



Universidade de Brasília – UnB

Instituto de Ciências Biológicas – IB

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Expressão heteróloga e deleção da otubaína de *Trypanosoma cruzi* (*otutc*) por intermédio do sistema CRISPR/Cas9

Allan Mascarenhas Amaral Barroso

Orientadora:

Prof^a. Dra. Izabela Marques Dourado Bastos

Brasília,

Julho, 2019



Universidade de Brasília – UnB

Instituto de Ciências Biológicas – IB

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Allan Mascarenhas Amaral Barroso

Expressão heteróloga e deleção da otubaína de *Trypanosoma cruzi* (*otutc*) por intermédio do sistema CRISPR/Cas9

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) para obtenção
do título de Mestre em Biologia Molecular.

Orientador(a):

Prof^a Izabela Marques Dourado Bastos

Brasília,

Julho, 2019



Allan Mascarenhas Amaral Barroso

Expressão heteróloga e deleção da otubaína de *Trypanosoma cruzi* (*otutc*) por intermédio do sistema CRISPR/Cas9

31 de julho de 2019

Banca Examinadora

Prof^a.Dra. Izabela Marques Dourado Bastos (Presidente)

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular – Universidade de Brasília

Prof.Dr. Vicente de Paulo Martins (Membro)

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular – Universidade de Brasília

Prof^a.Dra. Carla Nunes de Araújo (Membro Externo)

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas – Universidade de Brasília

Dra. Camila Lasse Silva (Membro Suplente)



“Nunca encontrei uma enzima que não fosse interessante”

Arthur Kornberg



Dedico este trabalho a todos(as) os(as) LGBTs cujas vidas foram ceifadas pela LGBTfobia, os(as) quais, portanto, não tiveram a oportunidade de adentrar a universidade e contribuir, por intermédio da Ciência, com o processo civilizatório da humanidade.

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dra. **Izabela Marques Dourado Bastos**, minha orientadora por mais de sete anos, por acreditar em mim quando ainda era um estudante de graduação recém-egresso do ensino médio, mas com muita vontade de aprender.

À minha mãe, **Cirleide Amaral dos Santos**, por ser minha base, meu exemplo; por me ensinar a devoção aos estudos e o amor ao conhecimento, por me incentivar em seguir uma carreira na ciência e, acima de tudo, por seu amor materno incondicional.

À minha avó materna, **Eleusa Mascarenhas do Amaral**, por sua fortaleza, por seus cuidados de “vó” e por, desde a infância, ensinar-me o valor dos estudos.

Às minhas tias, **Gláucia Amaral dos Santos** e **Vânia Miralda Amaral dos Santos**, pelo carinho, pelo companheirismo, por acreditarem em mim e por sempre me incentivarem.

A meu tio, **Úalace Delano Amaral dos Santos**, pelo carinho, pelo companheirismo, por acreditar em mim e por sempre me incentivar.

À **Universidade de Brasília**, espaço público e gratuito de ensino, pesquisa e extensão que me acolheu como estudante de graduação, em 2011, e, posteriormente, como estudante de pós-graduação, em 2017. Nesse espaço de partilhamento de saberes e vivências, bem como de (des)construção, aprendi que somente a luta muda a vida e faço desta um instrumento contínuo de transformação pessoal e da realidade à minha volta.

A **Darcy Ribeiro** e **Anísio Teixeira**, fundadores da Universidade de Brasília, que por almejam um país livre, fraterno e igualitário não lograram em partilhar com toda a sociedade brasileira uma universidade plural, democrática e comprometida com o processo emancipatório do Brasil.

Aos ex-presidentes **Luís Inácio Lula da Silva** e **Dilma Vana Rousseff**, por terem, de fato, investido na educação superior pública, permitindo que mais brasileiros e brasileiras tivessem acesso à universidade. Agradeço, em especial, à ex-presidenta Dilma Rousseff, que por intermédio de seu programa de governo “Ciências sem Fronteiras”, permitiu-me participar de uma graduação-sanduíche em Biotecnologia em uma instituição de excelência no Canadá.

Ao Prof. Dr. **Jaime Martins de Santana**, que primeiro me acolheu em seu grupo de pesquisa ao confiar em minha sede de aprender, dando-me a oportunidade de ser seu estudante de iniciação científica ainda no primeiro semestre de graduação, em 2011.

À Prof^a. Dra. **Carla Nunes de Araújo** pela disposição em me ensinar e, não poucas vezes, em me co-orientar, aconselhar e por ter aceito o convite para ser parte desta banca de defesa.

À Prof^a. Dra. **Flávia Nader Motta**, por acreditar em meu potencial como estudante e pesquisador.

À Prof^a. Dra. **Tatiana Campos**, pela amizade, apoio e confiança.

À Prof^a. Dra. **Kelly Grace Magalhães**, pela amizade, pela confiança, pelos conselhos e pelo apoio institucional de seu laboratório e de seu grupo de pesquisa.

À Prof^a. Dra. **Beatriz Dolabela de Lima**, pelo apoio institucional de seu laboratório, de seu grupo de pesquisa, bem como pela disposição em esclarecer dúvidas.

Ao Prof. Dr. **Vicente de Paulo Martins**, pelo apoio institucional de seu laboratório e grupo de pesquisa ao longo da execução de todo este projeto e por ter aceito o convite para participar desta banca de defesa.

À Prof^a. Dra. **Élida Geralda Campos**, pela amizade, por acreditar em mim como pesquisador e neste projeto de pesquisa.

À Prof^a. **Anne Karine Miranda Elleres**, de Ciências Naturais, no ensino fundamental, cujas aulas e didática me inspiraram em buscar uma profissão nas Ciências Biológicas, notadamente, na Biologia Molecular.

À **Raquel Lima de Melo**, amiga de longa data, desde o ensino fundamental, cujo apoio, companheirismo, conselhos e partilhas foram fundamentais ao longo desses anos, em especial, durante a consecução deste mestrado.

À **Lia Keiko de Souza Shimamura**, amiga de longa data, com quem já partilhei tantos momentos, entre alegres e tristes, e, que, mesmo à distância, não deixa ser companheira, cúmplice e de me apoiar em meus sonhos e projetos.

À **Amanda Freire do Nascimento**, pela amizade, pelo companheirismo, pela presença constante em minha vida, ainda que à distância, e pelas lutas e ideais dos quais partilhamos.

A **Dário Villefor**, amigo de longa data, desde o ensino médio, cuja amizade tanto aprecio e cujas conversas diárias tornam os meus dias mais leves.

A **Kaio Bentes**, amigo de longa data, desde o ensino médio e que tanto me apoiou durante este mestrado.

À **Melina Gonçalves Chagas de Laia**, amiga de intercâmbio, cuja amizade desconhece fronteiras e que me foi de fundamental importância durante o período em que moramos juntos no Canadá.

À **Rauciane Gomes**, amiga de bancada que muito me auxiliou com sua inteligência, técnica e carisma em meus primeiros meses no LIPH como estudante de iniciação científica.

À **Raquel Negreiros**, “primeira orientadora”, por todos os ensinamentos durante o período em que fui seu estudante de iniciação científica.

À **Camila Lasse Silva**, pela amizade, pelos conselhos, pela presteza em ensinar e ajudar e por ter aceito o convite para ser parte desta banca.

À **Yanna Reis Praça**, pela amizade, companheirismo, carinho, ensinamentos e conselhos.

À **Maria da Conceição Barreto**, pela amizade, pelo carinho e por se fazer presente na rotina do LIPH, sem a qual este trabalho não seria possível.

À **Amanda Pereira Rocha**, a quem devo tantos momentos de felicidade, ajuda, aprendizado e amadurecimento.



À **Cinara Marcela Valois**, pela amizade, companheirismo, carinho e cumplicidade. Por ter feito de seus amigos os meus também.

À **Grabriela Carvalho**, pela amizade, pela cumplicidade e por tantos momentos de júbilo partilhados, tanto no Brasil, como no Canadá.

À **Thaís Alves Passos**, melhor amiga de Cinara Marcela, mas que se tornou a minha também. Obrigado por sua amizade, por seu carinho, por seu companheirismo, por sua cumplicidade e, acima de tudo, por seu apoio em todos os momentos.

À **Jade Suzarte**, por sua amizade, companheirismo e apoio.

À **Maitê Lôbo Kolarik**, por sua amizade, companheirismo, apoio, confiança e torcida.

À **Rebeca Felix**, que me apresentou ao o movimento estudantil.

Às minhas amigas de ensino médio, sempre companheiras, as quais não logramos em partilhar momentos preciosos juntos: **Andreza Freire, Liliane Pessoa, Nathália Silva e Nathanne Silva**.

Aos meus amigos e colegas de trabalho respectivamente, no **LIPH, LBPQ, LABIOGENE, LAMP** e **LIMI** pela amizade, pela cumplicidade e apoio.

Aos meus amigos e colegas de trabalho na FHB, **Fundação Hemocentro de Brasília**, em especial, do **NUPRO** (Núcleo de Processamento) e do **NUDIS** (Núcleo de Distribuição), com os quais tenho o prazer em partilhar momentos de aprendizado e companheirismo.

À **Ryanne Camilo Caixeta**, minha chefe na Fundação Hemocentro de Brasília, pelo acolhimento, pela compreensão e pelo companheirismo. Sem sua ajuda, este trabalho não teria sido possível.



To Professor. M.Sc. **David Villeneuve** for being an outstanding professor, whose classes I do remember with enthusiasm and, also, for writing the letter of recommendation to the “Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular”, which was crucial to lead me here.

To Professor Ph.D. **Tara McGoey** and Professor Ph.D. **Corrie Duchesne** for all the knowledge taught by their classes and, also, for being so supportive during my staying as an international student at Canadore College.

To the ESL professors: **Kelly Allan, Jean Griffin, Susan Dujon-Trenker** and **Norma-Jean Nielsen** for kindly teaching me English. Without their support back then, I would never have learned a language that today I acknowledge as being mine.

To all my Canadian friends, especially, **Nick Frausin, Alexander Porter, Marissa MacGillivray** and **Candice Gagne**, who warmly welcomed me in their country and made me feel as if Canada were, too, “my home and native land”. Thank you!

À mes amis canadiennes du Québec, notamment, Marie - Pier **Laflame** et **Kim Breton**, pour l'amitié et l'affection avec lesquelles vous m'avez accueilli dans votre pays, faisant du Canada un pays que j'aime comme si c'était le mien. Merci!

Às instituições de fomento federais, distrital e independente, cujo aporte financeiro foi preponderante à execução desta pesquisa: **CAPES, CNPq, FAPDF** e **FINATEC**.

RESUMO

A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e transmitida por invertebrados pertencentes à subfamília Triatominae. Endêmica da América Latina, trata-se de uma doença tropical negligenciada para a qual os tratamentos disponíveis são ineficazes, exigindo, assim, novas alternativas terapêuticas. As proteases, enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas, estão envolvidas na regulação de diversos processos fisiológicos e, por conseguinte, têm sido objetos de estudos como potenciais alvos farmacêuticos em diversas doenças. A aplicação de CRISPR/Cas9, ferramenta biotecnológica de edição gênica, tem corroborado na elucidação do papel biológico de sequências gênicas diversas, podendo, também, ser aplicada para o entendimento do papel das sequências codificadoras para proteases. Neste contexto, este trabalho visou estudar o papel de uma cisteíno-protease do tipo otubaína mediante sua expressão heteróloga e deleção de ao menos um de seus alelos na cepa CL Brener de *T. cruzi*, de modo a estabelecer uma linhagem deletéria para o gene. Assim, o gene *otutc* foi clonado no vetor de expressão pET19b e expresso em *Escherichia coli*. Obteve-se, então, a otubaína recombinante (rOtuTc) purificada a partir da fração solúvel. A rOtuTc foi capaz de hidrolisar o substrato tetra-ubiquitina de origem humana (K48), sugerindo apresentar um papel de desubiquitinase. A linhagem ... de *T. cruzi* foi transfectada com RNA guia específico para *otutc* ou com cassetes indutores de recombinação homóloga no *locus* de interesse. Obteve-se cinco clones carreando o gene *bsd*, o qual confere resistência à marca de seleção blasticidina e que compõe um dos cassetes construídos e transfectados, sugerindo uma possível deleção de ao menos um dos alelos de *otutc*. Em conjunto, a obtenção tanto da proteína recombinante quanto de linhagens deletérias para *otutc* podem ajudar na elucidação do papel desse gene na biologia de *T. cruzi*, podendo despontar como um possível alvo farmacêutico para a doença de Chagas.

Palavras-chave: doença de Chagas, cisteíno-proteases, otubaína e CRISPR/Cas9



ABSTRACT

Chagas disease is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* and is transmitted by invertebrates belonging to the subfamily Triatominae. Endemic in Latin America, it is a neglected tropical disease for which available treatments are ineffective, thus requiring new therapeutic alternatives. Proteases, enzymes that catalyze the hydrolysis of peptide bonds, are involved in the regulation of various physiological processes and, therefore, have been studied as potential pharmaceutical targets in various diseases. The application of CRISPR / Cas9, a genetic editing biotechnological tool, has corroborated to the elucidation of the biological role of diverse gene sequences and can also be applied to understand the role of protease coding sequences. In this context, this work aimed to study the role of an otubain-like cysteine protease by its heterologous expression and deletion of, at least, one of its alleles in the *T. cruzi* CL Brener strain, in order to establish a deleterious lineage for the gene. Thus, the *otutc* gene was cloned into the pET19b expression vector and expressed in *Escherichia coli*. Purified recombinant otubain (rOtuTc) was then obtained from the soluble fraction. rOtuTc was able to hydrolyze the tetra-ubiquitin substrate of human origin (K48), suggesting to play a role of a deubiquitinase. The *T. cruzi* strain was transfected with target-specific RNA or homologous recombinant inducing cassettes at the locus of interest. Five clones bearing the *bsd* gene were obtained, which confers resistance to the blasticidine selection marker and which makes up one of the constructed and transfected cassettes, suggesting a possible deletion of, at least, one of the other alleles. Together, obtaining both recombinant protein and deleterious strains for *otutc* may help to elucidate the role of this gene in *T. cruzi* biology and may emerge as a possible pharmaceutical target for Chagas disease.

Key words: Chagas disease, cysteine proteases, otubain and CRISPR/Cas9

LISTA DE ABREVIações

Anti-rOtuTc	anticorpo contra a otubaína recombinante de <i>Trypanosoma cruzi</i>
bp	pares de base (do inglês <i>base pair</i>)
<i>bsd</i>	blastocidina deaminase (gene de resistência)
Cas9	endonuclease associada a <i>locus</i> CRISPR
CRISPR	repetições agrupadas regularmente interespaçadas curtas e palindrômicas (do inglês <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>)
crRNA	CRISPR RNA
DSB	quebra da dupla-fita (do inglês <i>Double-Strand Break</i>)
DNA	ácido desoxiribonucleico (do inglês <i>desoxiribonucleic acid</i>)
DTU	unidades discretas de tipagem (do inglês <i>Discrete Typing Units</i>)
DUB	desubiquitinases
HDR	reparo por homologia direta (do inglês <i>Homology Directed Repair</i>)
<i>hph</i>	higromicina B fosfotransferase (gene de resistência)
<i>hx1</i>	região intergênica do gene <i>tc2β</i>
IPTG	isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo
Kb	kilo base
kDa	kilo Dalton
kDNA	DNA do cinetoplasto
LIT	infusão trípica de fígado (do inglês <i>Liver Infusion Tryptone</i>)
mRNA	RNA mensageiro
MMEJ	junção de extremidades mediada por micro-homologia (do inglês <i>Microhomology Mediated End-Joining</i>)

NHEJ	junção de extremidades não-homólogas (do inglês <i>Non-Homologous End-Joining</i>)
<i>npt</i>	neomicina fosfotransferase (gene de resistência)
ORF	fase aberta de leitura (do inglês <i>Open Reading Frame</i>)
OtuLi	otubaína de <i>Leishmania infantum</i>
OtuTc	otubaína de <i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>otutc</i>	gene codificador para a otubaína de <i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>pac</i>	puromicina N acetiltransferase (gene de resistência)
PBS	fosfato salino tamponado (do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
rOtuLi	otubaína recombinante de <i>Leishmania infantum</i>
rOtuTc	otubaína recombinante de <i>Trypanosoma cruzi</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
sgRNA	RNA guia (do inglês <i>single guide RNA</i>)
TBS	tampão salino Tris (do inglês <i>Tris Buffered Saline</i>)
tracrRNA	CRISPR RNA transativador
<i>tub</i>	região intergênica
Ub	ubiquitinas
UTR	região não traduzida (do inglês <i>Untranslated Region</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
WT	tipo selvagem (do inglês <i>wild type</i>)
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo



SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
LISTA DE ABREVIações.....	13
INTRODUÇÃO	17
1. Doença de Chagas	18
2. <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
2.1. Ciclo Biológico.....	24
2.2. Sistemática Filogenética	27
2.3. Genética.....	31
2.4. Expressão Gênica.....	35
3. Proteases	39
3.1. Cisteíno-proteases.....	42
3.2. Via da Ubiquitinação-Desubiquitinação e Otubaína	45
4. CRISPR/Cas9	49
JUSTIFICATIVA.....	55
OBJETIVOS	57
METODOLOGIA	59
Análise <i>in silico</i> de <i>otutc</i>	60
Cultura de <i>Trypanosoma cruzi</i>	60
Extração de DNA genômico.....	61
Eletroforese em gel de agarose.....	61
Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS/PAGE)	62
Clonagem de <i>otutc</i>	63
Expressão e Purificação de rOtuTc	64
Teste de atividade enzimática de rOtuTc	66
Obtenção de anticorpos policlonais anti-rOtuTc.....	66
Preparação plasmidial.....	67
Transformação de <i>Escherichia coli</i>	68
Plaqueamento e inoculação.....	68
PCRs de colônia	69



Imunofluorescência.....	69
Estratégias para deleção de <i>otutc</i> utilizando sistema CRISPR/Cas9.....	71
I. Construção do Cassete <i>ultra/otutc_hx1_hph_tub_otutc/ultra</i>	73
II. Construção do Cassete <i>ultra/otutc_bsd_otutc/ultra</i>	75
Amplificação do cassete <i>ultra/otutc_hx1_hph_tub_otutc/ultra</i>	76
Amplificação do cassete <i>ultra/otutc_bsd_otutc/ultra</i>	76
Seleção do sgRNA e transcrição <i>in vitro</i>	77
Transfecção e Clonagem	77
Sequenciamento	78
Extrato total de proteínas de <i>T. cruzi</i>	78
Western blotting	79
PCR de confirmação de integração do cassete <i>ultra/otutc_bsd_otutc/ultra</i>	80
RESULTADOS.....	81
Análises <i>in silico</i> do gene <i>otutc</i>	82
I. Localização de <i>otutc</i> no genoma de <i>T. cruzi</i> da cepa CL Brener.....	82
II. Identidade entre as sequências de nucleotídeos dos alelos de <i>otutc</i>	84
III. Identidade entre as sequências de aminoácidos codificados pelos alelos de <i>otutc</i> , identificação do domínio OTU e do sítio catalítico	85
Clonagem do gene <i>otutc</i> no vetor de expressão pET19b	89
Indução, Expressão e Purificação de rOtuTc.....	92
Avaliação enzimática de rOtuTc.....	96
Produção de anticorpos policlonais anti-rOtuTc.....	97
Transcrição <i>in vitro</i> do sgRNA (sgRNA_ <i>otutc</i> _412_revcom).....	99
Construção do cassete <i>hx1_tub</i>	100
Clonagem de <i>hph</i> em pGEM	103
Construção do Cassete <i>ultra/otutc_hx1_hph_tub_otutc/ultra</i>	104
Transfecção e clonagem de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> utilizando o cassete <i>ultra/otutc_hx1_hph_tub_otutc/ultra</i>	106
Confecção do cassete <i>ultra/otutc_bsd_otutc/ultra</i>	109
Transfecção e clonagem de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> utilizando o cassete <i>ultra/otutc_bsd_otutc/ultra</i>	110
DISCUSSÃO	112
CONCLUSÃO	116
PERSPECTIVAS.....	118
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120



INTRODUÇÃO

1. Doença de Chagas

A doença de Chagas, ou Tripanossomíase Americana, é uma enfermidade endêmica das Américas que afeta entre 6 a 7 milhões de pessoas em todo o mundo (WHO, 2019). No Brasil, estima-se que cerca de 2 a 3 milhões de pessoas estejam infectadas (FIOCRUZ, 2013). Causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, constitui uma antropozoonose transmitida pelas fezes e urina de insetos hematófagos da subfamília Triatominae (CHAGAS, 1909). Tanto o agente etiológico quanto o vetor, bem como o intrincado ciclo biológico que os envolve e as manifestações clínicas decorrentes da infecção, foram descritos pelo médico sanitário e pesquisador brasileiro Carlos Chagas, em 1909 (PUNUKOLLU; GOWDA; KHAN, 2004). A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica a doença de Chagas como negligenciada, uma vez que da época de sua descoberta até o presente momento, não há vacinas disponíveis para fins de profilaxia, tampouco tratamentos eficazes; em especial, para a fase crônica da enfermidade, que pode levar à sua manifestação clínica mais letal (COURA; BORGES-PEREIRA, 2011). Caracterizada como um problema de saúde pública que afeta, principalmente, as classes sociais mais vulneráveis economicamente, a doença de Chagas tem figurado entre as mais graves doenças infecto-parasitárias da América Latina (KRATZ, 2019).

