n. 12, p. 6323-31, Jun 2002. ISSN 0022-538X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12021365> >.

\_\_\_\_\_. Otubains: a new family of cysteine proteases in the ubiquitin pathway. **EMBO Rep**, v. 4, n. 5, p. 517-22, May 2003. ISSN 1469-221X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12704427> >.

BARBOZA, N. R. et al. Expression profile and subcellular localization of HslV, the proteasome related protease from Trypanosoma cruzi. **Exp Parasitol**, v. 130, n. 2, p. 171-7, Feb 2012. ISSN 1090-2449. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22085770> >.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D. Evolutionary lines of cysteine peptidases. **Biol Chem**, v. 382, n. 5, p. 727-33, May 2001. ISSN 1431-6730. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11517925> >.



BARRETT, A. J.; TOLLE, D. P.; RAWLINGS, N. D. Managing peptidases in the genomic era. **Biol Chem**, v. 384, n. 6, p. 873-82, Jun 2003. ISSN 1431-6730. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12887054> >.

BARRIO, A. B.; VAN VOORHIS, W. C.; BASOMBRÍO, M. A. Trypanosoma cruzi: attenuation of virulence and protective immunogenicity after monoallelic disruption of the cub gene. **Exp Parasitol**, v. 117, n. 4, p. 382-9, Dec 2007. ISSN 0014-4894. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17624327> >.

BASTOS, I. M. et al. Molecular, functional and structural properties of the prolyl oligopeptidase of Trypanosoma cruzi (POP Tc80), which is required for parasite entry into mammalian cells. **Biochem J**, v. 388, n. Pt 1, p. 29-38, May 2005. ISSN 1470-8728. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15581422> >.

\_\_\_\_\_. Prolyl oligopeptidase of Trypanosoma brucei hydrolyzes native collagen, peptide hormones and is active in the plasma of infected mice. **Microbes Infect**, v. 12, n. 6, p. 457-66, Jun 2010. ISSN 1769-714X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20188209> >.

BATISTA, M. et al. A high-throughput cloning system for reverse genetics in Trypanosoma cruzi. **BMC Microbiol**, v. 10, p. 259, 2010. ISSN 1471-2180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20942965> >.

BELLOFATTO, V.; CROSS, G. A. Expression of a bacterial gene in a trypanosomatid protozoan. **Science**, v. 244, n. 4909, p. 1167-9, Jun 1989. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2499047> >.

BERRIMAN, M. et al. The genome of the African trypanosome Trypanosoma brucei. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 416-22, Jul 2005. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16020726> >.

BILODEAU, N. et al. Insulin-dependent phosphorylation of DPP IV in liver. Evidence for a role of compartmentalized c-Src. **FEBS J**, v. 273, n. 5, p. 992-1003, Mar 2006. ISSN 1742-464X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16478473> >.

BJELKE, J. R. et al. Dipeptidyl peptidases 8 and 9: specificity and molecular characterization compared with dipeptidyl peptidase IV. **Biochem J**, v. 396, n. 2, p. 391-9, Jun 2006. ISSN 1470-8728. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16475979> >.

BLACKFORD, A. N.; STEWART, G. S. When cleavage is not attractive: non-catalytic inhibition of ubiquitin chains at DNA double-strand breaks by OTUB1. **DNA Repair (Amst)**, v. 10, n. 2, p. 245-9, Feb 2011. ISSN 1568-7856. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21130715> >.

BLOM, N.; GAMMELTOFT, S.; BRUNAK, S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. **J Mol Biol**, v. 294, n. 5, p. 1351-62, Dec 1999. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10600390> >.

BOOTHROYD, J. C.; CROSS, G. A. Transcripts coding for variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei* have a short, identical exon at their 5' end. **Gene**, v. 20, n. 2, p. 281-9, Dec 1982. ISSN 0378-1119. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7166234> >.

BOSSENO, M. F. et al. Predominance of *Trypanosoma cruzi* lineage I in Mexico. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 2, p. 627-32, Feb 2002. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11825982> >.

BRENER, Z. [The therapeutic activity of furaltadone, furazolidone and furadantine in experimental infection of the mouse by "*Trypanosoma cruzi*"]. **Hospital (Rio J)**, v. 60, p. 947-51, Dec 1961. ISSN 0018-5469. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13872812> >.

BRENIÈRE, S. F. et al. Integrate study of a Bolivian population infected by *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 3, p. 289-95, Apr 2002. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12048553> >.

BRISSE, S. et al. A phylogenetic analysis of the *Trypanosoma cruzi* genome project CL Brener reference strain by multilocus enzyme electrophoresis and multiprimer random amplified polymorphic DNA fingerprinting. **Mol Biochem Parasitol**, v. 92, n. 2, p. 253-63, May 1998. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9657330> >.

BRISSE, S.; BARNABÉ, C.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. **Int J Parasitol**, v. 30, n. 1, p. 35-44, Jan 2000. ISSN 0020-7519. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10675742> >.

BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N. W. A 120-kDa alkaline peptidase from *Trypanosoma cruzi* is involved in the generation of a novel Ca(2+)-signaling factor for

mammalian cells. **J Biol Chem**, v. 270, n. 10, p. 5172-80, Mar 1995. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7890627> >.

BUSCAGLIA, C. A.; DI NOIA, J. M. Trypanosoma cruzi clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. **Microbes Infect**, v. 5, n. 5, p. 419-27, Apr 2003. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12737998> >.

BUSEK, P.; MALÍK, R.; SEDO, A. Dipeptidyl peptidase IV activity and/or structure homologues (DASH) and their substrates in cancer. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 36, n. 3, p. 408-21, Mar 2004. ISSN 1357-2725. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14687920> >.

CALER, E. V. et al. Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by Trypanosoma cruzi. **EMBO J**, v. 17, n. 17, p. 4975-86, Sep 1998. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9724634> >.

CAMPOS, P. C. et al. Trypanosoma cruzi MSH2: Functional analyses on different parasite strains provide evidences for a role on the oxidative stress response. **Mol Biochem Parasitol**, v. 176, n. 1, p. 8-16, Mar 2011. ISSN 1872-9428. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21073906> >.

CARDINAL, M. V. et al. Molecular epidemiology of domestic and sylvatic Trypanosoma cruzi infection in rural northwestern Argentina. **Int J Parasitol**, v. 38, n. 13, p. 1533-43, Nov 2008. ISSN 1879-0135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18585717> >.