A transmissão do parasito é realizada por insetos hematófagos da família Reduviidae e subfamília Triatominae: os triatomíneos (KAUFER *et al.*, 2017). No Brasil, são popularmente conhecidos pela alcunha de “barbeiros” (PUNUKOLLU; GOWDA; KHAN, 2004). Até o presente momento, 151 espécies de triatomíneos encontram-se catalogadas, as quais possuem importância epidemiológica para a doença em humanos (VIEIRA *et al.*, 2018). O contato das excretas do barbeiro com a lesão cutânea ocasionada pela picada ou com as mucosas é a porta de entrada para o parasito invadir as células do hospedeiro. Esta forma de transmissão é chamada, na literatura científica, de transmissão vetorial clássica ou via vetorial (TYLER; OLSON; ENGMAN, 2003). Outras formas de transmissão, que não a clássica, já se encontram descritas na literatura e também possuem valor epidemiológico. Dentre as quais, destacam-se: a via oral, ocasionada pela ingestão de alimentos contaminados com os dejetos do barbeiro ou com o próprio barbeiro contaminado macerado; a via congênita, da mãe para o

feto, na qual a transmissão do parasito acontece durante a gestação; a via transfusional, mediante transfusão de sangue e órgãos contaminados com o parasito a pessoas não infectadas; e por acidentes laborais, em laboratórios ou hospitais, mediante falhas na execução de protocolos de biossegurança (COURA, 2015). Logo, a transmissão da doença não se restringe apenas à presença de vetores contaminados, mas, também, mediante falhas no armazenamento e processamento de alimentos; na ausência ou na deficiência da assistência neonatal à gestante; na ausência ou na deficiência de triagem sorológica e molecular de sangue e órgãos doados, anteriormente à transfusão em receptores; e na ausência ou deficiência de boas-práticas laboratoriais (COURA, 2015).

Os barbeiros adquirem o *T. cruzi* ao se alimentarem do sangue de outros animais, notadamente, mamíferos. Essa classe de vertebrados constitui o principal reservatório do *T. cruzi* (OCAÑA-MAYORGA *et al.*, 2018). Em meio a diversidade de reservatórios possíveis ao agente etiológico da Tripanossomíase Americana, diversas, também, são as espécies de barbeiros já catalogadas como possíveis transmissores da doença de Chagas (NOIREAU; DIOSQUE; JANSEN, 2009). Contudo, nem todas as espécies enquadram-se como boas transmissoras, haja vista que o processo de metaciclogênese, o qual promove a passagem da forma não infectiva do parasito à sua forma infectiva, depende, dentre outros fatores, da espécie do triatomíneo (GONÇALVES *et al.*, 2018). Não necessariamente a espécie que possui quantidades elevadas de parasito no trato gastrointestinal corresponde à espécie com melhor transmissão da forma infectiva, variando a eficiência da metaciclogênese de espécie para espécie (DWORAK *et al.*, 2017). Em 2006, a Organização Pan-Americana de Saúde, OPAS, e a OMS concederam ao País a certificação internacional de interrupção da transmissão da Tripanossomíase Americana pelo *T. infestans* (ARAÚJO, RENATO FREITAS *et al.*, 2014). Todavia, outras espécies presentes no espaço geográfico brasileiro e consideradas secundárias ou alternativas à transmissão, quando comparadas ao *T. infestans*, têm sido capazes de transmitir a doença pela via vetorial. Dentre as espécies de triatomíneos também capazes de transmitirem a doença têm-se o *T. sordida*, *T. pseudomaculata*, *T. brasiliensis* e o *Rhodinus prolixus* (VILLALOBOS *et al.*, 2019). Nesse sentido, a via vetorial, conjugada com surtos de transmissão pela via oral em algumas partes do País, demonstram como a doença de Chagas constitui, ainda, uma questão de saúde pública preponderante, a despeito dos avanços notórios

no que tange ao controle vetorial, à assistência neonatal e à otimização das práticas transfusionais e de biossegurança (LIDANI *et al.*, 2019).

Ainda que endêmica das Américas, em virtude das condições biológicas de sobrevivência e proliferação do vetor, bem como dos reservatórios, a doença de Chagas não se restringe apenas aos países da América Latina e à porção sudoeste dos Estados Unidos (COURA; BORGES-PEREIRA, 2011). Os fluxos migratórios das últimas décadas, impulsionadas pela globalização, tem permitido que a doença também tenha registros de ocorrência em regiões não-endêmicas, tais como Canadá, Japão, Austrália e Europa (SCHMUNIS; YADON, 2010). O fenômeno da globalização, portanto, além de fomentar os fluxos de capitais, bens, serviços e pessoas, também internacionaliza micro-organismos e doenças (VILLALTA; RACHAKONDA, 2019).

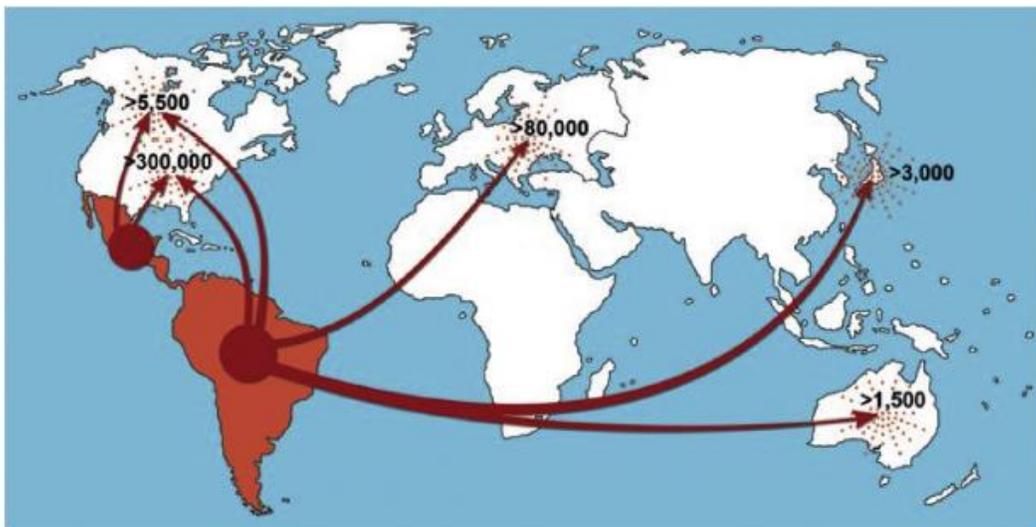


Figura 1. Distribuição geográfica de indivíduos infectados por *Trypanosoma cruzi* (SCHMUNIS; YADON, 2010). As setas, em vermelho, indicam o fluxo migratório da América Latina, região endêmica, para outras regiões não-endêmicas. Os números em cada região indicam a quantidade de indivíduos infectados por Chagas.

Do ponto de vista da patologia, a doença de Chagas se configura como uma desordem fisiológica multisistêmica, haja vista compromete a homeostase de diferentes órgãos em múltiplos sistemas (COURA; BORGES-PEREIRA, 2011). As manifestações clínicas decorrentes encontram-se divididas em dois estágios: uma fase aguda e outra crônica (BARRY *et al.*, 2019). Na fase aguda, que na maior parte dos casos é assintomática, pode haver a formação de um edema local referente à entrada do parasito, o qual é nomeado chagoma de inoculação. Ainda nessa fase, observa-se uma elevada parasitemia, a qual é resultante da multiplicação exponencial dos parasitos. Além da parasitemia acentuada, pode ocorrer, também, inflamação de diferentes tecidos, mal-estar, edemas subcutâneos, cefaleia, hepatomegalia, esplenomegalia e disfunção cardíaca (FILHO, 2019). Findada a fase aguda, a maior parte dos infectados permanece assintomática por meses ou mesmo décadas, com variações nos níveis de parasitemia (ANDRADE, DANIELA V.; GOLLOB; DUTRA, 2014). Contudo, cerca de 20 % a 30 % dos infectados pelo *T. cruzi* evoluem para a fase crônica, para a qual os tratamentos quimioterápicos disponíveis são ineficazes (MARAÑÓN *et al.*, 2013). Essa fase se caracteriza por respostas inflamatórias que afetam o miocárdio; partes do aparelho digestivo, notadamente o cólon intestinal e o esôfago; e o sistema nervoso (SANTOS *et al.*, 2016). Dentre as desordens fisiológicas mais proeminentes dessa fase estão a cardiomegalia, o megacólon, o megaesôfago e desordens funcionais do sistema nervoso autônomo, os quais influem na homeostase tanto da atividade cardíaca quanto da digestiva (DE ANDRADE, MICÁSSIO FERNANDES *et al.*, 2018). O perfil imunológico da pessoa infectada influi tanto na progressão da doença quanto nas manifestações clínicas em cada fase. Em outras palavras, a ocorrência, ou não, dos sintomas prevalentes na fase aguda, bem como a progressão, ou não, de parte dos infectados da fase indeterminada para a fase crônica decorrem, entre outros, da resposta imunológica intrínseca de cada indivíduo (JUNQUEIRA, CAROLINE *et al.*, 2010). Além do sistema imunológico, o tipo de linhagem de *T. cruzi* que infecta o hospedeiro também corrobora na patologia da doença de Chagas (MARTÍNEZ-DÍAZ *et al.*, 2001).

Apesar de objeto de estudo há cerca de cem anos, ainda são limitadas as opções farmacológicas para o tratamento da doença de Chagas. A discrepância de medicamentos disponíveis para Chagas, em comparação com outras doenças, como câncer, por exemplo, expõe o seu caráter de doença negligenciada atribuída pela OMS (MENEZES *et al.*, 2011). O Nifurtimox e Benzonidazol ainda constituem os principais fármacos utilizados no tratamento da doença de Chagas (KRATZ, 2019). Esses medicamentos são compostos orgânicos nitrogenados heterocíclicos (BOIANI *et al.*, 2010). O primeiro é derivado de um nitrofurano e o segundo de um nitroimidazol. Ambos produzem um radical aniônico de nitrogênio como parte de um processo de biorredução de grupos nitrogenados. A diferença entre os dois medicamentos reside no mecanismo de ação desses íons como espécies reativas de oxigênio no metabolismo de *T. cruzi*, as quais danificam macromoléculas diversas como DNA, RNA, lipídios e proteínas podendo levar o parasito à morte (BOIANI *et al.*, 2010). Porém, mecanismos de resistência a esses fármacos têm sido observados (CAMPOS *et al.*, 2017). Nesse sentido, outros compostos têm sido estudados como possíveis fármacos tripanocidas, notadamente os que têm potencial de inibir ou bloquear componentes enzimáticos de vias metabólicas como a do ergosterol e da tripanotiona, que estão ausentes em humanos (URBINA, 2009). Novos fármacos mais restritos às vias metabólicas do parasito podem levar a um tratamento medicamentoso que reduza a toxicidade em humanos (BELTRAN-HORTELANO; PEREZ-SILANES; GALIANO, 2017). Concomitante aos efeitos adversos, ambos os medicamentos são eficazes apenas na fase aguda da enfermidade, ao passo que, na fase crônica, a mais letal da doença, uma terapia eficaz ainda se faz necessária (ZUMA; DE SOUZA, 2018).



2. *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário pertencente ao domínio Eukarya, filo Euglenozoa, classe Kinetoplastida, ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae e gênero *Trypanosoma* (KAUFER *et al.*, 2017). Caracteriza-se por ser um organismo unicelular, flagelado, de nutrição heterotrófica e que se reproduz por divisão binária (SOLÍS-OVIEDO *et al.*, 2018). Trata-se de um micro-organismo que tem co-evoluído com seus reservatórios e hospedeiros há cerca de 150 milhões de anos (PENA; MACHADO; MACEDO, 2009). Por pertencer à classe Kinetoplastida, o *T. cruzi* apresenta uma única mitocôndria que se alonga por toda a extensão de sua célula e que alberga uma estrutura chamada cinetoplasto, o qual dá nome ao táxon (FILARDY *et al.*, 2018). Esta estrutura compõe-se de múltiplas cópias de DNA circular concatenados entre si: os máxi e o mini-círculos (CAVALCANTI; DE SOUZA, 2018). Outras características pertinentes a esse táxon incluem a presença de uma bolsa flagelar, de onde o flagelo emerge; glicoproteínas e glicolipídios ligados à membrana plasmática por âncoras de glicosilfosfadilinositol (GPI); transcrição policistrônica; edição de RNAs por *trans-splicing*; edição de RNAs mitocondriais; ausência de peroxissomos e presença de glicosomos; e vias metabólicas distintas (LANDFEAR; ZILBERSTEIN, 2019). A família Trypanosomatidae constitui um grupo diverso de protozoários patogênicos (LUKEŠ *et al.*, 2018). A maioria dos gêneros que a compõe se restringe como patógenos de invertebrados, apresentando, portanto, um ciclo biológico monoxênico, ou seja, um único hospedeiro (KAUFER *et al.*, 2017). Todavia, os gêneros *Phytomonas*, *Leishmania* e *Trypanosoma* diferem dos demais desse grupo em virtude do ciclo biológico de suas espécies incluir, também, ou plantas (*Phytomonas*) ou vertebrados (*Leishmania* e *Trypanosoma*). Logo, possuem um ciclo heteroxênico, ou seja, necessitam de mais de um hospedeiro para completarem seu ciclo biológico (KAUFER *et al.*, 2017). No que tange ao gênero *Trypanosoma*, o hospedeiro invertebrado ou intermediário é, em geral, um inseto hematófago; ao passo que o hospedeiro vertebrado ou definitivo pode incluir mamíferos, aves ou anfíbios a depender do tropismo do tripanosomatídeo por uma determinada espécie dentre as classes de vertebrados existentes (SIMPSON; STEVENS; LUKEŠ, 2006).

2.1. Ciclo Biológico

O ciclo de vida do *T. cruzi* tem início no repasto sanguíneo (TYLER; OLSON; ENGMAN, 2003). Formas tripomastigotas presentes na circulação do hospedeiro vertebrado são ingeridas em meio ao sangue pelo hospedeiro invertebrado. Uma vez no trato gastrointestinal (TGI) do barbeiro, a maior parte dos tripomastigotas ingeridos são lisados no estômago (CABRERA; MARCIPAR, 2019). O ambiente ácido e rico em aminoácidos do estômago, por sua vez, estimula a diferenciação das formas tripomastigotas sobreviventes em epimastigotas (CARDOSO, MARIANA S.; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016). À medida que a digestão prossegue no lúmen do TGI do triatomíneo, alcançando, assim, o intestino, as formas epimastigotas aderem à membrana perimicrovilar da parede intestinal (BERN, 2015). Na porção inicial do intestino, as formas epimastigotas aderidas se proliferam; ao passo que em sua porção média, a mudança gradual de pH (de ácido para alcalino), assim como a redução da disponibilidade de nutrientes, promovem a paralisação da proliferação das formas epimastigotas e estimula a diferenciação destas em tripomastigotas metacíclicos (GARCIA *et al.*, 2019). A este processo, dar-se o nome de metaciclogênese (SALASSA; ROMANO, 2019). A presença dos aminoácidos prolina, glutamina e aspartato na membrana perimicrovilar corrobora com a metaciclogênese, cuja eficiência pode variar dependendo da espécie de triatomíneo e independe da quantidade de epimastigotas disponíveis nas etapas de diferenciação e proliferação (MANCHOLA *et al.*, 2016). Já na porção final do intestino, o reto, a metaciclogênese cessa (DWORAK *et al.*, 2017). Uma vez liberados em meio às fezes e urina do barbeiro, as formas tripomastigotas metacíclicas, que são infectivas, podem acessar as células do hospedeiro definitivo tanto pela lesão cutânea provocada pela picada quanto pelo acesso às mucosas (TYLER; OLSON; ENGMAN, 2003). No interior do hospedeiro vertebrado, as formas tripomastigotas metacíclicas aderem e interagem com as células hospedeiras, modulando sua internalização por mecanismos de sinalização celular que podem levar, entre outros, à fagocitose (NARDY *et al.*, 2016). O *Trypanosoma cruzi* possui tropismo por todas as células do hospedeiro, tendo potencial de infectar tipos celulares diversos, das células do sistema fagocítico mononuclear às musculares e nervosas (BERN, 2015). A internalização do parasito é mediada pela formação do vacúolo parasitóforo, estrutura membranosa proveniente de

invaginações da membrana plasmática da célula hospedeira a partir da adesão e interação com a membrana plasmática do parasito (CARDOSO, MARIANA S.; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016). O processo de adesão, por sua vez, é mediado por enzimas, como a protease prolil-oligopeptidase B (BURLEIGH *et al.*, 1997). Essa protease, ao catalisar a hidrólise de componentes proteicos da matriz extracelular, como o colágeno e a fibronectina, otimiza o contato entre a célula hospedeira e o parasito (BIVONA *et al.*, 2018). À formação do vacúolo parasitóforo, segue-se à sua fusão com lisossomos, formando o fagolisossomo. O lúmen ácido do fagolisossomo, por sua vez, não danifica a membrana do parasito, mas induz a amastigogênese, ou seja: a passagem da forma tripomastigota metacíclica para a forma amastigota (STAHL *et al.*, 2014). Esse processo é mediado pelo sequestro de íons de cálcio (Ca^{2+}) da célula hospedeira a partir de glicoproteínas da membrana do *T. cruzi* como as transsialidases (DA FONSECA *et al.*, 2019). Mediante o rompimento do fagolisossomo, as formas amastigotas liberadas no citosol iniciam sua replicação por divisão binária e, a partir de uma determinada densidade, diferenciam-se para as formas tripomastigotas (TYLER; OLSON; ENGMAN, 2003). O rompimento mecânico da célula hospedeira infectada leva à liberação das formas tripomastigotas, que passam a circular pelo sangue, pela linfa e pelos fluidos intersticiais infectando as células dos demais tecidos do hospedeiro vertebrado (MACHADO-SILVA *et al.*, 2016). Assim, a partir de um novo repasto, o ciclo se completa e se inicia novamente (TYLER; OLSON; ENGMAN, 2003).

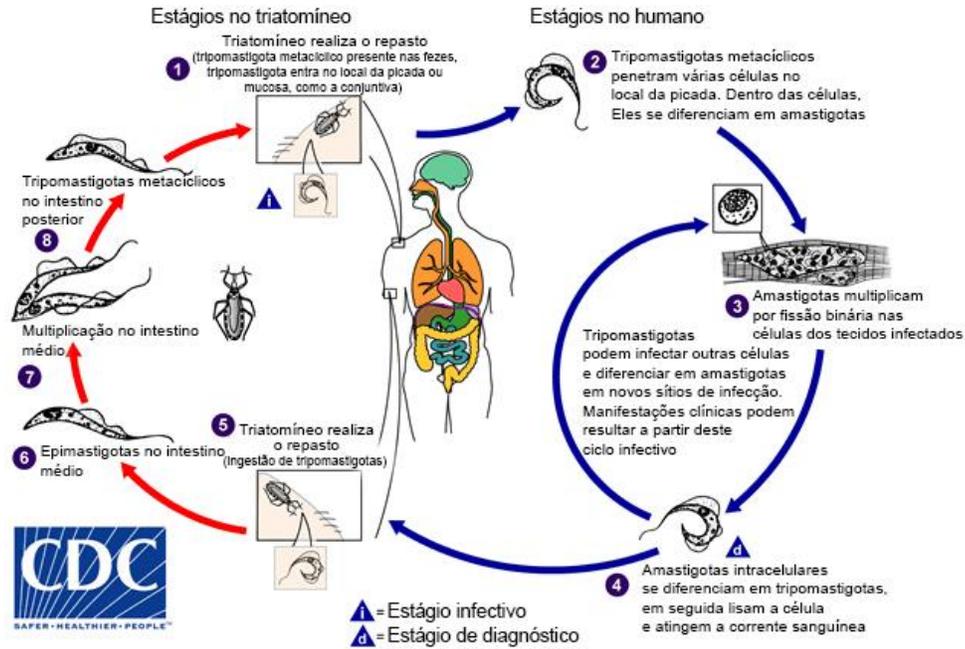


Figura 2. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*. Adaptado de CDC (*Center for Disease Control and Prevention*). Disponível em www.cdc.gov/parasites/. Acessado em julho de 2019.

2.2. Sistemática Filogenética

Trypanosoma cruzi surgiu enquanto espécie há cerca de 150 milhões de anos no território que atualmente constitui as Américas (PENA; MACHADO; MACEDO, 2009). Trata-se de um micro-organismo amplamente distribuído pelo continente, estendendo-se da porção sudoeste dos Estados Unidos à Patagônia argentina (RAMSEY *et al.*, 2012). Possui por reservatórios cerca de até 70 gêneros pertencentes à classe *mammalia*, tendo co-evoluído com as espécies albergadas nesses gêneros (JANSEN; XAVIER; ROQUE, 2018). Caracterizado por sua considerável plasticidade fenotípica e genotípica, apresenta elevada variabilidade genética (CAMPOS *et al.*, 2017).