CARRUTHERS, V. B.; VAN DER PLOEG, L. H.; CROSS, G. A. DNA-mediated transformation of bloodstream-form Trypanosoma brucei. **Nucleic Acids Res**, v. 21, n. 10, p. 2537-8, May 1993. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8506158> >.

CASTRO, D. P. et al. Trypanosoma cruzi: ultrastructural studies of adhesion, lysis and biofilm formation by Serratia marcescens. **Exp Parasitol**, v. 117, n. 2, p. 201-7, Oct 2007. ISSN 0014-4894. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17570364> >.

CHEN, S. J.; JIAANG, W. T. Current advances and therapeutic potential of agents targeting dipeptidyl peptidases-IV, -II, 8/9 and fibroblast activation protein. **Curr Top Med Chem**, v. 11, n. 12, p. 1447-63, 2011. ISSN 1873-4294. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21510839> >.

CHEN, T. et al. Molecular characterization of a novel dipeptidyl peptidase like 2-short form (DPL2-s) that is highly expressed in the brain and lacks dipeptidyl peptidase activity. **Biochim Biophys Acta**, v. 1764, n. 1, p. 33-43, Jan 2006. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16290253> >.

CHIRAC, P.; TORRELE, E. Global framework on essential health R&D. **Lancet**, v. 367, n. 9522, p. 1560-1, May 2006. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16698397> >.

CLARK, B. D. et al. DPP6 Localization in Brain Supports Function as a Kv4 Channel Associated Protein. **Front Mol Neurosci**, v. 1, p. 8, 2008. ISSN 1662-5099. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18978958> >.

CLAYTON, C. E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. **EMBO J**, v. 21, n. 8, p. 1881-8, Apr 2002. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11953307> >.

CLAYTON, C. E. et al. Transcription of the procyclic acidic repetitive protein genes of *Trypanosoma brucei*. **Mol Cell Biol**, v. 10, n. 6, p. 3036-47, Jun 1990. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2342468> >.

COLLINS, M. H. et al. Oral exposure to *Trypanosoma cruzi* elicits a systemic CD8<sup>+</sup> T cell response and protection against heterotopic challenge. **Infect Immun**, v. 79, n. 8, p. 3397-406, Aug 2011. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21628516> >.

CONTE, I. et al. The interplay between folding-facilitating mechanisms in *Trypanosoma cruzi* endoplasmic reticulum. **Mol Biol Cell**, v. 14, n. 9, p. 3529-40, Sep 2003. ISSN 1059-1524. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12972544> >.

COOPER, R.; DE JESUS, A. R.; CROSS, G. A. Deletion of an immunodominant *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein disrupts flagellum-cell adhesion. **J Cell Biol**, v. 122, n. 1, p. 149-56, Jul 1993. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8314840> >.

COTTO-RIOS, X. M. et al. Deubiquitinases as a signaling target of oxidative stress. **Cell Rep**, v. 2, n. 6, p. 1475-84, Dec 2012. ISSN 2211-1247. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23219552> >.

COURA, J. R. **Tripanosomose, doença de Chagas**. *Cienc. Cult.* 55: 30-33 p. 2003.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 45, n. 3, p. 286-96, Jun 2012. ISSN 1678-9849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22760123> >.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 31-40, Jul 2009. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19753455> >.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, n. 7301, p. S6-7, Jun 2010. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20571554> >.

COURA, J. R.; WILLCOX, L. E. C. Impact factor, scientific production and quality of Brazilian medical journals. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p. 293-7, Apr 2003. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12886405> >.

CRUZ, A.; BEVERLEY, S. M. Gene replacement in parasitic protozoa. **Nature**, v. 348, n. 6297, p. 171-3, Nov 1990. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2234081> >.

CUERVO, P.; DOMONT, G. B.; DE JESUS, J. B. Proteomics of trypanosomatids of human medical importance. **J Proteomics**, v. 73, n. 5, p. 845-67, Mar 2010. ISSN 1876-7737. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20056176> >.

CUROTTO DE LAFAILLE, M. A.; LABAN, A.; WIRTH, D. F. Gene expression in Leishmania: analysis of essential 5' DNA sequences. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 7, p. 2703-7, Apr 1992. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1557376> >.

DARMOUL, D. et al. Dipeptidyl peptidase IV (CD 26) gene expression in enterocyte-like colon cancer cell lines HT-29 and Caco-2. Cloning of the complete human coding sequence and changes of dipeptidyl peptidase IV mRNA levels during cell differentiation. **J Biol Chem**, v. 267, n. 7, p. 4824-33, Mar 1992. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1347043> >.

DAROCHA, W. D. et al. Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 133, n. 2, p. 175-86, Feb 2004. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14698430> >.

DE DIEGO, J. L. et al. The ubiquitin-proteasome pathway plays an essential role in proteolysis during *Trypanosoma cruzi* remodeling. **Biochemistry**, v. 40, n. 4, p. 1053-62, Jan 2001. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11170428> >.

DE FREITAS, J. M. et al. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Pathog**, v. 2, n. 3, p. e24, Mar 2006. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16609729> >.

DE LANGE, T. et al. Comparison of the genes coding for the common 5' terminal sequence of messenger RNAs in three trypanosome species. **Nucleic Acids Res**, v. 12, n. 11, p. 4431-43, Jun 1984. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6204273> >.

DE MEESTER, I. et al. CD26, let it cut or cut it down. **Immunol Today**, v. 20, n. 8, p. 367-75, Aug 1999. ISSN 0167-5699. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10431157> >.

DE MEESTER, I. A. et al. Costimulation of CD4+ and CD8+ T cells through CD26: the ADA-binding epitope is not essential for complete signaling. **J Leukoc Biol**, v. 58, n. 3, p. 325-30, Sep 1995. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7665988> >.

DE SOUZA, F. S. et al. Knockout of the gene encoding the kinetoplast-associated protein 3 (KAP3) in *Trypanosoma cruzi*: effect on kinetoplast organization, cell proliferation and differentiation. **Mol Biochem Parasitol**, v. 172, n. 2, p. 90-8, Aug 2010. ISSN 1872-9428. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20363262> >.

DE SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Curr Pharm Des**, v. 8, n. 4, p. 269-85, 2002. ISSN 1381-6128. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11860366> >.

DIAS, J. C. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease A clinical epidemiological review. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 22, n. 3, p. 147-56, 1989 Jul-Sep 1989. ISSN 0037-8682. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2486527> >.

\_\_\_\_\_. [Chagas disease, environment, participation, and the state]. **Cad Saude Publica**, v. 17 Suppl, p. 165-9, 2001. ISSN 0102-311X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11426278> >.

\_\_\_\_\_. [Chagas disease in a life story: unveiling the disease, changing the world. Interview with João Carlos Pinto Dias. Interview by Roberto Briceño-León]. **Cad Saude Publica**, v. 25 Suppl 1, p. S179-86, 2009. ISSN 1678-4464. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19287862> >.

DIOSQUE, P. et al. Multilocus enzyme electrophoresis analysis of *Trypanosoma cruzi* isolates from a geographically restricted endemic area for Chagas' disease in Argentina. **Int J Parasitol**, v. 33, n. 10, p. 997-1003, Sep 2003. ISSN 0020-7519. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13129520> >.

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. Free radical metabolism of antiparasitic agents. **Fed Proc**, v. 45, n. 10, p. 2471-6, Sep 1986. ISSN 0014-9446. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3017765> >.

DUBOIS, V. et al. Enzyme activity and immunohistochemical localization of dipeptidyl peptidase 8 and 9 in male reproductive tissues. **J Histochem Cytochem**, v. 57, n. 6, p. 531-41, Jun 2009. ISSN 0022-1554. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19188489> >.

DURINX, C. et al. Molecular characterization of dipeptidyl peptidase activity in serum: soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV is responsible for the release of X-Pro dipeptides. **Eur J Biochem**, v. 267, n. 17, p. 5608-13, Sep 2000. ISSN 0014-2956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10951221> >.

DÍAZ DE TORANZO, E. G. et al. Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. **Experientia**, v. 44, n. 10, p. 880-1, Oct 1988. ISSN 0014-4754. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3053234> >.

EDELMANN, M. J. et al. Post-translational modification of the deubiquitinating enzyme otubain 1 modulates active RhoA levels and susceptibility to *Yersinia* invasion. **FEBS J**, v. 277, n. 11, p. 2515-30, Jun 2010. ISSN 1742-4658. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20553488> >.

EL-SAYED, N. M. et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 409-15, Jul 2005. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16020725> >.

FERNANDES, C. D. et al. Efficacy of benznidazol treatment for asymptomatic chagasic patients from state of Rio Grande do Sul evaluated during a three years follow-up. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 27-32, Feb 2009. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19274372> >.

FERNANDES, O. et al. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. **Parasitology**, v. 118 ( Pt 2), p. 161-6, Feb 1999. ISSN 0031-1820. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10028530> >.

FREITAS, J. M. et al. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. **Int J Parasitol**, v. 35, n. 4, p. 411-7, Apr 2005. ISSN 0020-7519. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15777917> >.

FRERKER, N. et al. Neuropeptide Y (NPY) cleaving enzymes: structural and functional homologues of dipeptidyl peptidase 4. **Peptides**, v. 28, n. 2, p. 257-68, Feb 2007. ISSN 0196-9781. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17223229> >.

FUJINAGA, M. et al. The molecular structure and catalytic mechanism of a novel carboxyl peptidase from *Scytalidium lignicolum*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 10, p. 3364-9, Mar 2004. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14993599> >.

GALYOV, E. E. et al. A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. **Nature**, v. 361, n. 6414, p. 730-2, Feb 1993. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8441468> >.

GARCIA, M. P. et al. Characterisation of a *Trypanosoma cruzi* acidic 30 kDa cysteine protease. **Mol Biochem Parasitol**, v. 91, n. 2, p. 263-72, Mar 1998. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566519> >.

GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M. J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta Trop**, v. 115, n. 1-2, p. 22-7, 2010 Jul-Aug 2010. ISSN 1873-6254. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19646412> >.

GAUD, A. et al. Polymerase chain reaction-based gene disruption in *Trypanosoma brucei*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 87, n. 1, p. 113-5, Jul 1997. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9233680> >.

GLICKMAN, M. H.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. **Physiol Rev**, v. 82, n. 2, p. 373-428, Apr 2002. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11917093> >.



GLUENZ, E.; TAYLOR, M. C.; KELLY, J. M. The Trypanosoma cruzi metacyclic-specific protein Met-III associates with the nucleolus and contains independent amino and carboxyl terminal targeting elements. **Int J Parasitol**, v. 37, n. 6, p. 617-25, May 2007. ISSN 0020-7519. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17239886> >.

GREISCHEL, A.; BINDER, R.; BAIERL, J. The dipeptidyl peptidase-4 inhibitor linagliptin exhibits time- and dose-dependent localization in kidney, liver, and intestine after intravenous dosing: results from high resolution autoradiography in rats. **Drug Metab Dispos**, v. 38, n. 9, p. 1443-8, Sep 2010. ISSN 1521-009X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20538719> >.

GRELLIER, P. et al. Trypanosoma cruzi prolyl oligopeptidase Tc80 is involved in nonphagocytic mammalian cell invasion by trypomastigotes. **J Biol Chem**, v. 276, n. 50, p. 47078-86, Dec 2001. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11598112> >.

HAGLUND, K.; DIKIC, I. Ubiquitylation and cell signaling. **EMBO J**, v. 24, n. 19, p. 3353-9, Oct 2005. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16148945> >.

HARIHARAN, S.; AJIOKA, J.; SWINDLE, J. Stable transformation of Trypanosoma cruzi: inactivation of the PUB12.5 polyubiquitin gene by targeted gene disruption. **Mol Biochem Parasitol**, v. 57, n. 1, p. 15-30, Jan 1993. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8381205> >.

HARTLAND, L.; ROBINS-BROWNE, R. **Infections with enteropathogenic Yersinia species: paradigms of bacterial pathogenesis**. Rev. Med. Microbiol. 9: 191-205 p. 1998.

HARTLEY, B. S. Proteolytic enzymes. **Annu Rev Biochem**, v. 29, p. 45-72, 1960. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14400122> >.

HASHIMOTO, M. et al. Critical importance of the de novo pyrimidine biosynthesis pathway for Trypanosoma cruzi growth in the mammalian host cell cytoplasm. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 417, n. 3, p. 1002-6, Jan 2012. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22209850> >.

HECHT, M. M. et al. Inheritance of DNA transferred from American trypanosomes to human hosts. **PLoS One**, v. 5, n. 2, p. e9181, 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20169193> >.