A variabilidade genética entre as populações de *T. cruzi* distribuídas pelo continente americano tem implicações no fenótipo e no genótipo dessas populações (DWORAK *et al.*, 2017). As implicações englobam desde taxa de expansão clonal à virulência, passando pela susceptibilidade a quimioterápicos e a patogenicidade; esta refletida nos tipos de manifestações clínicas desenvolvidos por indivíduos infectados (DORN *et al.*, 2017). Essa diversidade intraespecífica permite a classificação dos diferentes isolados ou cepas existentes em linhagens que refletem uma história evolutiva comum (SCHOFIELD, 2000). As cepas pertencentes ao mesmo subgrupo, em geral, possuem caracteres partilhados entre si tais como endemia, virulência, patogenicidade, sintenia e ancestralidade (OLIVEIRA *et al.*, 2017). Concomitantemente, divergem entre si nesses mesmos caracteres, porém, ao mesmo tempo, preservando o caráter primaz de pertecerem à mesma espécie (ZINGALES *et al.*, 2012).

As primeiras tentativas de se estabelecer a história e a diversidade filogenética de *T. cruzi* deu-se ainda em 1978 com a identificação e análise de marcadores bioquímicos como as isoenzimas, as quais eram recorrentemente utilizadas como marcadores para fins taxonômicos em micro-organismos (MILES; CIBULSKIS, 1986). Em 1998, mediante análises de RAPD (do inglês *Randomly Amplified Polimorphic DNA*), RFLP (do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*), *DNA fingerprinting*, microsátélites e cariótipo molecular, emergiram os primeiros marcadores genéticos para *T. cruzi* (MACEDO *et al.*, 1992).



A partir de marcadores bioquímicos e genéticos, como isoenzimas e sequências conservadas da unidade 24S do rDNA e de genes de mini-éxon, sendo estes últimos recorrentes marcadores taxonômicos em tripanosomatídeos, duas linhagens principais para *T. cruzi* foram estabelecidas: *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (PENA; MACHADO; MACEDO, 2009). Ambas as linhagens teriam origem em um ancestral comum e divergiriam entre si por acúmulo de polimorfismos, oriundo de mutações (ZINGALES *et al.*, 1997). Mediante outras análises moleculares, que incluíram, por exemplo, diferenças polimórficas e de sintonia em genes específicos, propôs-se a divisão da linhagem *T. cruzi* II em outras sub-linhagens, originalmente designadas como IIa, IIb, IIc, IId e IIe (ZINGALES, 2017). Contudo, a presença de cepas cujos genomas são híbridos, ou seja, que apresentam origem em mais de um ancestral, levou a proposição de que eventos de hibridização, a partir de intercâmbios genéticos, ainda que raros em organismos de divisão binária e propagação clonal, poderiam ocorrer e seriam a razão da existência de sub-linhagens híbridas (ZINGALES *et al.*, 2012). Assim, através de novas análises com marcadores moleculares de evolução não-recente, postulou-se que, na verdade, haveriam três linhagens a partir de um ancestral comum: *T. cruzi* I, *T. cruzi* II e *T. cruzi* III (ZINGALES, 2017). Estas linhagens teriam divergido entre si, também, por acúmulo de polimorfismos a partir de mutações discretas, porém, eventos de trocas genéticas, como recombinação, entre membros dessas linhagens e, posteriormente, entre as sub-linhagens, teriam originado as híbridas (ZINGALES *et al.*, 2012). O primeiro modelo ficou conhecido como “modelo de dupla-hibridização”, ao passo que o segundo ficou conhecido como “modelo de três ancestrais” (PENA; MACHADO; MACEDO, 2009). Em ambos, ao menos dois eventos de hibridização seriam responsáveis pelo surgimento de sub-linhagens híbridas, porém divergindo quanto ao período de ocorrência desses eventos de hibridização e às linhagens e sub-linhagens participantes (ZINGALES, 2017). Por fim, após intenso debate e mediante evidências moleculares mais robustas, impulsionadas pelo sequenciamento do genoma completo de *Trypanosoma cruzi* em 2005, um consenso internacional, no ano de 2009, reconheceu a existência de seis linhagens que albergariam as diferentes populações do parasito já organizadas em cepas diversas (EL-SAYED *et al.*, 2005). A essas linhagens cunhou-se o termo “unidades discretas de tipagem” ou DTUs (do inglês, *Discret Typing Units*) (ZINGALES *et al.*, 2012). Nesse contexto, as DTUs, designadas por algarismos romanos de I a VI, compreendem cepas que estão mais geneticamente relacionadas entre si que com outras e que são

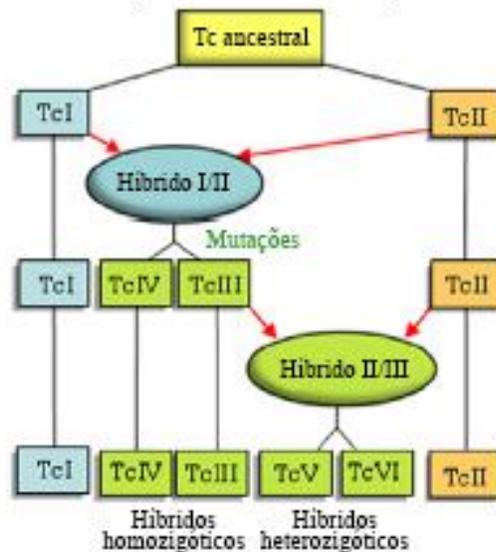
identificáveis e diferenciáveis a partir de uma série de marcadores moleculares comuns (MESSENGER; MILES; BERN, 2015). Tal subdivisão em *Trypanosoma cruzi* fez-se necessária uma vez que a variabilidade genética intrínseca a essa espécie, com a presença de heterogeneidade gênica em um organismo de propagação clonal, não se enquadra nas definições rígidas da sistemática biológica de classificação dos seres vivos em clados (VAZQUEZ, 2007). Um clado corresponde à uma unidade evolutiva estritamente isolada de outra unidade evolutiva (KAUFER *et al.*, 2017). Portanto, a presença de populações híbridas em *T. cruzi* inadequava a subdivisão de suas populações no cânone da sistemática, fazendo-se necessário, assim, sua classificação em um sistema que incluísse sua especificidade enquanto espécie de propagação clonal que apresenta tanto homogeneidade quanto heterogeneidade gênica entre suas populações (FRAGA *et al.*, 2016).

No sistema de DTUs, as sub-linhagens IIa, IIb, IIc, IId e IIe, do modelo de duas hibridizações, correspondem, respectivamente, às DTUs TcIV, TcII, TcIII, TcV e TcVI, com a DTU do tipo TcI correspondendo à linhagem *T. cruzi* I (ZINGALES *et al.*, 2012). Análises experimentais, mediante o uso dos marcadores típicos de cada DTU, têm demonstrado que características como distribuição geográfica, tropismo por um determinado reservatório, virulência e patogenicidade podem relacionar-se como atributos partilhados por cepas de uma determinada DTU, mas que diferem de uma outra DTU quando comparadas (LÓPEZ-CANCINO *et al.*, 2015). A severidade da infecção provocada por cepas de diferentes DTUs, contudo, não obteve, até o presente momento, nenhum tipo de correlação (GARCIA *et al.*, 2019). A título de exemplificação da relação entre o pertencimento de uma cepa à uma determinada DTU e seu fenótipo, tem-se as notórias diferenças entre TcI e TcII. Cepas de TcI, por exemplo, estão amplamente distribuídas primariamente entre primatas e roedores tanto da América do Norte quanto da América do Sul e fazem parte, ativamente, tanto do ciclo silvestre quanto do doméstico, possuindo tropismo pelo hospedeiro invertebrado do gênero *Rhodnius* (ZINGALES *et al.*, 2012). No tangente à patologia, a principal manifestação clínica desencadeada na doença de Chagas constitui a cardiomegalia que culmina na cardiopatia chagásica (TZIZIK; BORCHARDT, 2018). Já com relação às cepas abrigadas em TcII, encontram-se mais distribuídas em marsupiais e primatas endêmicos da América do Sul, com raras ocorrências na América do Norte. Raramente presente no ciclo silvestre, costumam ser presentes do ciclo

doméstico, possuindo tropismo por barbeiros do gênero *Triatoma* e, no que tange à patologia, desencadeando tanto a cardiomegalia quanto megaesôfago e megacólon (FREITAS *et al.*, 2018).

A diversidade genética de *T. cruzi* é resultando, portanto, de eventos genéticos diversos que vão desde recombinação à mutações e que, mediante pressões seletivas diversas, ao longo de milhares de anos, encontra-se refletida no genótipo e fenótipo de suas populações (DORN *et al.*, 2017). Essas populações, por sua vez, estão filogeneticamente subdivididas em grupos que melhor se adequam às suas características compartilhadas (ZINGALES, 2017). Tal subdivisão mostra-se salutar ao levantamento de dados epidemiológicos e à identificação de marcadores moleculares, sejam bioquímicos, sejam genéticos. Logo, o conhecimento acerca da sistemática filogenética em *T. cruzi* favorece o entendimento da dinâmica da biologia molecular das diferentes cepas do parasito, sua relação de tropismo com as várias espécies de hospedeiros invertebrados, bem como com a infecção que causam nos hospedeiros vertebrados, corroborando, por conseguinte, com uma profilaxia mais robusta para a doença Chagas.

A. Dupla Hibridização



B. Terceiro Ancestral

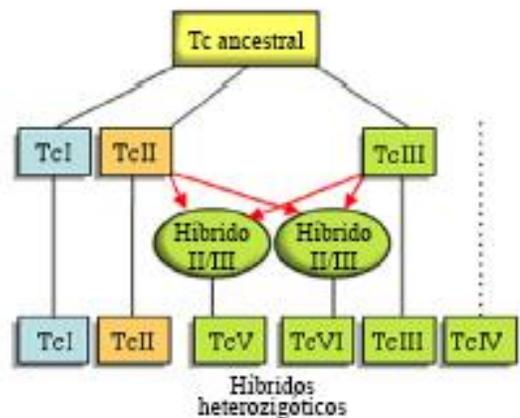


Figura 3. Comparação entre os modelos de dupla hibridização (A) e terceiro ancestral (B) para a origem evolutiva de *T. cruzi*. Os retângulos dizem respeito às diferentes DTUs. As elipses dizem respeito às trocas genéticas entre as diferentes DTUs, as quais as linhagens participantes estão indicadas por setas vermelhas. As cores das caixas correspondem aos três diferentes clados baseando-se na filogenética mitocondrial: azul (clado A); verde (clado B); laranja (clado C). Adaptado de Zingales (2011).

2.3. Genética

Geneticamente, *T. cruzi* é um micro-organismo diploide cujo genoma encontra-se distribuído entre pares de cromossomos homólogos, os quais podem variar em quantidade e tamanho dentre as cepas das diferentes DTUs (LIMA, M *et al.*, 2011). Na cepa de referência, CL Brener, que é híbrida, o DNA encontra-se distribuído em cerca de 41 cromossomos. Em geral, o parasito se replica por divisão binária, gerando descendentes com cópias idênticas ou muito similares às parentais (VAZQUEZ, 2007). Logo, *T. cruzi* apresenta propagação clonal, onde variabilidade genética é oriunda, principalmente, de mutações discretas e não deletérias no genoma do parasito (DANIELS; GULL; WICKSTEAD, 2010). Todavia, apesar da propagação clonal ser um mecanismo majoritário, estudos diversos apontam para a ocorrência de aneuploidia em *Trypanosoma cruzi* em certos momentos de seu ciclo biológico (LIMA, M *et al.*, 2011). Por exemplo, durante a fase intracelular no hospedeiro vertebrado, pode ocorrer a fusão dos núcleos de dois amastigotas, resultando em uma progênie poliploide. À formação deste cariótipo, eventos de recombinação alélica podem ocorrer e, posteriormente, eventos genéticos de perda cromossomal podem levar, ou à restauração da diploidia, ou à formação de aneuploidias, em diferentes níveis (VAZQUEZ, 2007). Apesar de *T. cruzi* possuir características genéticas partilhadas por outros eucariotos igualmente unicelulares e de reprodução assexuada, alguns eventos de intercâmbio genético, como recombinação, podem ocorrer ainda que sejam não-obrigatórios e raros (LIMA, M *et al.*, 2011). A diversidade genética de *T. cruzi* está expressa na variabilidade intraespecífica de seu genoma, o que explica, por exemplo, a existência de linhagens híbridas (ZINGALES, 2017). O surgimento dessas linhagens, não obstante, resulta de eventos genéticos como recombinação, perda cromossômica e aleatoriedade na segregação cromossomal (VAZQUEZ, 2007).



O DNA de *T. cruzi* encontra-se compartimentalizado no núcleo, ao passo que seu DNA mitocondrial (kDNA) está situado em uma estrutura chamada cinetoplasto, localizada no interior de sua única mitocôndria (TEIXEIRA; NASCIMENTO; STURM, 2006). O conteúdo entre DNA nuclear e kDNA varia entre as diferentes cepas de *T. cruzi*, implicando na organização genômica do parasito e, até mesmo, nos fenótipos pertinentes a cada cepa e das linhagens das quais são parte (JUNQUEIRA, ANGELA C.V.; DEGRAVE; BRANDÃO, 2005).

O sequenciamento completo do genoma de *Trypanosoma cruzi*, publicado em julho de 2005, elucidou o perfil genético desse euglenozoário (EL-SAYED *et al.*, 2005). A cepa escolhida para obtenção do genoma fora CL Brener, pertencente à DTU TcVI, que é híbrida. A escolha foi motivada por CL Brener ser bem caracterizada experimentalmente (ZINGALES, 2017). A análise do sequenciamento dos conjuntos haploides *Esmeraldo-like* (S) e *Non-Esmeraldo-like* (P), que compõem o genoma da cepa e que possuem origem em progenitores de linhagens diferentes, revelaram que *T. cruzi* possui um genoma diploide de aproximadamente 110.7 Mb. No total, identificou-se que o parasito possui 22.570 genes codificadores de proteínas, dos quais cerca de 12.570 constituem pares alélicos entre os cromossomos de origem distinta. Identificou-se, também, que o parasito possui cerca 594 genes codificadores de RNA (EL-SAYED *et al.*, 2005). Porém, se levados em conta os *contigs* não anotados, o número de genes codificadores para RNA podem chegar até 1.400. Por análise de bioinformática, estima-se que até 50,8 % dos genes de *T. cruzi* têm sua função predita a partir de similaridades de sequência ou de domínio com outras proteínas cuja função já se encontra catalogada na literatura científica (LIMA, M *et al.*, 2011). As análises também revelam que cerca de 50 % das sequências de seu genoma correspondem a repetições, notadamente de famílias gênicas codificadoras de proteínas de superfície, retrotransposons e regiões subteloméricas (ARAÚJO, PATRICIA R; TEIXEIRA, 2011).

Genes codificadores para enzimas da maquinaria de reparo estão presentes no genoma do parasito, demonstrando que a maioria das vias de reparo encontradas em outros eucariotos também estão em *T. cruzi* (GENOIS *et al.*, 2014). Adicionalmente, genes relacionados à biossíntese da maquinaria de reparo por recombinação homóloga se fazem presentes, com exceção de alguns como a RAD52, que é salutar à recombinação em outros eucariotos, tais como a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (PASSOS-SILVA *et al.*, 2010). A presença, no genoma de *T. cruzi*, de genes relacionados à maquinaria de recombinação homóloga é de suma importância, por exemplo, para fins de manipulação genética nesse parasito. Contrariamente, genes relacionados à maquinaria de reparo por junção de extremidades não-homólogas encontram-se ausentes (LIMA, M *et al.*, 2011). Acredita-se que no decorrer da evolução do parasito, assim como em *Plasmodium falciparum*, genes relacionados a essa maquinaria, ou foram alterados, ou perdidos (VAZQUEZ, 2007). Notavelmente, porém, *T. cruzi* conserva genes relacionados à maquinaria de reparo por micro-homologia, o qual é o mecanismo de reparo, juntamente com a recombinação homóloga, de maior incidência nesse tripanosomatídeo (SFEIR; SYMINGTON, 2015). No que tange à replicação do genoma, a maior parte dos genes codificadores para as enzimas que compõem a maquinaria em outros eucariotos estão presentes. Contudo, aquelas requeridas para o início da replicação variam significativamente com relação aos demais do Domínio (SINHA *et al.*, 2017).

A partir dos dados do sequenciamento do genoma completo de *T. cruzi*, juntamente com aqueles derivados de análises em gel de eletroforese de campo pulsado (do inglês *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* - PFGE), obteve-se que a cepa híbrida do parasito, CL Brener, possui 41 cromossomos homólogos, com cada membro individual do par provindo de linhagens distintas (LIMA, M *et al.*, 2011). Muitos genes nesses cromossomos estão presentes em duas ou mais cópias, as quais podem estar tanto dispersas quanto agrupadas, ou mesmo em diferentes cromossomos (LIMA, M *et al.*, 2011). Essas cópias, assim como os alelos de diversos genes, apresentam polimorfismos de base (VAZQUEZ, 2007). Pressões seletivas diversas, no decorrer de milhares de anos, podem ter levado a essa variação intragênica no curso do processo evolutivo (ZINGALES *et al.*, 2012). Não obstante, essas cópias e alelos, apesar de relativamente conservadas entre si em suas fases abertas de leitura, nem sempre apresentam sintonia, estando as variações mais presentes nas regiões intergênicas, em



sequências de elementos repetitivos e em regiões subteloméricas (HIGUERA; GUHL; RAMÍREZ, 2013). A diversidade genética em *T. cruzi*, portanto, não é somente intraespecífica, mas, também, intragênica e intergênica; especialmente nas cepas de linhagem híbrida como CL Brener (LIMA, M *et al.*, 2011).

O DNA mitocondrial (kDNA) corresponde a cerca de 20-30 % do genoma de tripanosomatídeos (MIYAHIRA; DVORAK, 1994). Ele é constituído por dois tipos de moléculas circulares concatenadas entre si, as quais diferem em tamanho e função: maxi e minicírculos (VAGO *et al.*, 1996). Essa estrutura encontra-se na mitocôndria dos parasitos como cinetoplasto (GARCIA *et al.*, 2019). Os maxicírculos correspondem, funcionalmente, ao DNA mitocondrial dos demais eucariotos (MASLOV; PODLIPAEV; LUKEŠ, 2001). Nesse sentido, seus genes codificam tanto para rRNA mitocondriais quanto para proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa, a qual ocorre em sua membrana interna, a crista mitocondrial (BOTERO *et al.*, 2018). Os minicírculos, por sua vez, existem em milhares de cópias e são compostos por quatro regiões conservadas intercaladas por outras quatro regiões variáveis. As regiões conservadas são ricas em nucleotídeos CA e atuam como origem de replicação. Já as regiões variáveis codificam para RNAs que atuam como guias na editoração de RNAs oriundos dos maxicírculos (MOREIRA *et al.*, 2016).



2.4. Expressão Gênica

Tal como nos demais eucariotos, tripanosomatídeos possuem, em geral, três RNAs polimerases (Pol) para a execução do processo de transcrição da informação codificada no DNA em RNAs: RNA polimerase I, que transcreve os genes codificadores para os RNAs ribossomais 18S, 5.8S e 28S; RNA polimerase II, que transcreve os genes codificadores de proteínas em RNA mensageiros (mRNA), bem como os genes de pequenos RNAs nucleares (do inglês *Small nuclear RNAs* – snRNAs); e RNA polimerase III, que transcreve os genes de RNA transportador (tRNA), os genes da unidade ribossomal 5S (5S rRNA) e alguns genes codificadores de snRNAs (DANIELS; GULL; WICKSTEAD, 2010).