HEGEN, M. et al. Cross-linking of CD26 by antibody induces tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinase. **Immunology**, v. 90, n. 2, p. 257-64, Feb 1997. ISSN 0019-2805. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9135555> >.

HENRIKSSON, J.; ASLUND, L.; PETTERSSON, U. Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol Today**, v. 12, n. 3, p. 108-14, Mar 1996. ISSN 0169-4758. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15275240> >.

HIGO, H. et al. Genotypic variation among lineages of *Trypanosoma cruzi* and its geographic aspects. **Parasitol Int**, v. 53, n. 4, p. 337-44, Dec 2004. ISSN 1383-5769. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15464443> >.

HILDEMAN, D. A. et al. T cell apoptosis and reactive oxygen species. **J Clin Invest**, v. 111, n. 5, p. 575-81, Mar 2003. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12618509> >.

HOPPE, T. Multiubiquitylation by E4 enzymes: 'one size' doesn't fit all. **Trends Biochem Sci**, v. 30, n. 4, p. 183-7, Apr 2005. ISSN 0968-0004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15817394> >.

HOTEZ, P. J. et al. Texas and Mexico: sharing a legacy of poverty and neglected tropical diseases. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 3, p. e1497, 2012. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22479656> >.

HUANG, L.; BURLINGAME, A. L. Comprehensive mass spectrometric analysis of the 20S proteasome complex. **Methods Enzymol**, v. 405, p. 187-236, 2005. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16413316> >.

IENNE, S. et al. Network genealogy of 195-bp satellite DNA supports the superimposed hybridization hypothesis of *Trypanosoma cruzi* evolutionary pattern. **Infect Genet Evol**, v. 10, n. 5, p. 601-6, Jul 2010. ISSN 1567-7257. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20433949> >.

IVENS, A. C. et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 436-42, Jul 2005. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16020728> >.

J, P. et al. **Reversible inactivation of human dipeptidyl peptidases 8 and 9 by oxidation**: Open Enzyme Inhib. J. 1: 52-61 p. 2008.

JACKSON, E. K.; DUBINION, J. H.; MI, Z. Effects of dipeptidyl peptidase iv inhibition on arterial blood pressure. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 35, n. 1, p. 29-34, Jan 2008. ISSN 1440-1681. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18047624> >.

JONES, B. et al. Hematopoietic stimulation by a dipeptidyl peptidase inhibitor reveals a novel regulatory mechanism and therapeutic treatment for blood cell deficiencies. **Blood**, v. 102, n. 5, p. 1641-8, Sep 2003. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12738665> >.

JUANG, Y. C. et al. OTUB1 co-opts Lys48-linked ubiquitin recognition to suppress E2 enzyme function. **Mol Cell**, v. 45, n. 3, p. 384-97, Feb 2012. ISSN 1097-4164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22325355> >.

JUILLERAT-JEANNERET, L.; GERBER-LEMAIRE, S. The prolyl-aminodipeptidases and their inhibitors as therapeutic targets for fibrogenic disorders. **Mini Rev Med Chem**, v. 9, n. 2, p. 215-26, Feb 2009. ISSN 1389-5575. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19200026> >.

JUNQUEIRA, A. C.; DEGRAVE, W.; BRANDÃO, A. Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations. **Trends Parasitol**, v. 21, n. 6, p. 270-2, Jun 2005. ISSN 1471-4922. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15922247> >.

JURIS, S. J. et al. Identification of otubain 1 as a novel substrate for the *Yersinia* protein kinase using chemical genetics and mass spectrometry. **FEBS Lett**, v. 580, n. 1, p. 179-83, Jan 2006. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16364312> >.

KAPLER, G. M.; COBURN, C. M.; BEVERLEY, S. M. Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression. **Mol Cell Biol**, v. 10, n. 3, p. 1084-94, Mar 1990. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2304458> >.

KELLY, J. M. Genetic transformation of parasitic protozoa. **Adv Parasitol**, v. 39, p. 227-70, 1997. ISSN 0065-308X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9241817> >.

KELLY, J. M.; DAS, P.; TOMÁS, A. M. An approach to functional complementation by introduction of large DNA fragments into *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani* using a cosmid shuttle vector. **Mol Biochem Parasitol**, v. 65, n. 1, p. 51-62,

May 1994. ISSN 0166-6851. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7935628>>.

KELLY, J. M. et al. Transfection of the African and American trypanosomes. **Methods Mol Biol**, v. 47, p. 349-59, 1995. ISSN 1064-3745. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7550751>>.

\_\_\_\_\_. A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. **Nucleic Acids Res**, v. 20, n. 15, p. 3963-9, Aug 1992. ISSN 0305-1048. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1324472>>.

KENDALL, G. et al. *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase does not conform to the 'hotspot' topogenic signal model. **EMBO J**, v. 9, n. 9, p. 2751-8, Sep 1990. ISSN 0261-4189. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2167831>>.

KETTMANN, U.; HUMBEL, B.; HOLZHAUSEN, H. J. Ultrastructural localization of dipeptidylpeptidase IV in the glomerulum of the rat kidney. **Acta Histochem**, v. 92, n. 2, p. 225-7, 1992. ISSN 0065-1281. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1353648>>.

KIN, Y.; MISUMI, Y.; IKEHARA, Y. Biosynthesis and characterization of the brain-specific membrane protein DPPX, a dipeptidyl peptidase IV-related protein. **J Biochem**, v. 129, n. 2, p. 289-95, Feb 2001. ISSN 0021-924X. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11173531>>.

KLEMBA, M.; GOLDBERG, D. E. Biological roles of proteases in parasitic protozoa. **Annu Rev Biochem**, v. 71, p. 275-305, 2002. ISSN 0066-4154. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12045098>>.

KROPF, S. P.; SÁ, M. R. The discovery of *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease (1908-1909): tropical medicine in Brazil. **Hist Cienc Saude Manguinhos**, v. 16 Suppl 1, p. 13-34, Jul 2009. ISSN 0104-5970. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20027916>>.

LABAN, A. et al. Stable expression of the bacterial *neor* gene in *Leishmania enriettii*. **Nature**, v. 343, n. 6258, p. 572-4, Feb 1990. ISSN 0028-0836. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2300209>>.

LABAN, A.; WIRTH, D. F. Transfection of *Leishmania enriettii* and expression of chloramphenicol acetyltransferase gene. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 23, p.

9119-23, Dec 1989. ISSN 0027-8424. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2594753>>.

LANKAS, G. R. et al. Dipeptidyl peptidase IV inhibition for the treatment of type 2 diabetes: potential importance of selectivity over dipeptidyl peptidases 8 and 9. **Diabetes**, v. 54, n. 10, p. 2988-94, Oct 2005. ISSN 0012-1797. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16186403>>.

LEBOWITZ, J. H. et al. Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in Leishmania. **Genes Dev**, v. 7, n. 6, p. 996-1007, Jun 1993. ISSN 0890-9369. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8504937>>.

LIANG, X. H. et al. trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. **Eukaryot Cell**, v. 2, n. 5, p. 830-40, Oct 2003. ISSN 1535-9778. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14555465>>.

LIMA, F. M. et al. The challenge of Chagas' disease: has the human pathogen, *Trypanosoma cruzi*, learned how to modulate signaling events to subvert host cells? **N Biotechnol**, v. 27, n. 6, p. 837-43, Dec 2010. ISSN 1876-4347. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20172059>>.

LIN, A. E.; MAK, T. W. The role of E3 ligases in autoimmunity and the regulation of autoreactive T cells. **Curr Opin Immunol**, v. 19, n. 6, p. 665-73, Dec 2007. ISSN 0952-7915. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18036806>>.

LISBOA, C. V. et al. *Trypanosoma cruzi* (kinetoplastida Trypanosomatidae): biological heterogeneity in the isolates derived from wild hosts. **Exp Parasitol**, v. 116, n. 2, p. 150-5, Jun 2007. ISSN 0014-4894. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17274984>>.

LLEWELLYN, M. S. et al. *Trypanosoma cruzi* IIc: phylogenetic and phylogeographic insights from sequence and microsatellite analysis and potential impact on emergent Chagas disease. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 3, n. 9, p. e510, 2009. ISSN 1935-2735. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19721699>>.

LOVE, K. R. et al. Mechanisms, biology and inhibitors of deubiquitinating enzymes. **Nat Chem Biol**, v. 3, n. 11, p. 697-705, Nov 2007. ISSN 1552-4469. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17948018>>.

LU, H. Y.; BUCK, G. A. Expression of an exogenous gene in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Mol Biochem Parasitol**, v. 44, n. 1, p. 109-14, Jan 1991. ISSN 0166-6851. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2011146>>.

LUKES, J. et al. Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. **Eukaryot Cell**, v. 1, n. 4, p. 495-502, Aug 2002. ISSN 1535-9778. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12455998> >.

MACRAE, J. I. et al. The suppression of galactose metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes causes changes in cell surface molecular architecture and cell morphology. **Mol Biochem Parasitol**, v. 147, n. 1, p. 126-36, May 2006. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16569451> >.

MADISON-ANTENUCCI, S.; GRAMS, J.; HAJDUK, S. L. Editing machines: the complexities of trypanosome RNA editing. **Cell**, v. 108, n. 4, p. 435-8, Feb 2002. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11909515> >.

MAES, M. et al. Components of biological variation in prolyl endopeptidase and dipeptidyl-peptidase IV activity in plasma of healthy subjects. **Clin Chem**, v. 40, n. 9, p. 1686-91, Sep 1994. ISSN 0009-9147. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7915215> >.

MAIR, G. et al. A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. **RNA**, v. 6, n. 2, p. 163-9, Feb 2000. ISSN 1355-8382. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10688355> >.

MAKAROVA, K. S.; ARAVIND, L.; KOONIN, E. V. A novel superfamily of predicted cysteine proteases from eukaryotes, viruses and *Chlamydia pneumoniae*. **Trends Biochem Sci**, v. 25, n. 2, p. 50-2, Feb 2000. ISSN 0968-0004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10664582> >.

MANNING-CELA, R. et al. LYT1 protein is required for efficient in vitro infection by *Trypanosoma cruzi*. **Infect Immun**, v. 69, n. 6, p. 3916-23, Jun 2001. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11349059> >.

MARCILI, A. et al. Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCIIC: new hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. **Infect Genet Evol**, v. 9, n. 6, p. 1265-74, Dec 2009. ISSN 1567-7257. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19632356> >.

MARTÍNEZ-CALVILLO, S.; LÓPEZ, I.; HERNÁNDEZ, R. pRIBOTEX expression vector: a pTEX derivative for a rapid selection of *Trypanosoma cruzi* transfectants. **Gene**, v. 199, n. 1-2, p. 71-6, Oct 1997. ISSN 0378-1119. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9358041> >.

MATHEEUSSEN, V. et al. Expression and spatial heterogeneity of dipeptidyl peptidases in endothelial cells of conduct vessels and capillaries. **Biol Chem**, v. 392, n. 3, p. 189-98, Mar 2011. ISSN 1437-4315. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21194356> >.

MATTHEWS, K. R.; TSCHUDI, C.; ULLU, E. A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. **Genes Dev**, v. 8, n. 4, p. 491-501, Feb 1994. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7907303> >.

MAYTAL-KIVITY, V. et al. MPN+, a putative catalytic motif found in a subset of MPN domain proteins from eukaryotes and prokaryotes, is critical for Rpn11 function. **BMC Biochem**, v. 3, p. 28, 2002. ISSN 1471-2091. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12370088> >.

MCINTOSH, C. H. et al. Dipeptidyl peptidase IV inhibitors: how do they work as new antidiabetic agents? **Regul Pept**, v. 128, n. 2, p. 159-65, Jun 2005. ISSN 0167-0115. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15780435> >.

MCNICHOLAS, K.; CHEN, T.; ABBOTT, C. A. Dipeptidyl peptidase (DP) 6 and DP10: novel brain proteins implicated in human health and disease. **Clin Chem Lab Med**, v. 47, n. 3, p. 262-7, 2009. ISSN 1434-6621. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19676137> >.

MILES, M. A. et al. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease? **Lancet**, v. 1, n. 8234, p. 1338-40, Jun 1981. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6113312> >.

\_\_\_\_\_. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. **Nature**, v. 272, n. 5656, p. 819-21, Apr 1978. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/417267> >.

MILITELLO, K. T. et al. Antisense RNA and RNAi in protozoan parasites: working hard or hardly working? **Mol Biochem Parasitol**, v. 157, n. 2, p. 117-26, Feb 2008. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18053590> >.

MOMEN, H. Taxonomy of *Trypanosoma cruzi*: a commentary on characterization and nomenclature. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94 Suppl 1, p. 181-4, 1999. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10677711> >.