Em *T. cruzi*, assim como nos demais tripanosomatídeos, os genes estão organizados em unidades policistrônicas de transcrição, as quais consistem em grupos ou *clusters* gênicos situados sobre a mesma fita de DNA (VAZQUEZ, 2007). Esses grupos gênicos, que podem variar entre dezenas a centenas de genes, são direcionais. Isso significa que essas unidades podem ser transcritas bidirecionalmente, ou seja: ou divergentemente, em direção aos telômeros; ou convergentemente, afastando-se dos telômeros (CLAYTON, 2019). Em geral, a maioria dos cromossomos possuem, no mínimo, até duas unidades policistrônicas de transcrição (DANIELS; GULL; WICKSTEAD, 2010). Os genes componentes dessas unidades não possuem interrupção por íntrons em meio às suas fases abertas de leitura (do inglês *Open Reading Frames* – ORFs) e se encontram inter espaçados por regiões intergênicas (VAZQUEZ, 2007). Até o presente momento, identificou-se que somente os genes codificadores para o RNA da sequência-líder (do inglês *spliced-leader RNA* – SLRNA) possui íntrons, os quais são excisados de seus éxons a partir um processo de *cis-splicing* (DANIELS; GULL; WICKSTEAD, 2010). Regiões intergênicas, as quais separam um gene de outro em um *cluster*, constituem regiões não-codificadoras, mas que são transcritas e exercem papel preponderante na regulação da expressão gênica em tripanosomatídeos (LIMA, M *et al.*, 2011). São nestas regiões que se encontram a sequência de nucleotídeos-sinal AG e o segmento de polipirimidinas requeridos para a ocorrência dos processos de *trans-splicing* e poliadenilação, sem os quais não há a maturação do transcrito primário de uma unidade policistrônica de transcrição em mRNA individuais (NOZAKI; CROSS, 1995). Os genes codificadores de



proteínas ou RNAs, os quais são parte dos *clusters*, não necessariamente possuem relação funcional entre si, sendo co-transcritos em uma única mensagem que posteriormente será processada (CLAYTON, 2019). Tal mecanismo de transcrição, por sua vez, difere daquele observado, por exemplo, em bactérias e em alguns nematódeos, onde a organização de genes em *operons* agrupam sequências que têm relação de funcionalidade entre si, sendo sua transcrição um mecanismo evolutivo que favorece esses organismos em termos de mobilização de energia no armazenamento, transcrição e tradução da informação genética (DANIELS; GULL; WICKSTEAD, 2010).

Em tripanosomatídeos, a transcrição, pela Pol II, de uma unidade de policistrônica de transcrição, resulta em um transcrito primário que contém todos os genes que compõem aquela unidade. A mensagem policistrônica produzida é, então, processada mediante dois processos que ocorrem simultaneamente no núcleo das células desses organismos: *trans-splicing* e poliadenilação (CLAYTON, 2019). No *trans-splicing* tem-se a adição de uma sequência-líder ou miniéxon de 39 nucleotídeos à extremidade 5' do transcrito primário. Este miniéxon, por sua vez, provém do SLRNA, que o doa ao transcrito primário a partir do reconhecimento, na região intergênica, tanto da sequência de nucleotídeo-sinal AG, na extremidade 3', quanto do segmento de polipirimidinas, na extremidade 5'. A sequência-sinal AG, nesse contexto, encontra-se a jusante do segmento de polipirimidinas. Tal localização influi no processo de poliadenilação que é concomitante ao *trans-splicing* (LIANG; HARITAN; ULIEL, 2003). Contrariamente ao *cis-splicing*, recorrente na transcrição dos demais eucariotos, o *trans-splicing* leva à formação de uma estrutura em formato de Y ao invés de um intermediário-lariato. A partir da formação da estrutura em formato Y, já se tem o surgimento de dois pré-mRNAs, resultantes do processamento da mensagem policistrônica, na qual duas fases abertas de leitura encontram-se justapostas uma em relação à outra (DANIELS; GULL; WICKSTEAD, 2010). Na poliadenilação, concomitantemente ao reconhecimento, pelo SLRNA, do sítio acceptor da sequência-líder, o complexo responsável pela adição da cauda poli-A é recrutado para esse mesmo sítio de modo que o complexo realiza uma varredura no sentido 3'-5' até a identificação de uma sequência sinal que leve à poliadenilação da extremidade 3' (LIANG; HARITAN; ULIEL, 2003). Mediante a ocorrência simultânea de ambos os processos, tem-se a formação de mRNAs individuais a partir do transcrito primário que os contêm (SFEIR; SYMINGTON, 2015).

Logo, no processo de maturação de um transcrito, em tripanosomatídeos, uma mensagem policistrônica proveniente de uma unidade policistrônica de transcrição é convertida em várias mensagens monocistrônicas, ou seja: em mRNAs individuais correspondentes a cada um das ORFs que compõe uma unidade específica (CLAYTON, 2019).

Em contraposição aos demais eucariotos, a transcrição pela Pol II não se dá a partir de um promotor, estando este ausente na maior parte dos *clusters* conhecidos; à exceção dos genes que codificam para o SLRNA, os quais possuem promotes, mas que são transcritos pela Pol III (CLAYTON, 2019). A princípio, o início da transcrição nos organismos desse táxon dar-se pela identificação de marcadores ou modificações químicas nas variantes de histona onde a parte do DNA a ser transcrito encontra-se associado (CAMPO, 2017). A terminação, por outro lado, é especificada tanto pela presença de marcadores epigenéticos quanto pela presença de genes que são transcritos por outras polimerases (CAMPO, 2017). Adicionalmente, um outro marcador usual tanto ao início quanto ao término da transcrição consiste nas várias cópias do gene de 140 bases que codifica para o SLRNA (CLAYTON, 2019). Logo, a regulação da expressão gênica, que na maioria dos eucariotos inicia-se ainda no sítio de ligação da Pol II ao promotor constitui, em tripanosomatídeos, um evento de natureza pós-transcricional (VAZQUEZ, 2007).

A maturação do transcrito primário de uma unidade policistrônica de transcrição produz mRNAs monocistrônicos diversos, porém com o mesmo nível de transcrição. Como os mRNAs resultantes não possuem uma relação funcional obrigatória entre si, a célula do parasito deve regular tanto seu uso quanto sua degradação (CLAYTON, 2019). Nesse sentido, a regulação de quais mRNAs serão traduzidos ou quais mRNAs serão mobilizados para outras atividades requeridas pela célula do parasito ocorrerá mediante uma série de mecanismos de regulação pós-transcricional (VAZQUEZ, 2007). A regulação pode se dar tanto à nível do núcleo quanto do citoplasma. A compartimentalização, por conseguinte, exerce um papel primordial na expressão gênica em *T. cruzi* e nos demais tripanosomatídeos (PASTRO *et al.*, 2017). Na regulação à nível nuclear, um dos principais mecanismos de regulação diz respeito ao tamanho da mensagem policistrônica (ALVES *et al.*, 2013). Como há competição, pela maquinaria celular, tanto pelo processamento da mensagem policistrônica quanto por sua degradação, se o



tempo requerido para a mensagem policistrônica ser processada for alto, dificilmente haverá o processamento de todas as ORFs presentes no policístron, o qual poderá ser degradado sem a completude de seu processamento (ARAÚJO, PATRICIA R; TEIXEIRA, 2011). No que tange à regulação à nível de citoplasma, dois principais mecanismos encontram-se envolvidos: ligação de proteínas ao mRNA e compartimentalização do mRNA em grânulos (CLAYTON, 2019). No primeiro, proteínas ligadoras de RNA (do inglês *RNA Binding Proteins* – RBPs), ligam-se a sítios de ligação tanto na extremidade 3' UTR do mRNA quanto em sua extremidade 5' UTR, sendo esta última mais rara (NOZAKI; CROSS, 1995). A ligação de proteínas a sítios específicos do mRNA monocistrônico pode desde retardar sua tradução, como impedir sua tradução ou mesmo sinalizar para maquinaria de degradação de mRNAs que aquele mRNA específico deve ser degradado (ARAÚJO, PATRICIA R; TEIXEIRA, 2011). Já no segundo, a célula do parasito pode tanto armazenar mRNAs específicos em grânulos no citoplasma da célula, para uso posterior, quanto sequestrá-los em grânulos voltados para degradação (ALVES *et al.*, 2013). Em ambas as situações, o acesso da maquinaria de tradução da célula aos mRNAs são drasticamente reduzidos. Ademais, ambos os processos atuam coordenadamente, haja vista a ligação de uma RBP a um sítio específico de um dado mRNA leva a diferentes destinos no metabolismo celular (ARAÚJO, PATRICIA R; TEIXEIRA, 2011). Outros mecanismos também estão envolvidos na regulação pós-transcricional de mRNAs em tripanosomatídeos, os quais podem interferir na meia-vida desses RNAs, na tradução ou mesmo em sua biossíntese, mediante mecanismos epigenéticos e evolutivos (LIMA, M *et al.*, 2011).

3. Proteases

Proteases, também denominadas proteínases ou peptidases, são enzimas que catalisam a quebra ou hidrólise de ligações peptídicas (NESSI; JEDRZEJAS; SETLOW, 1998). A clivagem dessas ligações pode ocorrer tanto entre aminoácidos de proteínas quanto entre aminoácidos de peptídeos, notadamente oligopeptídeos (LÓPEZ-OTÍN; BOND, 2008). A atuação das proteases no metabolismo dos seres vivos elicitam miríades de respostas biológicas, as quais são essenciais à manutenção da homeostase (BOND, 2019).

As proteases classificam-se de acordo com diferentes critérios, os quais englobam desde a natureza da catálise ao mecanismo catalítico que empregam (RAWLINGS; BARRETT, 2009). Atualmente, no que concerne à natureza da catálise, encontram-se divididas em dois grupos principais: exopeptidases e endopeptidases (RAKSAKULTHAI; HAARD, 2003).

As exopeptidases constituem um grupo de proteases que catalisa a hidrólise de aminoácidos que compõem a extremidade de cadeias peptídicas ou proteicas (NEMOTO; OHARA-NEMOTO, 2016). Se a catálise se dá em aminoácido pertencente à extremidade aminoterminal (N), as exopeptidases atuam como aminopeptidases, liberando desde resíduos de aminoácidos individuais a pequenos peptídeos de baixa massa molecular. Por outro lado, se a catálise se dá em aminoácidos pertencentes à extremidade carboxiterminal (C) da cadeia peptídica ou proteica, as exopeptidases passam, então, a atuarem como carboxipeptidases (BREDDAM, 1986). O mecanismo de catálise por elas empregado é similar às aminopeptidases, com liberação de aminoácidos individuais ou pequenos peptídeos de baixa massa molecular, as quais dependem da natureza da reação catalizada. As endopeptidases, por sua vez, caracterizam-se por catalisar a hidrólise de ligações peptídicas que sejam internas às cadeias peptídicas ou proteicas (TAYLOR, 1993). Contrariamente às exopeptidases, a reação catalisada por endopeptidases não resulta na formação de monômeros, ou seja, de resíduos de aminoácidos, como subproduto reacional (DEMIDYUK; CHUKHONTSEVA; KOSTROV, 2017).



As proteases catalisam as reações de hidrólise de ligações peptídicas por mecanismos similares, independente das diferenças preponderantes que as distinguem umas das outras. Anteriormente à catálise, os substratos, sejam peptídicos, sejam proteicos, devem, primeiramente, ligar-se ao sítio ativo das proteases que lhe são específicas (LATORRE *et al.*, 2016). A eficiência de ligação dos substratos aos seus respectivos sítios ativos é uma função tanto do ambiente químico criado pela ligação sítio ativo-substrato quanto da natureza química do peptídeo ou proteína que interage com o sítio ativo da enzima (BOND, 2019). Diversos fatores físico-químicos interferem na interação das ligações peptídicas dos substratos com seus respectivos sítios ativos nas proteases. Dentre eles, destacam-se o tamanho, a carga, a polaridade e a acessibilidade (BOND, 2019).

No que tange ao mecanismo catalítico que empregam, as proteases classificam-se em serino, treonino, aspartato, metalo e cisteíno proteases (BRIX; STÖCKER, 2013). Em serino-proteases, a tríade catalítica tem no resíduo de serina o principal nucleófilo para atacar o carbono da carbonila que participa da ligação peptídica (CERA, 2009). Por analogia, nos demais tipos de protease a tríade catalítica consistirá, ou em um resíduo de treonina, ou em um resíduo de aspartato, ou íon divalente, ou em um resíduo de cisteína como principal nucleófilo capaz de polarizar o carbono da carbonila na ligação peptídica e, assim, catalisar a reação de hidrólise. O mecanismo de ação da tríade catalítica, em todos os tipos de protease, para fins de catálise, baseiam-se em três etapas principais: ativação do nucleófilo, polarização da ligação peptídica e estabilização do intermediário tetraédrico (LÓPEZ-OTÍN; BOND, 2008). Assim, ao final do processo, tem-se a modificação dos substratos, que é o objetivo almejado na reação de catálise mediada por proteases (BOND, 2019).

Em meio a diversidade de proteases presentes nos organismos vivos, sua organização e classificação é preponderante. Uma importante ferramenta para esse fim é o sistema MEROPS (RAWLINGS; BARRETT, 2009) Criado por Rawlings e Barret, em 1993, congrega informações diversas sobre proteases e seus potenciais inibidores (BOND, 2019). Nesse sistema, as proteases são organizadas e classificadas baseando-se em uma estrutura hierárquica onde proteases que apresentam uma significativa similaridade na sequência de seus aminoácidos são agrupadas em famílias. Essas, por sua vez, caso apresentem homologia entre si, são agrupadas em clãs (BRIX; STÖCKER, 2013).

Tendo por base o sequenciamento do genoma de diversos organismos, estima-se que cerca de até 2 % dos genes codificadores de proteínas, em todas as espécies dos três Domínios, codifiquem para a biossíntese de proteases (ATKINSON; BABBITT; SAJID, 2009). Tal constatação reforça a importância evolutiva do papel das proteases na manutenção da homeostase de todos os seres vivos. As proteases estão envolvidas em diversos processos biológicos, os quais albergam desde modificações pós-traducionais a processos fisiológicos como síntese, degradação, localização celular, apoptose, respostas imunológicas, acometimento e progressão de doenças (BRIX; STÖCKER, 2013). Processos, esses, que influem sobre o fluxo da informação genética nas células; no ciclo celular; na morte celular; na ciclagem de proteínas e estruturas supramoleculares; no transporte de materiais; ativação de leucócitos e inflamação; e em processos infecciosos (ROJAS *et al.*, 2017).

Em *T. cruzi*, por exemplo, um amplo espectro de proteases influem na biologia do parasito. A enzima prolil-oligo peptidase, Tc80 (80 kDa), é uma serino-protease expressa em maior quantidade nas formas tripomastigota e amastigota (BIVONA *et al.*, 2018). Secretada, esta enzima participa da degradação de componentes da matrix celular como colágeno e fibronectina, participando, portanto, do processo de invasão das células do hospedeiro (BASTOS *et al.*, 2005). Não obstante, outra protease de importância em *T. cruzi*, especialmente no processo de invasão da célula hospedeira, é a cruzipaina (FERRÃO *et al.*, 2015). Esta cisteíno-protease está presente em todas as formas morfológicas do parasito (DUSCHAK; COUTO, 2009). Contudo, é mais abundante nas formas replicativas, em especial, na forma epimastigota. Não só possui importância infectiva como, também, participa ativamente do

processo de metaciclo gênese, modulando esse processo de diferenciação celular (LIMA, ANA PAULA C.A. *et al.*, 2001).

Nesse contexto, as proteases têm sido recorrentes objetos de estudo como potenciais alvos para o desenvolvimento de novos fármacos. Muitos medicamentos atualmente disponíveis ao tratamento de várias enfermidades baseiam-se na inibição da atividade proteolítica. Por exemplo, entricitabina e fumarato de tenofovir desopoxila, que fazem parte de um dos medicamentos que compõem os coquetéis antirretrovirais para o tratamento de pessoas soropositivas (LV; CHU; WANG, 2015). Portanto, o estudo das proteases, no sentido elucidação de seu papel biológico, pode corroborar significativamente na compreensão das doenças causadas por parasitas, como a doença de Chagas.

3.1. Cisteíno-proteases

Cisteíno proteases constituem enzimas cujo sítio ativo compõem-se dos resíduos de aminoácido cisteína, histidina e aspartato (Cys-His-Asp) na formação da tríade catalítica (VERMA; DIXIT; PANDEY, 2016). Nessa tríade, o resíduo de histidina atua como um doador de prótons que realça o caráter nucleofílico do resíduo de cisteína, ao passo que um resíduo de glutamina permite a estabilização do intermediário tetraédrico que se forma no percurso da catálise (OTTO; SCHIRMEISTER, 2002). A cisteína, altamente nucleófila, por sua vez, ataca o carbono da carbonila que forma a ligação peptídica, liberando um intermediário tetraédrico do tipo tioéster juntamente com fragmentos provenientes da ruptura da cadeia peptídica (SAJID; MCKERROW, 2002). A maior parte das cisteíno-proteases catalogadas constituem endopeptidases. Contudo, algumas também atuam como exopeptidases (LATORRE *et al.*, 2016).



Algumas cisteíno-proteases, quando sintetizadas, não se encontram cataliticamente ativas, sendo sintetizados como zimogênios. Em sua forma zimogênica, um pró-domínio bloqueia estericamente o acesso do substrato ao domínio maduro do sítio ativo da enzima, impedido, assim, a ação catalítica (COSTA; LIMA, 2015). Tal bloqueio evita a degradação proteica não requerida. O pró-domínio, além de atuar como inibitor endógeno da enzima, também auxilia em seu enovelamento e em sua compartimentalização nas células em que é produzida. O mesmo espêndio encontra-se presente, também, em proteases que possuem outros mecanismos catalíticos. A ativação da enzima, por outro lado, ocorre mediante modificações químicas sobre o sítio catalítico, removendo o pró-domínio e disponibilizando o domínio maduro do sítio para seus substratos específicos. Cada grupo de proteases, não obstante, possui seus próprios mecanismos de inibição e ativação. Em cisteíno-proteases, mecanismos diversos estão envolvidos na ativação das proteases (RAWLINGS; CB, 1996). A autoativação constitui um desses mecanismos e ocorre a partir da compartimentalização da enzima em um ambiente onde a redução do pH e da força iônica levam à estabilização do pró-domínio e sua consequente retirada do sítio ativo da enzima. Nesse mecanismo de ativação, não há o envolvimento de outras enzimas, mas, sim, de um processo físico-químico de modulação de pH e salinidade, que economiza energia metabólica. Outro mecanismo, a transativação, consiste na ativação da enzima por mediação de outras enzimas, gerando maior gasto de energia metabólica (OTTO; SCHIRMEISTER, 2002). A cisteíno-protease mais bem caracterizada em *T. cruzi*, cruzipaína, por exemplo, é sintetizada como um zimogênio sendo maturada durante sua passagem pelo aparelho de Golgi, em todos os estágios de desenvolvimento do parasito (LIMA, ANA PAULA C.A. *et al.*, 2001). Sua importância à biologia de *T. cruzi*, por exemplo, é evidenciada a partir do alto número de cópias gênicas que codificam para essa protease (DUSCHAK; COUTO, 2009).

Em geral, cisteíno-proteases estão presentes em todos os organismos vivos. Dentro do sistema MEROPS de classificação, as cisteíno-proteases estão organizadas em 14 clãs (RAWLINGS; BARRETT, 2009). Elas atuam em processos primordiais que envolvem tanto o catabolismo quanto o processamento de proteínas. São enzimas ativas, por exemplo, nas vias de modificação pós-traducional, as quais afetam abundância, a localização e a função das proteínas (ROJAS *et al.*, 2017). Por conseguinte, a compreensão do papel biológico das diferentes proteases distribuídas entre as famílias que compõem os clãs corroboram na elucidação da diversidade biológica. Em termos de micro-organismos causadores de doenças em animais e plantas, permite que entenda-se, por exemplo, qual sua participação nos processos infectivos provocados por agentes etiológicos diversos, bem como sua participação nas respostas imunológicas dos hospedeiros a essas mesmas infecções (SAJID; MCKERROW, 2002). Nesse contexto, pode-se vislumbrar o desenvolvimento de alternativas quimioterápicas para doenças que até o presente momento, ou não possuem cura, ou os medicamentos disponíveis são tóxicos e ineficazes. As cisteíno-proteases, assim, podem ter um papel crucial na profilaxia da doença de Chagas.

As cisteíno-proteases de parasitos podem estar envolvidas em processos fundamentais em organismos de nicho parasitário como mediadoras da relação parasito-hospedeiro; invasão celular; evasão do sistema imune do hospedeiro; processamento de glicoconjugados de superfície; imunogenicidade; virulência e patogenicidade (SAJID; MCKERROW, 2002). Dentre elas estão, por exemplo, a oligopeptidase B e as proteases do tipo catepsina, como a cruzipaína (DUSCHAK; COUTO, 2009). Ambas estão envolvidas no processo de invasão das formas infectivas na célula hospedeira e, no que tange a cruzipaína, também está envolvida nos processos de diferenciação celular do parasito, como na metaciclogênese e na amastigogênese (FERRÃO *et al.*, 2015). Dado esses papéis-chave na biologia desses organismos, as cisteíno-proteases têm despontado como potenciais alvos para drogas, as quais tenham toxicidade reduzida aos hospedeiros, porém, que tenham efetividade na eliminação dos agentes etiológicos causadores da infecção (BEKONO *et al.*, 2018).