MONDRAGON, A. et al. Optimization of conditions for growth of wild-type and genetically transformed *Trypanosoma cruzi* on agarose plates. **Parasitology**, v. 118 ( Pt 5), p. 461-7, May 1999. ISSN 0031-1820. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10363279> >.

MONTILLA, M. M. et al. Isoenzyme clustering of Trypanosomatidae Colombian populations. **Am J Trop Med Hyg**, v. 66, n. 4, p. 394-400, Apr 2002. ISSN 0002-9637. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12164294> >.

MUKHERJEE, A.; LANGSTON, L. D.; OUELLETTE, M. Intrachromosomal tandem duplication and repeat expansion during attempts to inactivate the subtelomeric essential gene GSH1 in *Leishmania*. **Nucleic Acids Res**, v. 39, n. 17, p. 7499-511, Sep 2011. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21693561> >.

NADAL, M. S. et al. The CD26-related dipeptidyl aminopeptidase-like protein DPPX is a critical component of neuronal A-type K<sup>+</sup> channels. **Neuron**, v. 37, n. 3, p. 449-61, Feb 2003. ISSN 0896-6273. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12575952> >.

NAKADA, S. et al. Non-canonical inhibition of DNA damage-dependent ubiquitination by OTUB1. **Nature**, v. 466, n. 7309, p. 941-6, Aug 2010. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20725033> >.

NANAO, M. H. et al. Crystal structure of human otubain 2. **EMBO Rep**, v. 5, n. 8, p. 783-8, Aug 2004. ISSN 1469-221X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15258613> >.

NELSON, G. A.; ANDREWS, M. L.; KARNOVSKY, M. J. Control of erythrocyte shape by calmodulin. **J Cell Biol**, v. 96, n. 3, p. 730-5, Mar 1983. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6833381> >.

NIJMAN, S. M. et al. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. **Cell**, v. 123, n. 5, p. 773-86, Dec 2005. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16325574> >.

NITZ, N. et al. Heritable integration of kDNA minicircle sequences from *Trypanosoma cruzi* into the avian genome: insights into human Chagas disease. **Cell**, v. 118, n. 2, p. 175-86, Jul 2004. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15260988> >.



NOGUEIRA, N. F. et al. Trypanosoma cruzi: involvement of glycoinositolphospholipids in the attachment to the luminal midgut surface of Rhodnius prolixus. **Exp Parasitol**, v. 116, n. 2, p. 120-8, Jun 2007. ISSN 0014-4894. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17306256> >.

NOZAKI, T.; CROSS, G. A. Functional complementation of glycoprotein 72 in a Trypanosoma cruzi glycoprotein 72 null mutant. **Mol Biochem Parasitol**, v. 67, n. 1, p. 91-102, Sep 1994. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7838187> >.

OHKUBO, I. et al. Dipeptidyl peptidase IV from porcine seminal plasma: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. **J Biochem**, v. 116, n. 5, p. 1182-6, Nov 1994. ISSN 0021-924X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7896751> >.

OLSEN, C.; WAGTMANN, N. Identification and characterization of human DPP9, a novel homologue of dipeptidyl peptidase IV. **Gene**, v. 299, n. 1-2, p. 185-93, Oct 2002. ISSN 0378-1119. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12459266> >.

OTSU, K.; DONELSON, J. E.; KIRCHHOFF, L. V. Interruption of a Trypanosoma cruzi gene encoding a protein containing 14-amino acid repeats by targeted insertion of the neomycin phosphotransferase gene. **Mol Biochem Parasitol**, v. 57, n. 2, p. 317-30, Feb 1993. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8381919> >.

\_\_\_\_\_. Trypanosoma cruzi: interruption of both alleles of a gene encoding a protein containing 14-amino-acid repeats by targeted insertion of NEO<sup>r</sup> and HYGr. **Exp Parasitol**, v. 81, n. 4, p. 529-35, Dec 1995. ISSN 0014-4894. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8542994> >.

PACHECO, B. P. et al. Dipeptidyl peptidase IV inhibition attenuates blood pressure rising in young spontaneously hypertensive rats. **J Hypertens**, v. 29, n. 3, p. 520-8, Mar 2011. ISSN 1473-5598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21150640> >.

PAPADOPOULOU, B.; DUMAS, C. Parameters controlling the rate of gene targeting frequency in the protozoan parasite Leishmania. **Nucleic Acids Res**, v. 25, n. 21, p. 4278-86, Nov 1997. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9336458> >.

PEREZ BRANDAN, C. et al. Knockout of the dhfr-ts gene in Trypanosoma cruzi generates attenuated parasites able to confer protection against a virulent challenge.

**PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 12, p. e1418, Dec 2011. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22180798> >.

PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A.; MULLER, C. A.; MOREIRA, C. J. Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of hosts with Chagas' disease. 4--The reflection of parasite stock in the responsiveness of different vector species to chronic infection with different *Trypanosoma cruzi* stocks. **Rev Saude Publica**, v. 24, n. 3, p. 165-77, Jun 1990. ISSN 0034-8910. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2128851> >.

PETHERICK, A. Country by country. **Nature**, v. 465, n. 7301, p. S10-1, Jun 2010. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20571547> >.

PICKART, C. M. Mechanisms underlying ubiquitination. **Annu Rev Biochem**, v. 70, p. 503-33, 2001. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11395416> >.

POLAK, A.; RICHLE, R. Mode of action of the 2-nitroimidazole derivative benznidazole. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 72, n. 1, p. 45-54, Feb 1978. ISSN 0003-4983. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/418744> >.

POOLE, L. B.; KARPLUS, P. A.; CLAIBORNE, A. Protein sulfenic acids in redox signaling. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 44, p. 325-47, 2004. ISSN 0362-1642. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744249> >.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infect Dis**, v. 1, n. 2, p. 92-100, Sep 2001. ISSN 1473-3099. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11871482> >.

RAMIREZ, M. I. et al. The use of the green fluorescent protein to monitor and improve transfection in *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 111, n. 1, p. 235-40, Nov 2000. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11087935> >.

RAO, M. B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 62, n. 3, p. 597-635, Sep 1998. ISSN 1092-2172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9729602> >.

RASSI, A.; LITTLE, W. C. Chagas' heart disease. **Clin Cardiol**, v. 23, n. 12, p. 883-9, Dec 2000. ISSN 0160-9289. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11129673> >.

RAWLINGS, J. S. et al. Two *Drosophila* suppressors of cytokine signaling (SOCS) differentially regulate JAK and EGFR pathway activities. **BMC Cell Biol**, v. 5, n. 1, p. 38, Oct 2004. ISSN 1471-2121. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15488148> >.

REINHOLD, D. et al. Role of dipeptidyl peptidase IV (DP IV)-like enzymes in T lymphocyte activation: investigations in DP IV/CD26-knockout mice. **Clin Chem Lab Med**, v. 47, n. 3, p. 268-74, 2009. ISSN 1434-6621. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19676138> >.

RETTIG, W. J. et al. Regulation and heteromeric structure of the fibroblast activation protein in normal and transformed cells of mesenchymal and neuroectodermal origin. **Cancer Res**, v. 53, n. 14, p. 3327-35, Jul 1993. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8391923> >.

RHEE, S. G. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. **Exp Mol Med**, v. 31, n. 2, p. 53-9, Jun 1999. ISSN 1226-3613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10410302> >.

RIBEIRO, A. L.; ROCHA, M. O. [Indeterminate form of Chagas disease: considerations about diagnosis and prognosis]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 31, n. 3, p. 301-14, 1998 May-Jun 1998. ISSN 0037-8682. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9612022> >.

ROCHA, M. O.; NUNES, M. C.; RIBEIRO, A. L. Morbidity and prognostic factors in chronic chagasic cardiopathy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 159-66, Jul 2009. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19753471> >.

RODRIGUES COURA, J.; DE CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3-24, Jan 2002. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11992141> >.

ROSENBLUM, J. S.; KOZARICH, J. W. Prolyl peptidases: a serine protease subfamily with high potential for drug discovery. **Curr Opin Chem Biol**, v. 7, n. 4, p. 496-504, Aug 2003. ISSN 1367-5931. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12941425> >.

RUDENKO, G. et al. Procylic acidic repetitive protein (PARP) genes located in an unusually small alpha-amanitin-resistant transcription unit: PARP promoter activity assayed by transient DNA transfection of *Trypanosoma brucei*. **Mol Cell Biol**, v. 10, n. 7, p. 3492-504, Jul 1990. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1694012> >.

SCHADE, J. et al. Regulation of expression and function of dipeptidyl peptidase 4 (DP4), DP8/9, and DP10 in allergic responses of the lung in rats. **J Histochem Cytochem**, v. 56, n. 2, p. 147-55, Feb 2008. ISSN 0022-1554. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17967935> >.

SEEMÜLLER, E. et al. Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. **Science**, v. 268, n. 5210, p. 579-82, Apr 1995. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7725107> >.

SERPELONI, M. et al. An essential nuclear protein in trypanosomes is a component of mRNA transcription/export pathway. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e20730, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21687672> >.

SHI, H. et al. Argonaute protein in the early divergent eukaryote *Trypanosoma brucei*: control of small interfering RNA accumulation and retroposon transcript abundance. **Mol Cell Biol**, v. 24, n. 1, p. 420-7, Jan 2004. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14673174> >.

SHIRAKAWA, J. et al. Diet-induced adipose tissue inflammation and liver steatosis are prevented by DPP-4 inhibition in diabetic mice. **Diabetes**, v. 60, n. 4, p. 1246-57, Apr 2011. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21330637> >.

SIMPSON, L. et al. Comparison of the maxicircle (mitochondrial) genomes of *Leishmania tarentolae* and *Trypanosoma brucei* at the level of nucleotide sequence. **J Biol Chem**, v. 262, n. 13, p. 6182-96, May 1987. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3032958> >.

SOARES, L. et al. Two isoforms of otubain 1 regulate T cell energy via GRAIL. **Nat Immunol**, v. 5, n. 1, p. 45-54, Jan 2004. ISSN 1529-2908. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14661020> >.

SOUTO, R. P. et al. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 83, n. 2, p. 141-52, Dec 1996. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9027747> >.

STEVERDING, D.; TYLER, K. M. Novel antitrypanosomal agents. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 14, n. 8, p. 939-55, Aug 2005. ISSN 1744-7658. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16050789> >.

SUN, X. X.; CHALLAGUNDLA, K. B.; DAI, M. S. Positive regulation of p53 stability and activity by the deubiquitinating enzyme Otubain 1. **EMBO J**, v. 31, n. 3, p. 576-92, Feb 2012. ISSN 1460-2075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22124327> >.

SWENERTON, R. K. et al. The oligopeptidase B of Leishmania regulates parasite enolase and immune evasion. **J Biol Chem**, v. 286, n. 1, p. 429-40, Jan 2011. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20961853> >.

SÁNCHEZ-GUILLÉN, M. E. C. et al. Trypanosoma cruzi strains isolated from human, vector, and animal reservoir in the same endemic region in Mexico and typed as T. cruzi I, discrete typing unit 1 exhibit considerable biological diversity. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 6, p. 585-90, Sep 2006. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17072468> >.

TAKASAWA, W. et al. Inhibition of dipeptidyl peptidase 4 regulates microvascular endothelial growth induced by inflammatory cytokines. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 401, n. 1, p. 7-12, Oct 2010. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20828536> >.

TANAKA, S. et al. Suppression of arthritis by the inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. **Int J Immunopharmacol**, v. 19, n. 1, p. 15-24, Jan 1997. ISSN 0192-0561. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9226475> >.

TEIXEIRA, A. R. et al. Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. **Clin Microbiol Rev**, v. 24, n. 3, p. 592-630, Jul 2011. ISSN 1098-6618. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21734249> >.

TEIXEIRA, S. M.; DAROCHA, W. D. Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae. **Genet Mol Res**, v. 2, n. 1, p. 148-58, 2003. ISSN 1676-5680. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12917811> >.

TEN ASBROEK, A. L.; OUELLETTE, M.; BORST, P. Targeted insertion of the neomycin phosphotransferase gene into the tubulin gene cluster of Trypanosoma brucei. **Nature**, v. 348, n. 6297, p. 174-5, Nov 1990. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2172836> >.

TIBBETTS, R. S.; KLEIN, K. G.; ENGMAN, D. M. A rapid method for protein localization in trypanosomes. **Exp Parasitol**, v. 80, n. 3, p. 572-4, May 1995. ISSN 0014-4894. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7537220> >.

TOMAS, A. M.; MILES, M. A.; KELLY, J. M. Overexpression of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, is associated with enhanced metacyclogenesis. **Eur J Biochem**, v. 244, n. 2, p. 596-603, Mar 1997. ISSN 0014-2956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9119029> >.