3.2. Via da Ubiquitinação-Desubiquitinação e Otubáina

A ubiquitinação consiste em uma via de modificação pós-traducional em que proteínas ubiquitinas são covalentemente ligadas a resíduos de lisina de uma proteína-alvo a partir de uma ligação de natureza isopeptídica (SURESH *et al.*, 2016). Tal processo de modificação ocorre mediante a participação de diferentes enzimas em uma série de reações em cadeia. Essas enzimas desempenham diferentes papéis ao longo da cadeia reacional e são altamente conservadas em eucariotos, sendo agrupadas em três categorias: ativadoras de ubiquitina (E1), conjugadoras de ubiquitina (E2) e ubiquitina ligases (E3). Primeiramente, as enzimas ativadoras (E1) ligam-se à ubiquitina ativando-a e, em seguida, transfere-na para as enzimas conjugadoras (E2), formando, assim, um conjugado ubiquitina-E2. Posteriormente, ubiquitina ligases (E3) se ligam ao conjugado e transferem a ubiquitina para seu respectivo substrato (WIENER *et al.*, 2012). A cadeia reacional pode ocorrer uma única vez para um determinado substrato, ocasionando uma monoubiquitinação. Por outro lado, a cadeia reacional também pode ocorrer repetidamente, ocasionando uma poliubiquitinação (VERECKE; BEYAERT; LOO, 2009). A ubiquitina é uma proteína cuja cadeia peptídica possui 76 aminoácidos, estando altamente conservada entre as espécies de Eukarya (FOOT; HENSHALL; KUMAR, 2017). Dependendo do resíduo de lisina a que se liga em seu respectivo substrato, diferentes respostas biológicas ocorrem (ROJAS *et al.*, 2017). Por exemplo, a poliubiquitinação do resíduo K48 pode sinalizar à célula que aquele substrato marcado seja degradado no proteassoma 26S (HUTCHINS *et al.*, 2013). Em contraposição, a poliubiquitinação de um resíduo K63 pode resultar na mobilização do substrato para via endossomo-lisossomo ou modular processos não-degradativos como reparação de DNA, transcrição gênica e resposta imune inata (SURESH *et al.*, 2016). No total, a ubiquitinação pode ocorrer em qualquer uma dos sete resíduos de lisinas disponíveis – K6, K11, K27, K29, K33, K48 e K63 – elicitando diferentes respostas biológicas. Todavia, a poliubiquitinação do resíduo K48 constitui a modificação mais recorrente em eucariotos (KOMANDER; RAPE, 2012).

A via da ubiquitinação, assim como muitas outras vias metabólicas nas células, é reversível (SCHRADER; HARSTAD; MATOUSCHEK, 2009). Essa reversão é mediada por enzimas que desfazem tanto as mono quanto as poliubiquitinações: as desubiquitinases, as quais participam da via metabólica da desubiquitinação (HE *et al.*, 2016).

As desubiquitinases (do inglês *Deubiquitinating enzymes* – DUBs) constituem um grupo heterogêneo de proteases, a maioria cisteíno-proteases, que cliva a ligação isopeptídica entre a ubiquitina e o seu substrato proteico de maneira precisa (SCHOLZ *et al.*, 2016). Elas encontram-se divididas em cinco famílias, das quais quatro são cisteíno-proteases: ubiquitina carboxiterminal hidrolases (UCHs), proteases ubiquitina específicas (USPs), proteases relacionadas ao tumor ovariano (OTUs) e proteases da doença Machado-Joseph (MJDs). A quinta família, JAP1/MPN/MOV34 (JAMMs), corresponde à uma metaloprotease (KOMANDER; RAPE, 2012).

O balanço entre ubiquitinação e desubiquitinação, ambas reações reversíveis, regula uma miríade de processos biológicos (KOMANDER; RAPE, 2012). A partir de alterações na estabilidade de proteínas, em sua localização nos compartimentos celulares, em sua função biológica e em sua capacidade de realizar interações, podem regular eventos como ciclagem de proteínas e diferenciação celular (MCCANN *et al.*, 2016). Em suma, permite à célula direcionar seu fluxo metabólico (ZHANG, LING; GONG, 2016).

Em *T. cruzi*, estudos prévios mostraram que há um aumento considerável no nível de proteínas ubiquitinadas durante a amastigogênese (CARDOSO, JOSIANE *et al.*, 2011). Isso sugeriu que a via da ubiquitina estivesse envolvida na degradação de proteínas no parasito, especialmente em processos de diferenciação celular. Concomitantemente, o genoma de *T. cruzi* revelou que o parasito possui mais de cem cópias codificadoras para as vias de ubiquitinação e desubiquitinação, dentre as quais, sequências putativas para otubaína (GUPTA *et al.*, 2018).

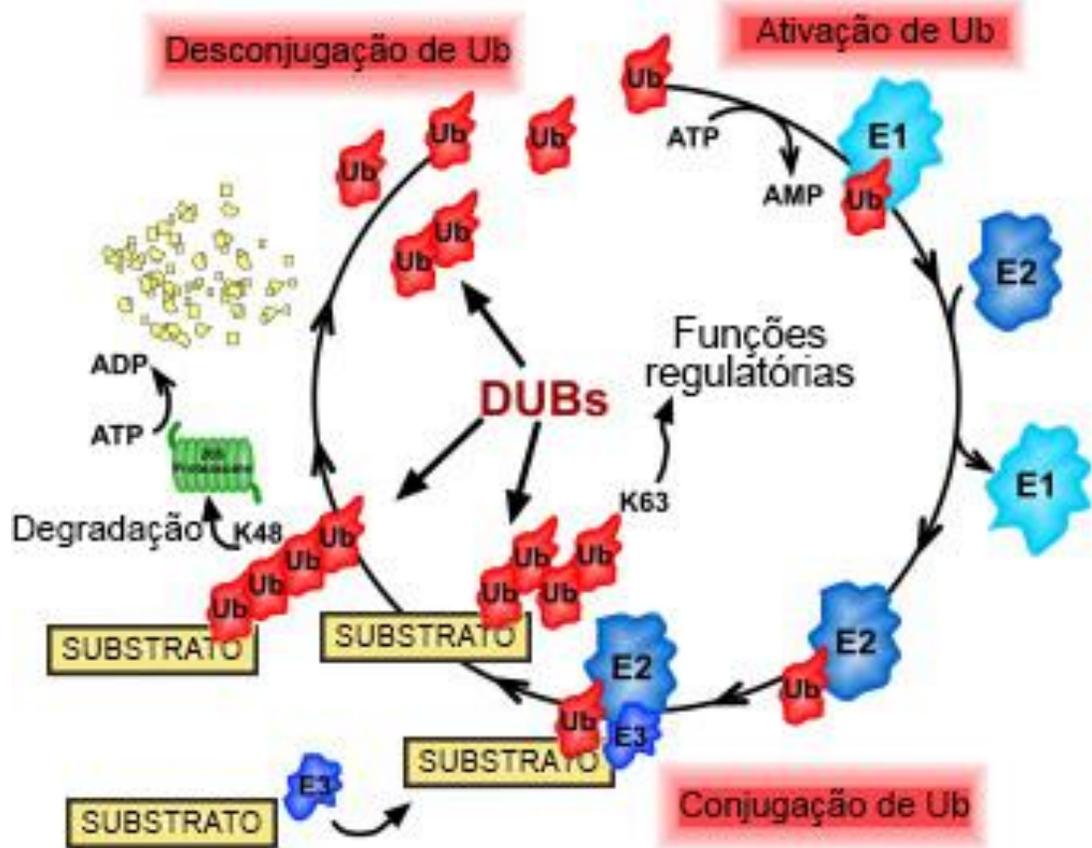


Figura 4. Mecanismo de funcionamento das vias ubiquitinação-desubiquitinação. Adaptado de Holden, D., Rytönen A. Disponível em: <https://www.cell.com/cell-host-microbe/>. Acessado em julho de 2019.



A otubaína é uma cisteíno-protease que catalisa a clivagem de ligações isopeptídicas entre moléculas de ubiquitina e seus substratos proteicos (LIU *et al.*, 2019). Portanto, é parte da via ubiquitinação-desubiquitinação (SUN; CHALLAGUNDLA, 2011). Pertencente à família das desubiquitinases do tipo OTU (do inglês *Ovarian Tumor-related*), caracteriza-se por uma protease que possui o domínio OTU (IGLESIAS-GATO *et al.*, 2015). Esse domínio foi primeiramente descrito em *Drosophila melanogaster* e constitui uma das maiores famílias de desubiquitinases (BAIETTI *et al.*, 2016). O surgimento de proteases contendo o domínio OTU, na história evolutiva de eucariotos, pode ter acontecido a partir de sua aquisição em procariotos. Tal constatação corrobora com a hipótese de que proteases que contêm este domínio estejam envolvidas nas interações parasito-hospedeiro (MAKAROVA; ARAVIND; KOONIN, 2000).

As proteases membro da família OTU já foram identificadas em diversos organismos dentre eucariotos e procariotos (SUN; CHALLAGUNDLA, 2011). As otubaínas 1 e 2 (OTU1 e OTU2), caracterizadas em *Homo sapiens*, respectivamente, participam da regulação de respostas imunológicas, como a anergia de linfócitos T, e na modulação de processos tumorais (ALTUN *et al.*, 2015). Em 2017, nosso grupo de pesquisa avaliou a atividade de uma otubaína putativa em *Leishmania infantum*. Nesse estudo, a otubaína recombinante de *L. infantum* (rOtuLi) demonstrou especificidade enzimática sobre K48 de maneira mais acentuada que em K63, elicitando uma resposta pró-inflamatória em macrófagos de modelo murino. Esse trabalho foi o primeiro acerca da caracterização de uma otubaína putativa tanto em tripanossomatídeos quanto em *Leishmania* (AZEVEDO *et al.*, 2017). Recentemente, otubaínas, também putativas, foram descritas para fungos e outros protozoários como *Cryptosporidium parvum* (JU *et al.*, 2014) e *Plasmodium falciparum* (DATTA *et al.*, 2017).



4. CRISPR/Cas9

CRISPR (do inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) associado ao *locus* dos genes Cas9 constitui um mecanismo de defesa procariótico que atua semelhantemente a um sistema imune adaptativo em algumas espécies de *Bacteria* e *Archaea* (JINEK *et al.*, 2012). Este sistema de defesa adaptativa tem por alvo ácidos nucleicos de origem exógena, como sequências virais e plasmidiais invasoras. O sistema, em procariotos, consiste em uma família de repetições de sequências de DNA que se encontra presente em até 84 % das espécies de arqueobactérias catalogadas e em até 45 % de bactérias (SAPRANAUSKAS *et al.*, 2011). Essas sequências foram, primeiramente, observadas em *Escherichia coli*, em 1987 (YOUNG *et al.*, 2012). Posteriormente, o mesmo *locus* foi identificado em outras espécies de *Archaea* e *Bacteria* (ZHANG, MINGZI M *et al.*, 2017). O *locus* CRISPR consiste em um arranjo formado por repetições curtas e palindrômicas que se encontram inter espaçadas por sequências variadas, as quais são denominadas espaçadores (JINEK *et al.*, 2013). Os espaçadores, no genoma de procariotos, consiste em sequências exógenas de DNA oriundas de vírus e plasmídeos (JINEK *et al.*, 2013). À essa característica dos espaçadores, identificada em 2005, que se atribui o caráter de sistema imune adaptativo nesses organismos (JINEK *et al.*, 2012). Não obstante, o *locus* CRISPR, nesses organismos, geralmente se encontra adjacente a outro *locus*, o qual é denominado *locus* de genes Cas associado a CRISPR (BENEKE *et al.*, 2017). Esse *locus*, por sua vez, codifica para famílias de proteínas que carregam domínios de ligação a nucleotídeos, o que inclui, também, nucleases. A combinação do *locus* CRISPR com as proteínas Cas, que possuem os referidos domínios, constitui o cerne do que se atribui ser o sistema imune adaptativo de procariotos contra sequências exógenas: CRISPR/Cas9 (HABIB *et al.*, 2013).

O mecanismo de ação coordenada entre os dois *locus* adjacentes se dá em três etapas bem-definidas: adaptação, expressão e interferência (JINEK *et al.*, 2013). Na adaptação, novas sequências exógenas são inseridas como espaçadores no *locus* CRISPR. A inserção, por sua vez, modula a expressão dos genes *cas*, levando à transcrição do arranjo CRISPR em um RNA não-processado, o pre-crRNA. Posteriormente, as proteínas Cas processarão esse RNA, levando à formação do crRNA. Esta etapa constitui a expressão. Por fim, na etapa de interferência, a sequência exógena é reconhecida pelo complexo formado por crRNA e proteínas Cas, levando à eliminação da sequência invasora. Portanto, trata-se de mecanismo que permite aos procarionotes eliminarem sequências exógenas ao mesmo tempo em que produz memória molecular contra elas (MARTIN JINEK *et al.*, 2012).

No total, já foram identificados ao menos três sistemas distintos de CRISPR em procarionotes (WONG; LIU; WANG, 2015). Eles variam entre si quanto ao mecanismo que empregam para a eliminação das sequências exógenas. O sistema de tipo II, chamado CRISPR/Cas9, utiliza apenas uma única proteína Cas, a endonuclease Cas9, para fins de eliminação de sequências exógenas (YOUNG *et al.*, 2012). Trata-se de um sistema oriundo de *Streptococcus pyogenes* e que é altamente adaptável como instrumento de edição gênica em outros organismos (LE RHUN *et al.*, 2019). O mecanismo de ação de CRISPR/Cas9, em *S. pyogenes*, consiste na presença da endonuclease Cas9, das sequências de RNA crRNA e tracrRNA, assim como da sequência alvo e da tríade bases NGG, conhecida pelo acrônimo PAM (do inglês “**P**roto**e**space**r** **A**ssociated **M**otif”) (GLEDITZSCH *et al.*, 2019). Nesse sistema, a endonuclease Cas9 complexa-se com crRNA e com o trans-crisprRNA (tracrRNA), o qual é parcialmente complementar ao crRNA (JIANG; DOUDNA, 2017). Esse complexo guia a Cas9 até a sequência-alvo. Não obstante, esse é o sistema mais comumente empregado para fins de edição gênica e o que mais tem sido objeto de adaptações para esse mesmo fim (JIANG; DOUDNA, 2017).

Quando os genes do *locus* CRISPR são ativados por um processo invasivo, inicia-se a transcrição de um RNA primário oriundo desse mesmo *locus*, o qual possui as sequências curtas e palindrômicas interespaçadas pelos espaçadores (YOUNG *et al.*, 2012). Esses últimos, por sua vez, podem ter origem em diferentes invasores. Concomitante à transcrição do RNA primário, tem-se, também, a transcrição de um RNA denominado trans ativador do crRNA (tracrRNA) (SAPRANAUSKAS *et al.*, 2011). Esta sequência parecia-se, por complementariedade de Watson-Crick, às sequências de crRNA presentes no RNA primário. A ocorrência do pareamento leva à maturação de crRNA que, então, passa a constituir um complexo com tracrRNA. Este complexo efetor ativado conjuga-se com a endonuclease Cas9. A partir daí, tem-se, pelo complexo Cas9-tracrRNA-crRNA, a varredura da sequência nucleotídica exôgena e sua eliminação (SAPRANAUSKAS *et al.*, 2011). O complexo efetor ativado formado por tracrRNA e crRNA atua como uma sequência de RNA que guia a Cas9 ao seu alvo, de modo que esta, após encontrá-lo, possa exercer seu efeito catalítico promovendo a quebra da dupla fita de DNA.

A adaptação do sistema de tipo II transformou CRISPR/Cas9 em uma poderosa ferramenta de edição gênica aplicável a diversos seres vivos, inclusive tripanosomatídeos. Enquanto ferramenta de edição, CRISPR/Cas9, algumas modificações se fizeram necessárias de modo a tornar o sistema aplicável à edição gênica. Por exemplo, o duplex de RNA formado por crRNA e tracrRNA, que no sistema tipo II de procaríotos conjuga-se parcialmente, na ferramenta CRISPR/Cas9 o duplex constitui uma quimera de RNA chamada sgRNA (do inglês *single-guide RNA*). O sgRNA, por sua vez, é formado por uma sequência de 20 bp que marca a sequência alvo a ser editada, chamada *protospacer*. O *protospacer* deve estar à montante do PAM. Assim, quando do complexo Cas9-sgRNA, há reconhecimento do PAM e complementariedade de bases entre o sgRNA e o *protospacer*, induzindo a atividade catalítica da Cas9 (BRAZELTON *et al.*, 2015).

A endonuclease Cas9 é constituída por dois domínios de nucleases distintos: RuvC-like e HNH (NISHIMASU *et al.*, 2014). O domínio RuvC-like localiza-se na extremidade N-terminal da proteína, ao passo que o domínio HNH localiza-se na região interna da proteína. Ambos os domínios atuam como nucleases, catalisando a ruptura de ambas as fitas de DNA

(JINEK *et al.*, 2012). Contudo, cada um dos domínios de nuclease promovem a catálise da quebra de fitas distintas. HNH cliva a fita complementar, já que RuvC-like cliva a não-complementar (ZUO; LIU, 2017) A atividade catalítica de Cas9 sobre a dupla fita está atrelada à presença da sequência de três bases NGG, também conhecida por PAM, onde N pode ser qualquer base entre as ocorrentes no DNA. Ao identificar, na varredura, a região do PAM imediatamente à sequência da extremidade 3' de crRNA, Cas9 sofre uma modificação conformacional mediada por resíduos de arginina que leva à ativação de sua atividade catalítica (CHEN; CHOI; BAILEY, 2014).

CRISPR/Cas9, enquanto ferramenta biotecnológica de edição, propicia, por meio de sua maquinaria, o dano à sequência alvo mediante quebra da dupla fita de DNA pela Cas9. O dano causado à molécula de DNA, por sua vez, elicitava uma resposta endógena celular no sentido de reparar o dano causado. A recrutamento da maquinaria celular ao reparo dependerá tanto do tipo de dano causado quanto ao tipo celular onde esse ocorreria (CUBBON; IVANCIC-BACE; BOLT, 2018). Em geral, o reparo pode ser realizado mediante dois mecanismos bem descritos em eucariotos: reparo por junção de extremidades não-homólogas (do inglês *Non-Homologous End Joining* – NHEJ) ou por recombinação homóloga (do inglês *Homologous Direct Repair* – HDR). Em NHEJ, os danos causados à dupla fita são reparados a partir de um mecanismo randômico de inserção e deleção de bases (SU *et al.*, 2016). Esse mecanismo acaba por levar a ruptura da fase aberta de leitura, caso a sequência seja codificadora. Logo, há perda de funcionalidade do gene (GUO *et al.*, 2018). No reparo por recombinação homóloga, por outro lado, a sequência a ser reparada é alinhada a um alelo ou cópia presente, ou no cromossomo homólogo ou na cromátide-irmã (durante a divisão celular), ou em qualquer outra localidade do genoma, respectivamente. Assim, o reparo fideliza a sequência rompida a partir de um molde endógeno. Logo, tem-se a preservação da funcionalidade do gene (LI, XUAN; HEYER, 2008).

Em termos de edição gênica e de estudo de genômica funcional, ambos os reparos podem ser úteis a depender da estratégia empregada. No caso do reparo por homologia, a principal vantagem de sua aplicabilidade em genômica funcional consiste na possibilidade de se doar à célula um cassete de DNA com braços homólogos à sequência

que se deseja modificar flanqueando ambas as extremidades do cassete (GEBOW; MISELIS; LIBER, 2000). Assim, durante o reparo gênico endógeno, o cassete pode ser utilizado pela maquinaria de reparo celular como molde. Esta estratégia é comumente empregada em estudos de genômica funcional para fins de deleção por nocaute ou por inserção (BISHOP, 2000).

Comparativamente, CRISPR/Cas9 apresenta vantagens em relação aos demais meios clássicos de deleção gênica em aspectos como: a endonuclease Cas9 pode ser expressa no organismo que se deseja modificar, ou de maneira episomal, por intermédio de plasmídeos, ou constitutivamente, integrando a sequência codificadora da endonuclease ao genoma do organismo; o emprego de um sgRNA, que tem natureza específica, permite o direcionamento da edição; a utilização de um sgRNA, adicionalmente, facilita a obtenção de mutantes duplos para um dado genótipo em uma única etapa de transfecção; e, por fim, mais a ferramenta permite o emprego de mais de um sgRNA para uma mesma sequência ou para sequências diferentes, permitindo a avaliação dos efeitos do genótipo em múltiplos fenótipos de uma só vez (DUO PENG, SAMARCHITH P. KURUP, PHIL Y. YAO, TODD A. MINNING, 2015). Todavia, alguma desvantagens também podem ocorrer: a endonuclease Cas9 pode ser tóxica a alguns organismos, como já observado para *T. cruzi* e *Leishmania spp*, o que pode inviabilizar sua expressão contínua nos organismos de interesse (DATE *et al.*, 2016). Outra desvantagem notória, diz respeito aos *off-targets*. Mesmo mediante o emprego de sgRNA específico à sequência que se almeja editar, a endonuclease Cas9 pode ocasionar danos em pontos não pretendidos do genoma, inviabilizando o experimento (LANDER *et al.*, 2016).

Desde sua concepção, em 2014, CRISPR/Cas9 vem sendo amplamente empregado em diversos trabalhos de edição genética. Em tripansomatídeos, por exemplo, já fora utilizado para avaliar a função de genes em *Leishmania spp*, em *Trypanosoma brucei* e em *Trypanosoma cruzi* (ZHANG, MINGZI M *et al.*, 2017). Dada suas vantagens enquanto ferramenta biotecnológica, sua aplicação em estudos de genômica funcional de tripansomatídeos visa, entre outros, acelerar o escopo de entedimento dos papéis dos diferentes genes desses organismos em sua própria biologia, haja vista, quando comparado

com outros organismos, pouco se conhece ainda (PASSOS-SILVA *et al.*, 2010). Se levado em conta, ainda, a enorme refratariedade que eles possuem à manipulação genética, a aplicação de CRISPR/Cas9 à biologia molecular de tripanosomatídeos pode resultar em avanços consideráveis no entendimento de sua biologia e, por conseguinte, no desenvolvimento de novas estratégias para combater as doenças que eles causam tanto em humanos quanto nos demais animais (ZHANG, MINGZI M *et al.*, 2017).