TOVAR, J. et al. Evidence that trypanothione reductase is an essential enzyme in *Leishmania* by targeted replacement of the tryA gene locus. **Mol Microbiol**, v. 29, n. 2, p. 653-60, Jul 1998. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9720880> >.

TRAN, H. J. et al. Structure of the Jab1/MPN domain and its implications for proteasome function. **Biochemistry**, v. 42, n. 39, p. 11460-5, Oct 2003. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14516197> >.

URBINA, J. A. Chemotherapy of Chagas disease. **Curr Pharm Des**, v. 8, n. 4, p. 287-95, 2002. ISSN 1381-6128. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11860367> >.

VAN GOETHEM, S. et al. Structure-activity relationship studies on isoindoline inhibitors of dipeptidyl peptidases 8 and 9 (DPP8, DPP9): is DPP8-selectivity an attainable goal? **J Med Chem**, v. 54, n. 16, p. 5737-46, Aug 2011. ISSN 1520-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21711053> >.

VAZQUEZ, M. P.; LEVIN, M. J. Functional analysis of the intergenic regions of TcP2beta gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector. **Gene**, v. 239, n. 2, p. 217-25, Nov 1999. ISSN 0378-1119. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10548722> >.

VICKERMAN, K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. **Int J Parasitol**, v. 24, n. 8, p. 1317-31, Dec 1994. ISSN 0020-7519. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7729984> >.

VON BONIN, A.; HÜHN, J.; FLEISCHER, B. Dipeptidyl-peptidase IV/CD26 on T cells: analysis of an alternative T-cell activation pathway. **Immunol Rev**, v. 161, p. 43-53, Feb 1998. ISSN 0105-2896. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9553763> >.

WALBORG, E. F. et al. Identification of dipeptidyl peptidase IV as a protein shared by the plasma membrane of hepatocytes and liver biomatrix. **Exp Cell Res**, v. 158, n. 2, p. 509-18, Jun 1985. ISSN 0014-4827. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3891389> >.

WANG, J.; MALDONADO, M. A. The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases. **Cell Mol Immunol**, v. 3, n. 4, p. 255-61, Aug 2006. ISSN 1672-7681. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16978533> >.

WEISSMAN, A. M. Themes and variations on ubiquitylation. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 2, n. 3, p. 169-78, Mar 2001. ISSN 1471-0072. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11265246> >.

WESTENBERGER, S. J. et al. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **Genetics**, v. 171, n. 2, p. 527-43, Oct 2005. ISSN 0016-6731. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15998728> >.

WILKINSON, K. D. Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. **Semin Cell Dev Biol**, v. 11, n. 3, p. 141-8, Jun 2000. ISSN 1084-9521. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10906270> >.

WILKINSON, S. R. et al. The *Trypanosoma cruzi* enzyme TcGPXI is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or tryparedoxin. **J Biol Chem**, v. 277, n. 19, p. 17062-71, May 2002. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11842085> >.

\_\_\_\_\_. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 13, p. 5022-7, Apr 2008. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18367671> >.

WIRTZ, E.; CLAYTON, C. Inducible gene expression in trypanosomes mediated by a prokaryotic repressor. **Science**, v. 268, n. 5214, p. 1179-83, May 1995. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7761835> >.

WIRTZ, E. et al. A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 99, n. 1, p. 89-101, Mar 1999. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10215027> >.

WRIGHT, M. C. et al. Gliotoxin stimulates the apoptosis of human and rat hepatic stellate cells and enhances the resolution of liver fibrosis in rats. **Gastroenterology**, v. 121, n. 3, p. 685-98, Sep 2001. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11522753> >.

XIA, Q. et al. Proteomic identification of novel proteins associated with Lewy bodies. **Front Biosci**, v. 13, p. 3850-6, 2008. ISSN 1093-4715. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18508479> >.

XIE, H. Y. et al. Evaluation of hepatitis B virus replication and proteomic analysis of HepG2.2.15 cell line after cyclosporine A treatment. **Acta Pharmacol Sin**, v. 28, n. 7, p. 975-84, Jul 2007. ISSN 1671-4083. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17588333> >.

XU, D. et al. Evaluation of high efficiency gene knockout strategies for *Trypanosoma cruzi*. **BMC Microbiol**, v. 9, p. 90, 2009. ISSN 1471-2180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19432966> >.

YARON, A.; NAIDER, F. Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v. 28, n. 1, p. 31-81, 1993. ISSN 1040-9238. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8444042> >.

YAZBECK, R.; HOWARTH, G. S.; ABBOTT, C. A. Dipeptidyl peptidase inhibitors, an emerging drug class for inflammatory disease? **Trends Pharmacol Sci**, v. 30, n. 11, p. 600-7, Nov 2009. ISSN 1873-3735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19837468> >.

YU, D. M. et al. The in vivo expression of dipeptidyl peptidases 8 and 9. **J Histochem Cytochem**, v. 57, n. 11, p. 1025-40, Nov 2009. ISSN 1551-5044. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19581630> >.

\_\_\_\_\_. Extraenzymatic functions of the dipeptidyl peptidase IV-related proteins DP8 and DP9 in cell adhesion, migration and apoptosis. **FEBS J**, v. 273, n. 11, p. 2447-60, Jun 2006. ISSN 1742-464X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16704418> >.

\_\_\_\_\_. The dipeptidyl peptidase IV family in cancer and cell biology. **FEBS J**, v. 277, n. 5, p. 1126-44, Mar 2010. ISSN 1742-4658. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20074209> >.

ZAGHA, E. et al. DPP10 modulates Kv4-mediated A-type potassium channels. **J Biol Chem**, v. 280, n. 19, p. 18853-61, May 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15671030> >.

ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem Inst Oswaldo**



**Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051-4, Nov 2009. ISSN 1678-8060. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20027478> >.

\_\_\_\_\_. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. **Int J Parasitol**, v. 28, n. 1, p. 105-12, Jan 1998. ISSN 0020-7519. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9504338> >.

\_\_\_\_\_. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94 Suppl 1, p. 159-64, 1999. ISSN 0074-0276. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10677706> >.

ZOMERDIJK, J. C. et al. The promoter for a variant surface glycoprotein gene expression site in *Trypanosoma brucei*. **EMBO J**, v. 9, n. 9, p. 2791-801, Sep 1990. ISSN 0261-4189. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1697265> >.