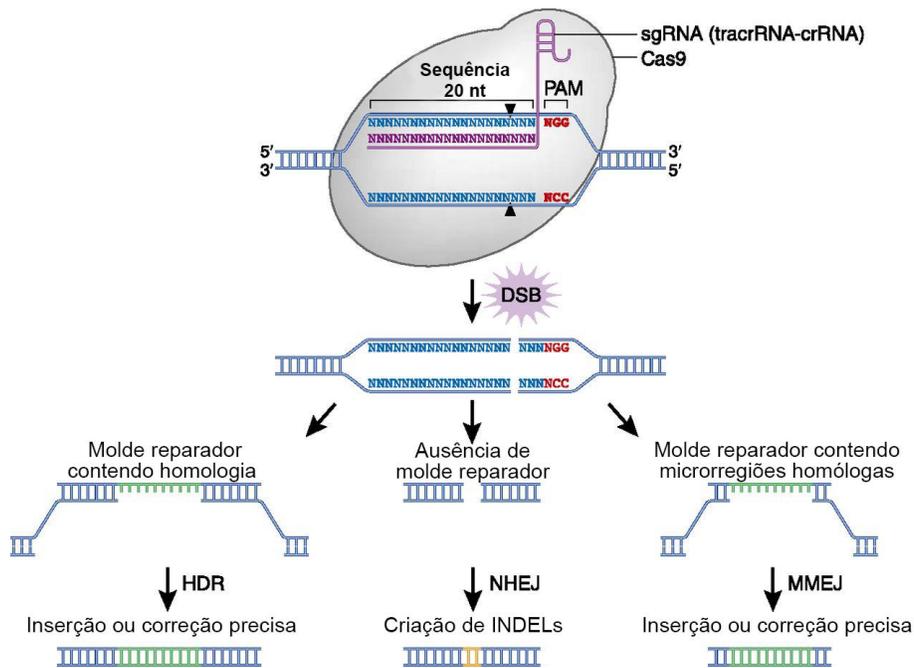


Figura 5. Esquemática do funcionamento do sistema CRISPR/Cas9 de tipo II em eucariotos. Adaptado de Miyagi, A., Lu, A., Humphreis, B. Disponível em: <https://jasn.asnjournals.org/content/>. Acessado em julho de 2019.



JUSTIFICATIVA



De acordo com a OMS, as doenças tropicais negligenciadas constituem um conjunto de infecções causadas por vírus, bactérias, fungos, protozoários e helmintos que afetam principalmente as populações mais vulneráveis socioeconomicamente. Tratam-se de doenças cujas as alternativas terapêuticas disponíveis para tratar os infectados são escassas, haja vista o desinteresse por parte da indústria farmacêutica em desenvolvê-los.

A doença de Chagas encontra-se elencada entre as doenças negligenciadas. Apesar dos mais de cem anos de sua identificação e descrição, muito pouco foi desenvolvido em termos de tratamentos quimioterápicos. Os medicamentos disponíveis, além de pouco eficazes para a fase crônica da doença, apresentam elevada toxicidade, o que inviabiliza o tratamento.

Nesse sentido, a aplicação da genômica funcional em *T. cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, faz-se salutar. A publicação do genoma completo do parasito, em 2005, tendo por referência a cepa híbrida CL Brener, bem como o desenvolvimento de novas ferramentas moleculares para fins de edição gênica, como CRISPR/Cas9, podem contribuir para a elucidação de processos biológicos como virulência, patogenicidade e evolução. Dado o papel das proteases na homeostase de todos os seres vivos, essas têm sido objeto de estudo em tripanossomatídeos, tendo em vista que pouco se conhece, ainda, acerca de seus papéis biológicos nesses organismos. O advento da ferramenta de edição genética CRISPR/Cas9 e sua consequente aplicação em estudos de genética e biologia molecular constitui um importante reforço ao estudo das proteases tanto a nível de genômica quanto à nível de proteômica.

O entendimento, portanto, do papel biológico das proteases em *T. cruzi* pode validá-las como possíveis alvos farmacêuticos e, talvez, em um futuro não muito distante, avançar na profilaxia e na terapêutica de uma doença que carece de respostas eficazes em combatê-la.



OBJETIVOS



Este trabalho teve por objetivo estudar uma cisteíno-protease putativa, do tipo otubaína, de *T. cruzi*, a qual é codificada pelo gene *otutc*. Para tanto, utilizou-se a expressão heteróloga e a deleção de ao menos um dos alelos do gene, a partir da aplicação da ferramenta de edição gênica CRISPR/Cas9, como ponto de partida para um estudo mais abrangente de genômica funcional acerca desse gene na biologia desse parasito.

Para fins de alcançar este objetivo, concebeu-se o seguinte delineamento experimental:

1. Análise genômica comparativa dos alelos codificadores de *otutc*;
2. Clonagem, expressão e purificação de *otutc* para obtenção da proteína recombinante rOtuTc;
3. Teste de atividade enzimática de rOtuTc sob o substrato tetra-ubiquitina humana (K48);
4. Obtenção de anticorpos de origem policlonal para rOtuTc;
5. Desenho e obtenção, por transcrição *in vitro*, do sgRNA para deleção de *otutc* por intermédio de CRISPR/Cas9;
6. Construção e obtenção de cassetes contendo os genes de resistência à higromicina e blasticidina para fins de deleção física de *otutc*;
7. Sequenciamento do gene *otutc* clonado;
8. Confirmação, por PCR, da deleção de *otutc*.



METODOLOGIA



Análise *in silico* de *otutc*

Os alelos de *otutc*, provenientes da cepa CL Brener e depositados na plataforma TriTrypDB, <https://tritrypdb.org/tritrypdb/>, foram alinhados por intermédio do programa MUSCLE (ClustalW) <https://www.ebi.ac.uk/Tools/mse/muscle/>.

Análise *in silico* de *OtuTc*

A sequência de aminoácidos codificada pelo alelo *Esmeraldo-like* foi submetida a diferentes análises *in silico*. Para tanto, utilizou-se os seguintes *softwares*: ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) que calcula parâmetros físico-químicos como massa molecular, ponto isoeletrico teórico e índice de instabilidade. SignalP 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) que prediz a presença e a localização de sítios de clivagem de peptídeo-sinal em sequências de aminoácidos de eucariotos. TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) que prediz os domínios transmembrana possíveis à proteína de interesse. NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) e NetOGlyc 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) os quais predizem sítios de N-glicosilação e O-glicosilação, respectivamente, em sequências de aminoácidos.

Cultura de *Trypanosoma cruzi*

Epimastigotas de *T. cruzi*, cepa CL Brener, foram cultivados de forma axênica em meio LIT (do inglês *Liver Infusion Tryptone*) (NaCl 190 mM, KCl 17 mM, NaH₂PO₄ 8 mM, glicose 10 mM, triptona, Infusão de fígado, hemina; pH 7,3) suplementado com 10 % (v/v) de soro fetal bovino inativado (SFB) juntamente com 100 µg/mL de gentamicina. A cultura foi mantida à temperatura constante de 28 °C.



Extração de DNA genômico

O DNA genômico de *T. cruzi* foi extraído mediante protocolo de extração fenol-clorofórmio. 1×10^7 ou 5×10^7 epimastigotas foram coletados por centrifugação à 2.000 g por 10 min e o *pellet* resultante lavado três vezes com PBS 1X. O *pellet*, então, foi resuspenso em 1 mL de tampão de lise TNES (Tris 10 mM, pH 8,0; NaCl 50 mM; EDTA 50 mM; SDS 1 %). Posteriormente, adicionou-se à amostra 20 µg/mL de RNase A e a incubou por 30 min a 60 °C. Terminada essa etapa, adicionou-se à amostra 100 µg/mL de proteínase K e a incubou por 1 h à 56 °C. Então, à amostra, adicionou-se igual volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), que foi centrifugada à 12.000 g por 5 min. Findada a essa etapa de centrifugação, a fase superior (fase aquosa) foi coletada e transferida para um novo tubo onde, novamente, adicionou-se igual volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico. Por fim, a amostra foi submetida à centrifugação sob as mesmas condições anteriores. A partir da fase aquosa coletada, o DNA total foi precipitado no tubo mediante adição de 2,5 volumes de etanol absoluto gelado com posterior armazenamento do tubo à - 20 °C por 30 min. A amostra cotendo o DNA precipitado foi, então, submetida novamente à centrifugação por 12.000 g por 20 min a 4 °C. O sobrenadante resultante foi descartado e ao *pellet* foi adicionado 1 mL de etanol 70 % gelado, com o qual se lavou o *pellet* por duas centrifugações consecutivas por 12.000 g, 5 min e 4 °C. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* resuspenso em 50 µL de H₂O ultrapura, auto-clavada e livre de nucleases.

Eletroforese em gel de agarose

As amostras de ácidos nucleicos foram resolvidas em géis de agarose, os quais variaram em concentração dependendo do tamanho da amostra. Foram confeccionados géis de 0,8 %, 1,5 % e 2,5 %. Os géis foram preparados pela adição de agarose em tampão TAE 1X (Tris 17,8 mM, ácido acético glacial 0,1 % e Na₂EDTA 1 mM) que foram, então, aquecidos entre 1 a 2 min até homogeneizar completamente formando uma solução translúcida. Então, após esfriamento, brometo de etídio era adicionado à solução na concentração final de 1 µg/mL para fins de visualização por excitação com comprimento de onda na faixa do ultravioleta. As amostras foram preparadas diluindo-se cada amostra individualmente em tampão de amostra 1X (azul de bromofenol 25 %, xileno cianol 25 %, Tris 50 mM pH 7,6; e glicerol 6 %) completando-se o volume final, geralmente 10 µL, com H₂O ultrapura e autoclavada. Por fim, as

amostras foram pipetadas sobre os poços do gel e posicionadas horizontalmente sobre um campo elétrico de 90 V. A análise do tamanho das bandas resolutas foi verificado utilizando-se um marcador molecular como padrão (1 Kb plus Invitrogen®).

Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS/PAGE)

As amostras proteicas, tanto a otubaína recombinante (rOtuTc) quanto os extratos proteicos totais de parasito, foram resolvidas em géis de poliacrilamida/bis-acrilamida na concentração 12 % por metodologia de SDS/PAGE. O preparo das amostras consistiu na submissão destas em condições desnaturantes e redutoras a partir de sua diluição em tampão Laemmli 5X (Tris HCl 50 mM pH 6,8; glicerol 10%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,1%, β -Mercaptoetanol 15 mM) e fervura por 5 min a 100 °C anteriormente à sua aplicação nos poços dos géis. A eletroforese das amostras foi realizada em sistema MiniProtean®3 Cell (BioRad) à temperatura ambiente. A voltagem empregada variou à medida que as amostras eram resolvidas ao longo dos géis, levando-se em consideração a concentração e composição dos géis concentrador e separador em SDS/PAGE. Durante a passagem das amostras do gel concentrador para o separador, a voltagem utilizada foi de 90 V. Alternativamente, a voltagem foi alterada para 120 V quando todas as amostras já se encontravam no gel separador para sua completa resolução. TrisGlicina 1X (Tris HCl 25 mM, pH 8,8; glicina 250 mM, SDS 0,1 %) consistiu no tampão de corrida utilizado para promover a passagem da corrente elétrica. Para fins de visualização das proteínas resolutas, os géis foram submersos em solução de coloração azul de Comassie (metanol 45 %, ácido acético 10 %, Comassie Brilliant Blue R250) por 2 h, sob agitação constante. Posteriormente, os géis foram transferidos para solução descorante (ácido acético 10 %, metanol 10 %) também sob agitação e à temperatura ambiente. Por fim, procedeu-se à visualização das bandas. Bench Mark™ Protein Ladder (Invitrogen®) foi o marcador utilizado nos géis de poliacrilamida para fins de análise de tamanho das bandas resolutas no gel separador.

Clonagem de *otutc*

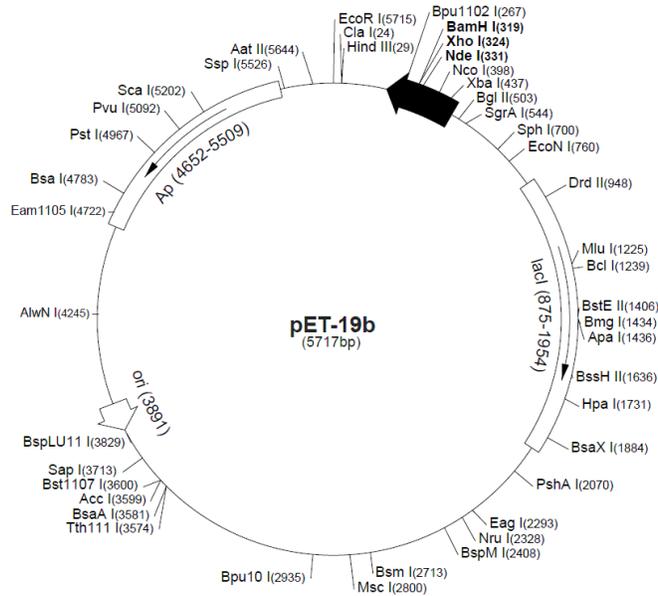


Figura 6. Mapa do vetor de expressão pET19b®. A seta preta indica o sítio múltiplo de clonagem, com seus sítios de restrição em evidência (em negrito). Imagem retirada de https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/strains_vectors/vectors/pdf/pET-19b_map.pdf.

O gene *otutc* foi clonado, primeiramente, no sistema de clonagem TOPO, a partir de PCR do extrato genômico de *T. cruzi* com os iniciadores sOTU_Tc_XhoI e asOTU_Tc_BamHI. Então, o inserto *otutc* em TOPO foi digerido com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Sla*I (*Xho*I) por 1 h a 30 °C em reação tamponada pelo *buffer B4*, de *Sla*I. A partir da liberação do inserto *otutc*, resolvido em gel de agarose 0,8 % (m/v), o inserto foi excisado do gel e limpo em coluna PureLink da InvitroGen®. Então, procedeu-se à etapa de ligação do inserto no sistema de expressão procariótica pET19b. O inserto foi clonado numa razão 1:3 de vetor em que 17 ng de inserto foram ligados à 40 ng de vetor sob catálise de T4 DNA ligase, proveniente do kit comercial de pET19b. O processo de ligação durou 24 h à temperatura ambiente. A partir daí, 100 µL de *E. coli* (DH5α) foi transformado com 1 µL de *otutc*_pET19b. Mediante uma colônia randomicamente selecionada em placa de LB-ágar e posterior inóculo em 100 mL de LB líquido seguido de preparação plasmidial, 100 µL de *E. coli* (XLGold) foram transformados com 100 ng proveniente da preparação plasmidial *otutc*_pET19b. Os



transformantes foram plaqueados em meio LB-ágar contendo ampicilina (100 µg/mL), X-gal e IPTG. 24 h depois, a partir de *screening blue-white* sobre a placa, sete colônias foram randomicamente selecionadas para fins de confirmação da clonagem do inserto, em orientação correta, no pET19b por PCR de colônia. Confirmada a clonagem de *otutc* em pET19b, a colônia 5 (C5), o qual foi positiva para a PCR de colônia, foi cultivada em meio LB-líquido (100 mL) contendo ampicilina (100 µg/mL). Mediante suas células, procedeu-se à uma nova preparação plasmidial no sentido de concentrar, novamente, *otuc_pET19b*. Assim, utilizou-se o 100 ng de *otutc_C5_pET19b* para transformar a linhagem BL21-AI de *E. coli* para proceder à expressão heteróloga. A transformação de *E. coli* (BL21-AI) pelo concentrado plasmidial de *otutc_C5_pET19b*, plaqueamento e a consequente seleção das colônias para inoculação em LB líquido contendo ampicilina, levou à etapa de indução de *otutc*, obtendo-se o produto recombinante de seu gene.

Expressão e Purificação de rOtuTc

E. coli (DH5α) (100 µL) foi transformada com 100 ng de *otutc_pET19b*. Analisando-se o inóculo da transformação em placa de Petri, uma colônia foi randomicamente selecionada e inoculada em 100 mL de LB líquido sendo cultivada por 24 h, a 37 °C e sob agitação constante (250 rpm). Seguiu-se, então, à preparação plasmidial para obtenção do concentrado plasmidial de *otutc_pET19b*. Assim, 100 µL de *E. coli* (XLGold) foram transformadas com 100 ng proveniente da preparação plasmidial. 24 h depois, a partir de *screening blue-white* sobre a placa, seis colônias foram randomicamente selecionadas para fins de confirmação da presença do inserto *otutc* em pET19b, por PCR de colônia.

Cinco colônias provenientes do plaqueamento de BL21-AI contendo *otutc_pET19b* foram inoculadas em meio LB líquido juntamente com ampicilina. Uma colônia contendo pET19b também foi inoculada. As seis colônias foram cultivadas e induzidas separadamente. Primeiramente, todas foram cultivadas a 37 °C por 3 h e agitação constante de 150 rpm. Posteriormente, após mensura de suas respectivas OD₆₀₀, o gene o *otutc*, clonado no plasmídeo pET19b (*otutc_pET19b*), teve sua expressão induzida por 5 h a partir da adição às culturas de IPTG (1 mM) e L-arabinose (0,2 %). A indução das seis colônias deu-se em duas temperaturas distintas: a 37 °C e a 20 °C. Findada a indução, as bactérias foram recolhidas por



centrifugação e lisadas mediante tratamento químico pelo agente BugBuster®. As células lisadas de todas as seis colônias, das diferentes induções, foram separadas em duas frações: solúvel e insolúvel. Tal fracionamento teve por objetivo identificar em qual porção celular a proteína recombinante se encontraria naquelas condições de cultivo e indução. Para tanto, realizou-se duas eletroforeses em gel de poliacrilamida 12 % (SDS/PAGE), que, posteriormente, foram coradas com azul de comassie.

Dentre as cinco colônias positivas para a fração solúvel à 20 °C, a colônia C5 foi selecionada e cultivada em 200 mL de meio LB líquido contendo ampicilina (100 µg/mL) por 3 h. Após a OD₆₀₀ ter sido alcançada, a cultura foi induzida à 20 °C por 5 h com concomitante adição de IPTG (1 mM) e L-arabinose (0,2 %). Concluída a indução, as bactérias foram coletadas por centrifugação e submetidas a lise celular por tratamento químico com solução comercial BugBuster®. A fração solúvel resultante foi submetida à purificação por cromatografia de afinidade em coluna de (Ni⁺²)-agorase e eluída por adição, à coluna, de imidazol em concentrações crescentes.

A cultura de C5 para a qual rOtuTc encontrava-se na fração solúvel foi centrifugada à 2.000 g por 30 min. O sedimentado, então, foi resuspenso em BugBuster® para que fossem lisadas. A partir da formação do extrato proteico bacteriano, este foi introduzido na coluna de (Ni⁺²)-agarose, previamente equilibrada, de acordo com instruções presentes em His•Bind® Purification Kit (Novagen®). Então, a coluna foi lavada com tampão em diferentes concentrações de imidazol, variando entre 5 mM a 100 mM. Pelo princípio da cromatografia por afinidade, rOtuTc foi eluída nas diferentes concentrações, atingindo seu ápice em 50 mM de imidazol. A purificação, por fim, foi avaliada por SDS/PAGE em gel 12 %. Por fim, a proteína recombinante rOtuTc eluída foi dializada (concentrada) e armazenada a – 20 °C em uma proporção de 1:1 de glicerol.



Teste de atividade enzimática de rOtuTc

A fim de avaliar se rOtuTc foi heterologamente expressa em sua forma ativa, avaliou-se a atividade enzimática da proteína recombinante sobre o substrato tetra-ubiquitina K48. 25 µg do substrato K48 (BOSTON BIOCHEM®) foram incubados com 8 µg de rOtuTc por 3 h, a 37 °C, em tampão Hepes 25 mM pH 7,5 com ou sem 5 mM de DTT. Findada a incubação, adicionou-se tampão Laemmli à amostra e se procedeu à análise da reação por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS/PAGE) 15 %. O gel foi corado com azul de Coomassie. O experimento foi gentilmente realizado pelas professoras Carla N. de Araújo e Flávia N. Motta.

Obtenção de anticorpos policlonais anti-rOtuTc

Para obtenção de anticorpo policlonais, a enzima recombinante rOtuTc, oriunda da purificação em coluna de níquel-agarose, foi administrada via intraperitoneal em quatro camundongos machos BALB/c. No total, quatro ciclos de imunização intercalados por quinze dias. Previamente, cerca de uma semana anterior à primeira imunização, amostras de sangue dos quatro camundongos foram coletadas para obtenção do soro pré-imune. Este, por sua vez, foi diluído em uma proporção 1:1 em glicerol e armazenado a – 20 °C. Na primeira imunização, 5 µg de rOtuTc foi emulsionada em adjuvante completo de Freund numa proporção 1:1 e, posteriormente, administrado aos camundongos. Nas duas imunizações seguintes, por outro lado, 5 µg de rOtuTc foi emulsionada em adjuvante incompleto de Freund também na proporção 1:1, com a consequente administração aos camundongos. Na última imunização, 5 µg de rOtuTi purificada foi diluída em PBS 1X e administrada na ausência de qualquer um dos dois adjuvantes. Decorrida uma semana após a última imunização, o sangue dos quatro camundongos foi colhido por pulsão cardíaca e o soro separado do concentrado de hemácias. Por fim, o soro foi diluído em uma proporção 1:1 em glicerol e armazenado a – 20 °C.



Preparação plasmidial

Para fins de obtenção de concentrados de plasmídeo, colônias que albergassem os insertos de interesse clonados nos plasmídeos pET19b ou pGEM foram submetidas, ou a preparações plasmidiais de pequeno porte (mini-prep), ou de médio porte (mid-prep). Primeiramente, as colônias de interesse foram crescidas por 16 h a 37 °C sob agitação constante de 150 rpm, ou em 5 mL de meio LB-líquido (mini-prep), ou em 100 mL – 200 mL de meio de meio LB líquido (midi-prep) contendo ampicilina [100 µg/mL]. Então, as células que as compunham foram coletadas por centrifugação a 10.000 g por 10 min. O sobrenadante resultante foi descartado. Se submetidas a mini-prep, adicionou-se tampão Tris-EDTA gelado (Tris 25 mM pH 8; EDTA 10 mM, glicose 50 mM) ao *pellet*, o qual foi incubado por 5 min no gelo. Em seguida, procedeu-se à lise alcalina desse *pellet* mediante adição de solução NaOH-SDS (200 mM, SDS 1 %). A solução resultante foi, então, homogeneizada por inversão, gentilmente. Assim, após uma nova incubação no gelo por 5 min, adicionou-se a solução CH₃COOK – CH₃COOH (5 M, 11,5 mL; volume final: 100 mL) homogeneizando-se, novamente, por inversão e se seguindo à incubação no gelo por 5 min. Findada essa etapa, a amostra formada foi centrifugada por 15 min à 10.000 g a 4°C e o sobrenadante transferido para um novo tubo onde foi adicionado igual volume de isopropanol. A amostra foi gentilmente homogeneizada e incubada à temperatura ambiente por 5 min. Após este período, a amostra foi submetida à centrifugação por 15 min, a 10.000 g e a 25°C. O sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado ressuspenso em etanol absoluto gelado e incubado, por 20 min, a – 20°C. A amostra foi centrifugada por 15 min, a 10.000 g e a 4°C e o sobrenadante descartado. Por fim, o DNA precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70 % gelado, centrifugado por mais 5 min a 10.000 g a 4°C. Após a secagem do *pellet* de DNA, este foi ressuspenso em ~ 50 µl de água ultrapura estéril. Por fim, o DNA plasmidial foi estocado a – 20 °C. Se submetido a midi-prep, porém, o *pellet* obtido da centrifugação teve seu conteúdo plasmidial extraído e concentrado a partir da execução, em acórdância com o protocolo experimental do fabricante, de um kit *midiprep Hipure Plasmid DNA purification* (Invitrogen®).



Transformação de *Escherichia coli*

Células competentes de diferentes linhagens de *E. coli* foram incubadas, ou com ligações, ou com preparações plasmidiais diversas em concentrações variando entre 100 ng a 1 µg. Esse processo deu-se em baixas temperaturas, no gelo, durante 30 min. Transcorrido esse período, as células foram submetidas a um choque térmico a 42 °C por 1 min. Em seguida, foram novamente incubadas no gelo por 2 min. Então, 1 mL de meio LB (do inglês *Luria-Bertani Broth*) foi adicionado ao tubo contendo as células. A partir daí, essas ficaram sob agitação constante de 150 rpm, a 37 °C, por 1 h. Sequencialmente, as células foram, então, inoculadas em placas de Petri contendo meio LB-ágar com 100 µg/mL de ampicilina. Caso necessário, para fins de varredura no intuito de verificar se houve ou não a inserção correta do inserto no sítio de clonagem, as placas foram montadas contendo X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-galactopiranosídeo) 80 µg/mL e IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo) 1 mM. As placas foram incubadas na estufa bacteriológica por 16 h a 37 °C. Havendo colônias, essas eram analisadas e/ou inoculadas.

Plaqueamento e inoculação

Para fins de clonagem tanto do gene *otutc* em pET19b quanto para a confecção dos cassetes *ultra/otutc_hx1_hph_tub_otutc/ultra* e *ultra/otutc_bsd_otutc/ultra*, etapas de plaqueamento e inoculação foram executadas. Apesar de algumas diferenças metodológicas entre eles quanto a esses experimentos, em geral, o procedimento experimental adotado foi semelhante.

As placas de Petri foram montadas, ou contendo apenas meio LB-ágar com ampicilina 100 µg/mL, ou, adicionalmente, contendo X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-galactopiranosídeo) 80 µg/mL e IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo) 1 mM. Na primeira estratégia de plaqueamento, o objetivo foi apenas propiciar o crescimento de colônias positivas para a presença de um determinado plasmídeo. Já na segunda estratégia, o objetivo consistiu na seleção de clones por *screening blue-white*. As diferentes linhagens de *E. coli*, por sua vez, foram inoculadas mediante aplicação de um procedimento comum: foram crescidas por 1 h, sob agitação constante de 150 rpm e 37 °C. Então, foram centrifugadas ressuspensas em 150 µL de meio LB (do inglês *Luria-Bertani Broth*) e distribuídas entre as placas para



inoculação por espalhamento, na qual uma placa recebeu 70 % do inóculo e outra os 30 % restante.

PCRs de colônia

No intuito de confirmar o sucesso das clonagens, seja de *otutc* em pET19b, seja de *hph* e dos cassetes *hx1_tub* e *ultra/otutc_hx1_hph_tub_otutc/ultra* em pGEM *T-easy Vector*[®], PCRs foram executadas utilizando o genoma proveniente diretamente da lise das colônias. Estas foram coletadas a partir de uma ponteira estéril sendo estricadas, primeiramente, em uma nova placa de Petri com LB-ágar e ampicilina 100 µg/mL, para a obtenção de suas réplicas. Em seguida, foram inoculadas em tubos contendo H₂O ultrapura e estéril, de modo que as células componentes dessas colônias fossem lisadas e seu conteúdo genético, incluindo os plasmídeos que albergavam, fossem liberados para servirem de molde para as PCRs subsequentes. Os tubos contendo as colônias foram, então, submetidos a 95 °C de aquecimento por 5 min. Por fim, aproximadamente 1 µL de cada tubo foi adicionado às PCRs específicas de cada experimento como molde para a confirmação das clonagens.

Imunofluorescência

A fim de determinar a citolocalização de OtuTc em *T. cruzi*, bem como de analisar a expressão diferencial de *otutc* entre as diferentes formas morfológicas do parasito, procedeu-se a um experimento de imunofluorescência e consequente análise por microscopia confocal. Assim, os parasitos foram coletados por centrifugação a 1.000 g por 10 min e lavados duas vezes com PBS 1X estéril. Posteriormente, foram ressuspensos em 200 µL de solução 1 % (v/v) formaldeído em PBS por 30 min, para fins de fixação. Então, os parasitos foram permeabilizados com 0,1 % (v/v) de Triton X-100 em PBS 1X por 10 min com incubação em 100 mM de glicina por igual período de tempo. Por fim, os parasitos foram coletados por centrifugação e ressuspensos entre 50-200 µL de PBS 1X.



As lâminas foram previamente lavadas com metanol 100 % e tratadas com solução 0,1% (m/v) poli-L-lisina. Depositou-se, então, os parasitos fixados e permeabilizados sobre as lâminas. O bloqueio foi realizado por 5 min com tampão TB – PBS, 0,1 % (v/v) Triton X-100; 0,1 % (m/v) BSA. Para imunomarcação, o anticorpo primário anti-rOtuTc, de origem do camundongo 2, foi depositado nas lâminas e estas incubadas por 16 h a 4 °C, em diluição de 1:100 em TB. Por fim, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS 1X e incubadas por 1 h a temperatura ambiente com anticorpo secundário *goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 488* (Invitrogen®) sob ausência de luz. Após lavagem das lâminas com PBS 1X, os parasitos foram incubados com 10 µg/mL DAPI por 5 min. Em seguida, as lamínulas foram sobrepostas nas lâminas com 10 µL de DAKO *Fluorescence Mounting Medium*.

As imagens referentes à marcação para OtuTc foram adquiridas por microscopia confocal. As imagens representam sobreposições de várias *z-sections*, as quais correspondem ao conteúdo total dos parasitos visualizados.



```

otutc_S      GAAAGTATGCTTGGCGATAA CGAGCTGACGGCGAGG TACTTGGAACAGGCCACAGA AACTG
otutc_P      GAAAGTATGCTTGGCGATAG CGAGCTGACGGCGAGG TACTTGGAACAGGCCACAGA AACTG
*****

otutc_S      CGCACGAAGCTCATTGAGGACTACGGTGATTTTGTGGAGGACTTCTGCGA CGCGGCGATT
otutc_P      CGCACGAAGCTCATTGAGGACTACGGTGATTTTGTGGAGGACTTCTGCGA AGCGGCGATT
*****

otutc_S      GCTGTGATTCCCA AATTGAGTCTGGAGGCTGCA CGACGTCCG AGGAGCTGTATGCACTG
otutc_P      GCTGTGATCCCA AATTGAGTCTGGAGGCTGCA CGACGTCCG AGGAGCTGTATGCACTG
***** * *****

otutc_S      GCGACCTCGCATGATTCCGAGTACGTGATTTACTTCTACCGCTACGCTGTTTCAAATTAC
otutc_P      GCGACCTCGCATGATTCCGAGTACGTGATTTACTTCTACCGCTACGCTGTTTCAAATTAC
*****

otutc_S      ATACGTGGCCATAA AGATGACTTCCTTCCGTTTGTGATGGGCCTTAATTACGAAAACGTT
otutc_P      ATACGTGGCCATAA AGATGACTTCTTCCGTTTGTGATGGGCCTTAATTACGAAAACGTT
*****

otutc_S      GAAGACTTCTGTGCGGCCGAAGTGGATGCGGTCTCAAGCGAAAGCGATAACGTGCAGGTG
otutc_P      GAAGACTTCTGTGCGGCCGAAGTGGATGCGGTCTCAAGCGAAAGCGATAAATGTGCAGGTG
*****

otutc_S      GTGGCATTTGCCAGATGCTTCCAGTTGAAAATTGTTGTGGAGTACTTGGACGGTAGCGTT
otutc_P      GTGGCATTTGCCAGATGCTTCCAGTTGAAAATTGTTGTGGAGTACTTGGACGGTAGCGTT
*****

otutc_S      GGTACACGCACCACAGCCATTCTTTCCGGTGACTCTAGCGATACCGGTGACAACACT
otutc_P      GGTACACGCACCACAGCCACTCATTCTTTCCGGTGACTCTAGCGGTACCGGTGACAACACT
*****

otutc_S      CATCTTGTGGTGACACTGTTGTACCGTCCAGGGCACTACGACCTCCTGTACAAG TGA
otutc_P      TCTCTTGTGGTGACACTGTTGTACCGTCCAGGGCACTACGACCTCCTGTACAAG TGA
*****

```

Figura 7. Estratégias de deleção de *otutc* a partir do alinhamento do locus dos alelos *otutc_S* e *otutc_P*. *otutc_S*: alelo *Esmeraldo-like*; *otutc_P*: alelo *Non-Esmeraldo-like*. Os asteriscos embaixo de cada nucleotídeo alinhado indicam que eles são idênticos para ambos os alelos. Em azul claro, sequência de 100 bp correspondente ao ultrâmero 5'UTR_ *otutc*. **ATG**: em azul escuro, códon de início. Em roxo, sequência correspondente ao ultrâmero 5' *otutc/ultra*. Em amarelo, sequência de 20 nucleotídeos correspondente à região, para ambos os alelos de *otutc*, onde o sgRNA_412_revcom se anela. **CCA**: PAM (do inglês, *Proto Adjacent Motif*). Em verde, sequência de 91 bp correspondente ao ultrâmero *otutc/ultra3'*. **TGA**: em vermelho, códon de parada. nucleotídeos destacados em amarelo correspondem àqueles em que não há identidade entre os nucleotídeos alinhados dos alelos.

I. Construção do Cassete *ultra/otutc_hx1_hph_tub_otutc/ultra*

O cassete *ultra/otutc_hx1_hph_tub_otutc/ultra* foi confeccionado a partir da inserção e clonagem do gene *hph* entre as sequências *hx1* e *tub* do plasmídeo *hx1_tub_pGEM*. Tal construção ocorreu mediante a digestão do plasmídeo *hph_pGEM*, liberando o inserto *hph*, e a linearização do plasmídeo *hx1_tub_pGEM* com as mesmas enzimas de restrição, *XhoI* e *HindIII*, as quais são parte da construção de ambos os plasmídeos. A ligação de *hph* ao sítio de clonagem presente entre *hx1_tub* foi catalisada pela T4 DNA ligase.

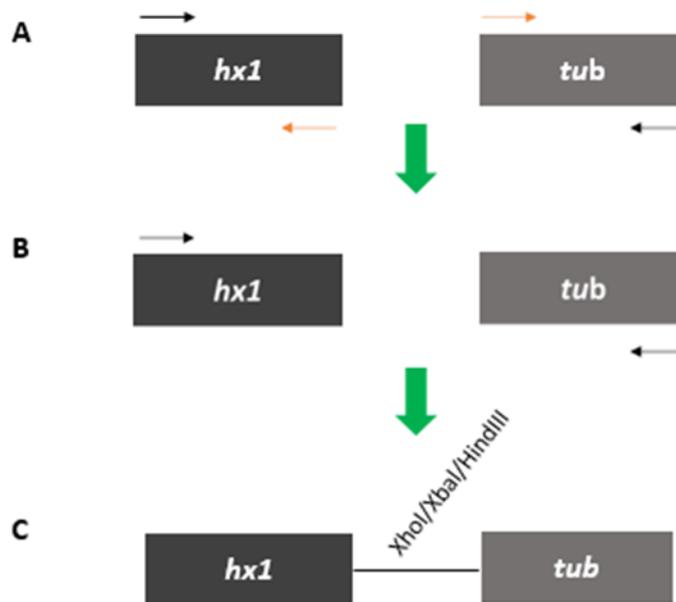


Figura 8. Modelo esquemático de confecção do cassete *hx1_tub*. As caixas pretas correspondem ao amplicon *hx1*, ao passo que as caixas cinzas correspondem ao amplicon *tub*. As setas pretas sobre cada caixa correspondem aos iniciadores necessários à amplificação de cada amplicon. As setas em laranja correspondem aos iniciadores que possuem as sequências dos sítios de restrição para as enzimas *XhoI*, *XbaI* e *HindIII*. A seta verdes indicam a sucessão de eventos até obtenção do cassete. **A.** PCR de obtenção das seqências *hx1* e *tub*. **B.** PCR de fusão dos amplicons produzidos em A com a utilização do iniciador forward de *hx1* e o iniciador reverse de *tub*. **C.** Cassete *hx1_tub* com os respectivos sítios de restrição entre as duas sequências, os quais são requeridos à clonagem dos genes de resistência.

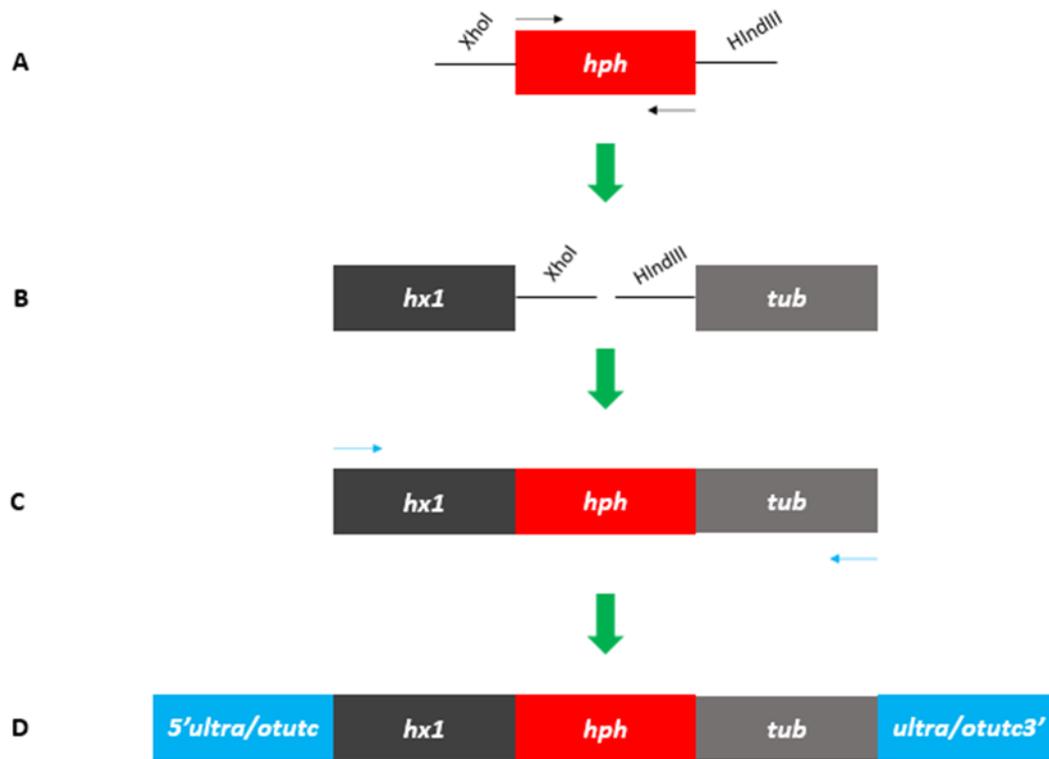


Figura 9. Modelo esquemático de confecção do cassete *ultra/otutc_hx1_hph_tub_otutc/ultra*. As caixas pretas correspondem ao amplicon *hx1*. As caixas cinzas correspondem ao amplicon *tub*. As caixas vermelhas correspondem ao amplicon *hph*. As caixas azuis, por sua vez, correspondem aos ultrâmeros como braços de homologia flanqueando o cassete nas extremidades 5' e 3'. As setas pretas sobre cada caixa correspondem aos iniciadores necessários à amplificação de cada amplicon. As setas em azul correspondem aos ultrâmeros em cada extremidade 5' e 3'. As setas verdes indicam a sucessão de eventos até obtenção do cassete. **A.** Amplicon do gene *hph*. **B.** Cassete *hx1_tub* linearizado com as enzimas *XhoI* e *HindIII*. **C.** Cassete *hx1_hph_tub*, o qual serve de molde aos ultrâmeros para a confecção do cassete *ultra_otutc_hx1_hph_tub_ultra_otutc/ultra*. **D.** Cassete *ultra/otutc_hx1_hph_tub_otutc/ultra*.

II. Construção do Cassete *ultra/otutc_bsd_otutc/ultra*

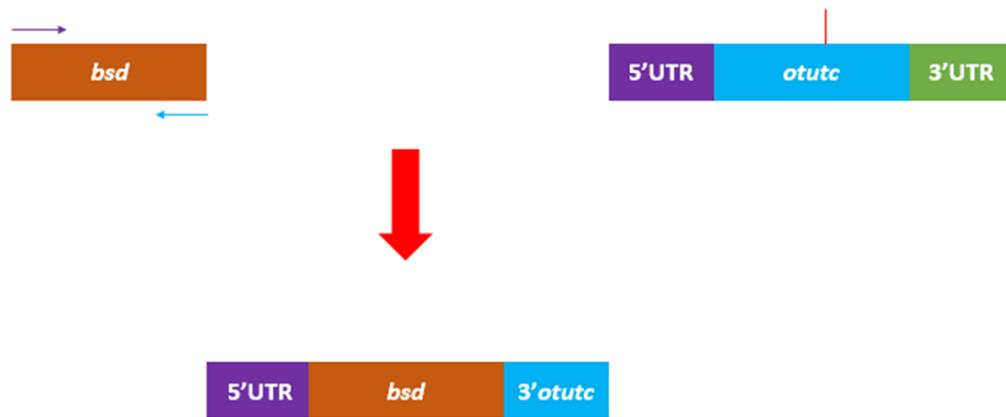


Figura 10. Confeção do cassete *ultra/otutc_bsd_otutc/ultra* e estratégia de confirmação de integração do cassete no *locus* de interesse por PCR. *bsd*: gene de resistência à marca de seleção Blasticidina. *otutc*: gene *otutc* (alelo *Esmeraldo-like*). 5'UTR: 100 bp da extremidade 5' do alelo *Esmeraldo-like*. 3'UTR: extremidade 3' do gene *otutc* (alelo *Esmeraldo-like*). 3'*otutc*: 91 bp da região interna de *otutc* próximo ao sítio de clivagem da dupla fita pela Cas9. Seta roxa: ultrâmero senso correspondete à 5'UTR. Seta azul: ultrâmero antissenso correspondete à 3'*otutc*. Linha vermelha: sítio de corte da dupla fita de DNA pela Cas9.

Amplificação do cassete *ultra/otutc_hx1_hph_tub_otutc/ultra*

A confecção do cassete indutor de reparo por homologia direta (do inglês *Homologous Direct Repair* – HDR) foi realizada por PCR a partir do plasmídeo *hx1_hph_tub_pGEM* tendo por iniciadores ultrâmeros de, respectivamente, 91 bp (5') e 90 bp (3'), os quais correspondem a sequências para o gene *otutc* e sequências para anelamento e amplificação do cassete pelas regiões *hx1* e *tub*. Os ultrâmeros foram desenhados em regiões adjacentes a sequência de reconhecimento pelo sgRNA_ *otutc_412_revcom* e próximas ao sítio de clivagem pela Cas9, a qual é idêntica para ambos os alelos de *otutc*. A reação foi executada utilizando *Phusion Flash High Fidelity PCR Master Mix* (Thermo Fisher®) para um volume de 25 µL, [400 nM] de cada iniciador e 25 ng de *hx1_hph_tub_pGEM*. No total, cinco reações foram realizadas nas seguintes condições: 98 °C, por 1 min, de desnaturação inicial; 98 °C, por 5 s, de desnaturação; 55 °C, por 10 s anelamento; e 72 °C de extensão por 25 s em 35 ciclos, com extensão final a 72 °C por 1 min, gerando um amplicon de 1557 bp correspondente ao cassete *ultra/otutc_hx1_hph_tub_otutc/ultra*, o qual foi analisado em eletroforese em gel de agarose 0,8 % (m/v).

Amplificação do cassete *ultra/otutc_bsd_otutc/ultra*

Assim como em *ultra/otutc_hx1_hph_tub_otutc/ultra*, a confecção do cassete *ultra/otutc_bsd_otutc/ultra* deu-se por PCR a partir do amplicon *bsd*. tendo por iniciadores ultrâmeros de, respectivamente, 100 bp (5') e 90 bp (3'), os quais correspondem, nessa ordem, a região intergênica da extremidade 5' do gene *otutc* e a uma sequência endógena de *otutc* próxima ao sítio de clivagem para a Cas9. Concomitantemente, ambos os ultrâmeros possuem sequências para anelamento e amplificação do cassete pelas extremidades 5' e 3' de *bsd*. A reação foi executada utilizando *Phusion Flash High Fidelity PCR Master Mix* (Thermo Fisher®) para um volume de 25 µL, [400 nM] de cada iniciador e 25 ng do amplicon *bsd*. No total, duas reações foram realizadas nas seguintes condições: 98 °C, por 10 s, de desnaturação inicial; 98 °C, por 1 s, de desnaturação; 58 °C, por 10 s anelamento; e 72 °C de extensão por 16 s em 34 ciclos, com extensão final a 72 °C por 1 min em 35 ciclos, gerando um amplicon de 589 bp correspondente ao cassete *ultra/otutc_bsd_otutc/ultra*, o qual foi analisado em eletroforese em gel de agarose 0,8 % (m/v).

Seleção do sgRNA e transcrição *in vitro*

A deleção de *otutc* em epimastigotas da cepa CL Brener consistiu na transfecção dos cassetes confeccionados na linhagem LUCCAS9, a qual sintetiza a endonuclease Cas9 constitutivamente. Para tanto, o RNA guia utilizado foi transcrito *in vitro* para ser transfectado em conjunto com os cassetes. Para a confecção desse sgRNA, primeiramente a sequência alinhada dos alelos de *otutc* foi submetida à uma ferramenta customizada chamada EuPaGDT (<http://grna.ctegd.uga.edu>), a qual fornece diferentes sgRNA que variam entre si em critérios como especificidade, presença ou ausência de *off-targets* e eficiência de anelamento. Dentre os sgRNA gerados pela ferramenta para *otutc*, o sgRNA_ *otutc*_412_revcom foi selecionado, tendo em vista a ausência de *off-targets* para a sequência alvo, bem como sua eficiência de anelamento para ambos os alelos de *otutc*.

sgRNA_ *otutc*_412_revcom foi sintetizado por transcrição *in vitro*. Para tanto, dois iniciadores foram sintetizados: *otutc*_412_revcom, que é o iniciador *forward* que contém exatamente a sequência das bases referentes à sequência alvo do sgRNA; e o iniciador *scaffold*, que é o iniciador *reverse*, o qual se anela ao molde plasmidial pX330. Esse plasmídeo, por sua vez, serve de molde para a formação da estrutura secundária que interage com a Cas9. Primeiramente, realizou-se duas reações de PCR de 50 µL utilizando *Phusion Flash High Fidelity PCR Master Mix* (Thermo Fisher®), sob os seguintes parâmetros: 98 °C por 2 min, de desnaturação; 98 °C por 30 s, de desnaturação; 58 °C por 30 s, de anelamento; 72 °C por 30 s, de extensão; e 72 °C por 1 min, de extensão final em 35 ciclos. Após análise por eletroforese em gel de agarose 0,8 %, procedeu-se à transcrição *in vitro* tendo por molde essas PCRs.

Transfecção e Clonagem

1×10^7 epimastigotas da cepa CL Brener, em fase exponencial de crescimento, foram coletados por centrifugação a 2.000 g por 10 min e 4 °C. Então, foram lavados três vezes com PBS 1X gelado sob as mesmas condições de centrifugação. Findada a lavagem, foram resuspendidos em 100 µL de solução *human T cell Nucleofactor solution* (Amaxa AG) juntamente com sgRNA_ *otutc*_412_revcom (transcrito *in vitro*) e seus respectivos cassetes: 5' *otutc-hx1-hph-tub-otutc*3' e 5' *UTR-bsd-otutc*3'. Os grupos controle foram transfectados na ausência tanto do sgRNA quanto dos cassetes.

Findada a transfecção, os parasitos transfectados foram transferidos para seus respectivos frascos de cultura e ressuspensos em 5 mL de meio LIT suplementado com 20 % de SFB, gentamicina 100 µg/mL e 10 µg/mL de puomicina. 24 h decorridas da transfecção, adicionou-se ao meio de cultura 100 µg/mL de higromicina (InvivoGen®) ou 10-25 µg/mL de blasticidina (InvivoGen®). Concomitantemente, os parasitos foram distribuídos em placas de 24 poços, sob as mesmas condições de suas respectivas garrafas, para fins de clonagem sob pressão seletiva de seus respectivos antibióticos.

Sequenciamento

O sequenciamento tanto do gene *otutc* quanto do cassete *ultra/otutc_hx1_hph_tub_otutc/ultra* foram realizados pela empresa Universidade Católica de Brasília. No sequenciamento dos dois primeiros, as sequências encontravam-se clonadas em plasmídeos que tinham por iniciadores os oligos T7 e SP6: *otutc*, em pET19b; e cassete 5' *otutc-hx1-hph-tub-otutc3'*, em pGEM-T-easy Vector System®.

Extrato total de proteínas de *T. cruzi*

Os extratos proteicos das formas epimastigotas de *T. cruzi* foram obtidos coletando-se os parasitos por centrifugação a 2.000 g por 10 min. A partir daí, os *pellets* resultantes foram lavados três vezes com PBS 1X (do inglês *Phosphate Saline Buffer*). No intuito de lisar as células para obtenção do extrato, os *pellets* foram resuspensos em tampão RIPA (Tris [50 mM], pH 7; NaCl [150 mM], SDS 0,1 %, C₂₄H₃₉NaO₄ 0,5 %, Triton X-100 1 %) juntamente com coquetel inibidor de protease (*cOmplete™ Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* – Roche®). O extrato total produzido foi, então, coletado para análise por SDS-PAGE em 1 x 10⁷ parasitos/poço.

Western blotting

Os extratos das amostras foram aquecidos a 100 °C por 5 min em tampão Laemmli (SDS 2 %, glicerol 10 %, β -mercaptoetanol 5 %, azul de bromofenol 0,002 %, Tris [125 mM]; pH 6.8). As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12 %.

A transferência das proteínas dos extratos para membranas de nitrocelulose Amersham™ Protran™ (GE Healthcare) ocorreu a 350 mA por 1h30, utilizando-se o sistema Mini Trans-Blot® (Bio-Rad) de transferência em tanque por submersão em tampão de transferência (Tris [48 mM], pH 9,2; glicina [39 mM], SDS 0,037 % e metanol 20 %). Decorrida a transferência, as membranas foram bloqueadas com solução TBS (do inglês *Tris- Buffered Saline*) (Tris [50 mM], pH 7,5; NaCl [150 mM]) contendo 5 % de leite desnatado (m/v) por 30 min. Posteriormente, as membranas foram incubadas a 4 °C, por 16 h, com seus respectivos anticorpos primário em 0,1 % TBS-Tween 20 (TBST) (v/v) contendo 1 % de leite desnatado (m/v) em uma diluição 1:100 de anticorpos policlonais anti-rOtuTc. Em seguida, foram lavadas sete vezes, por 5 min, com TBST e incubadas por 1 h com o anticorpo secundário *goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase conjugated* (1:30.000) em TBST 1 % de leite desnatado (m/v).

A membrana foi lavada, novamente, por cinco vezes. A imunomarcagem foi observada por quimioluminescência utilizando o substrato peroxidase *ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare) e submetida a leitura ao equipamento ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare).



PCR de confirmação de integração do cassete *ultra/otutc_bsd_otutc/ultra*

A análise de ocorrência de integração genômica do cassete *ultra/otutc_bsd_otutc/ultra* nos epimastigotas CL Brener da linhagem LUCCAS9 foi realizada por PCR utilizando *Phusion Flash PCR Master Mix* (Thermo Fisher®) com posterior análise por eletroforese em gel de agarose 0,8 %. Primeiramente, epimastigotas da frasco e dos clones foram coletados por centrifugação a 1.000 *g* por 10 min. Então, o *pellet* resultante foi lavado três vezes com PBS 1X. Findada esta etapa, resuspendeu-se, então, separadamente, os parasitos em 100 µL de tampão TNES (Tris [10 mM], pH 8,0; NaCl [50 mM], EDTA [50 mM], SDS 1 %). Por fim, o DNA genômico de cada amostra foi extraído pelo método de extração por fenol-clorofórmio.



RESULTADOS

Análises *in silico* do gene *otutc*

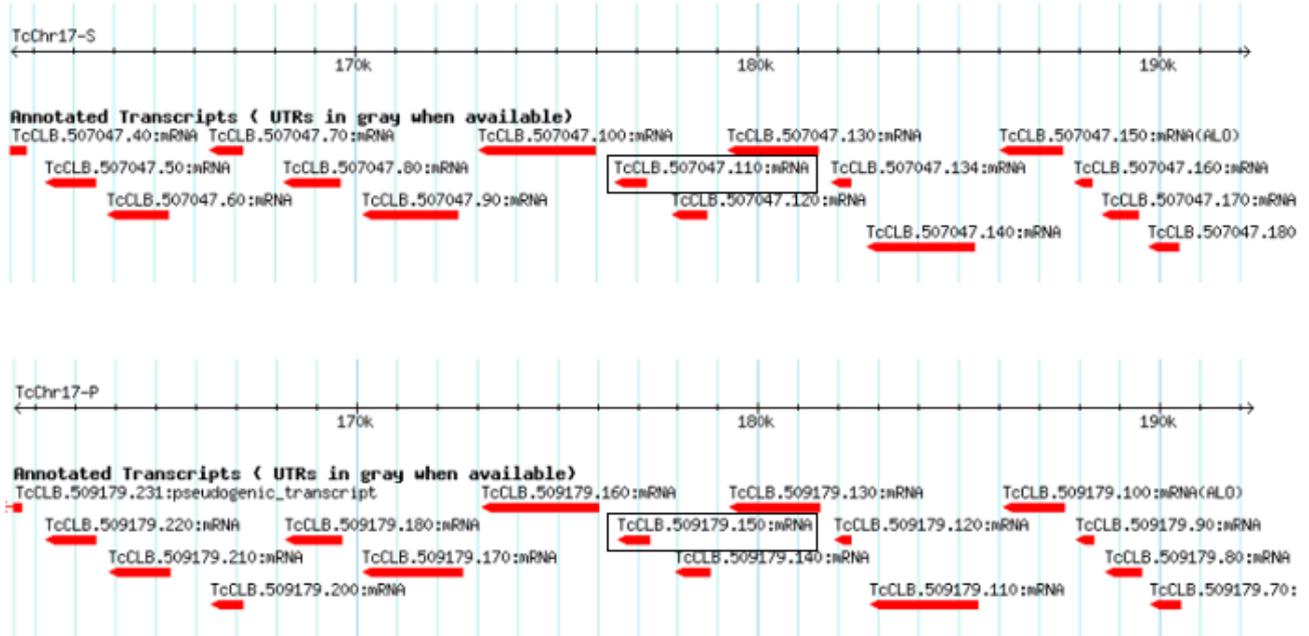
I. Localização de *otutc* no genoma de *T. cruzi* da cepa CL Brener

A partir de varredura na plataforma TriTrypDB, <https://tritrypdb.org/tritrypdb/>, identificou-se que o gene *otutc* possui dois alelos para a cepa de referência CL Brener. Esses alelos, identificados pelos códigos TcCLB.507047.110 e TcCLB.509179.150, localizam-se no cromossomo 17 (Chr17), estando cada alelo distribuído em um homólogo constituinte do par. Por tratar-se de uma cepa híbrida que remonta às DTUs TcI e TcII, cada homólogo componente do par possui uma origem filogenética distinta. O homólogo com origem em TcI é chamado *Esmeraldo-like* e identificado pela letra S. Já o homólogo com origem em TcII é chamado *Non-Esmeraldo-like* e identificado pela letra P. O alelo presente em S é identificado por *otutc_S*, ao passo que o alelo presente em P é identificado por *otutc_P*. Ambos os alelos estão localizados em posições diferentes em seus *loci* nos homólogos de origem (**Tabela 1**), apresentando polimorfismos de base entre suas regiões 5' e 3' UTR, mas possuindo sintenia entre si (**Figura 11**).

Alelo	Posicionamento no Chr17
<i>otutc_S</i>	176445 – 177239
<i>otutc_P</i>	176506 – 177300

Tabela 1. Posicionamento dos alelos *otutc_S* e *otutc_P* em seus respectivos homólogos no cromossomo 17. Dados obtidos da plataforma TryTripDB a partir do código de identificação de cada alelo <https://tritrypdb.org/tritrypdb/>.

A



B

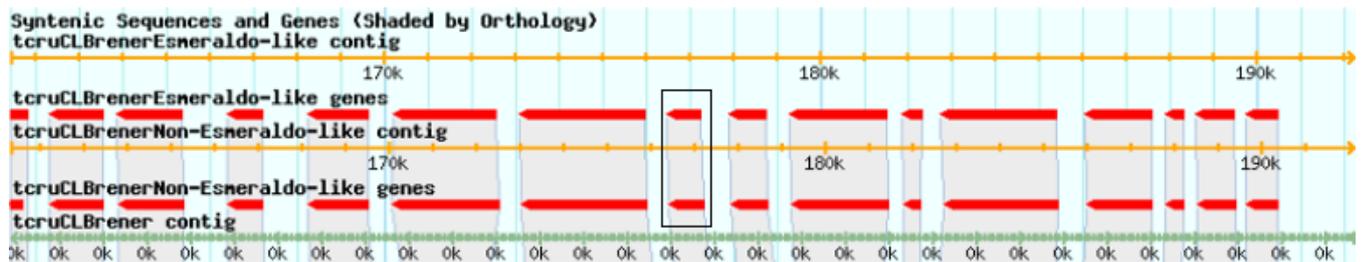


Figura 11. Localização dos alelos de *otutc*, *otutc_S* e *otutc_P* em seus respectivos cromossomos homólogos e a relação de sintenia entre eles. **A.** Posição dos alelos, em cada homólogo, com relação aos genes adjacentes do mesmo locus. TcChr17-S e TcChr17-P correspondem, respectivamente, ao par de homólogos do cromossomo 17, onde os alelos *otutc_S* e *otutc_P* estão localizados. **B.** Relação de sintenia entre os genes adjacentes no locus e entre os alelos *otutc_S* e *otutc_P* para os cromossomos TcChr17-S e TcChr17-P. Os retângulos na horizontal, em preto, identificam, separadamente, o tamanho e o código do alelo *otutc_S*, no cromossomo TcChr17-S; e do alelo *otutc_P*, no cromossomo TcChr17-P. O retângulo na vertical, em preto, identifica os alelos *otutc_S* e *otutc_P* quando comparados com relação à sua sintenia. Barras em vermelho com seus respectivos códigos, identificam os diferentes genes que compõem o locus em questão em cada cromossomo. Sombras, em cinza, identificam o grau de sintenia ente os genes. As imagens foram obtidas da plataforma TryTripDB <https://tritypdb.org/tritypdb/>.

II. Identidade entre as sequências de nucleotídeos dos alelos de *otutc*

O gene *otutc*, para ambos os alelos, possui 795 pares de base, como consta da plataforma TryTripDB. Mediante o alinhamento das sequências gênicas dos alelos *otutc_S* e *otutc_P*, obteve-se que os ambos possuem 2 % de polimorfismo entre si, o que confere às duas sequências 98 % de identidade (**Figura 12**).

```
otutc_S      ATGACTTCCTCCGCCATGACAGGGAGATGCAGATGGCGATCATTCAGAGCGAAATCGAG
otutc_P      ATGACTTCCACCGCCATGACAGGGAGATGCAGATGGCGATCATTCAGAGCGAAATCGAG
*****

otutc_S      TCGGTACCGCTTCTTAGTGATCCCGTAGAGGCGCTGTCGGAGACATGTAGTCTCGTGAAG
otutc_P      TCGGTACCGCTTCTTAGTGATCCCGTGGAGGCGCTGTCGGAGACATGTAGTCTCGTGAAG
*****

otutc_S      GAATTTGCCAATAGTGCATCGATTTTGCCAAAAGTACTTTCGCCTTTTTGCGTCCGACAAT
otutc_P      GAATTTGCCAATAGTGCATCGATTTTGCCAAAAGTACTTTCGCCTTTTTGCGTCCGACAAT
*****

otutc_S      GACGACCGCTACAGTGGCATCCGGTATGCACGACGGGATGGGAACTGTTTCTTCCGCTGC
otutc_P      GACGACCGCTACAGTGGCATCCGGTATGCACGACGGGATGGGAACTGTTTCTTCCGCTGC
*****

otutc_S      GTTGTATTTTCTCTGCTGGAAAGTATGCTTGGCGATAACGAGCTGACGGCGAGGTACTTG
otutc_P      GTTGTATTTTCTCTGCTGGAAAGTATGCTTGGCGATAGCGAGCTGACGGCGAGGTACTTG
*****

otutc_S      GAACAGGCCACAGAACTGCGCACGAAGCTCATTGAGGACTACGGTGATTTTGTGGAGGAC
otutc_P      GAACAGGCCACAGAACTGCGCACGAAGCTCATTGAGGACTACGGTGATTTTGTGGAGGAC
*****

otutc_S      TTCTGCGACGCGGCGATTGCTGTGATTCGCCAAATTGAGTCTGGAGGCTGCACGACGTCG
otutc_P      TTCTGCGAAGCGGCGATTGCTGTGATCCACCAAATTGAGTCTGGAGGCTGCACGACGTCG
*****

otutc_S      GAGGAGCTGTATGCACTGGCGACCTCGCATGATTCCGAGTACGTGATTTACTTCTACCGC
otutc_P      GAGGAGCTGTATGCACTGGCGACCTCGCATGATTCCGAGTACGTGATTTACTTCTACCGC
*****

otutc_S      TACGCTGTTTCAAATTACATACGTGGCCATAAAGATGACTTCCTTCCGTTTGTGATGGGC
otutc_P      TACGCTGTTTCAAATTACATACGTGGCCATAAAGATGACTTTCTTCCGTTTGTGATGGGC
*****

otutc_S      CTTAATTACGAAAACGTTGAAGACTTCTGTCGGGCCGAAGTGGATGCGGTCTCAAGCGAA
otutc_P      CTTAATTACGAAAACGTTGAAGACTTCTGTCGGGCCGAAGTGGATGCGGTCTCAAGCGAA
*****

otutc_S      AGCGATAACGTGCAGGTGGTGGCATTTGCCAGATGCTTCCAGTTGAAAATTGTTGTGGAG
otutc_P      AGCGATAATGTGCAGGTTGTGGCATTTGCCAGATGCTTCCAGTTGAAAATTGTTGTGGAG
*****

otutc_S      TACTTGGACGGTAGCGTTGGTACACGCACCACACGCCATTCATTTTCCGGTGACTCTAGC
otutc_P      TACTTGGACGGTAGCGTTGGTACACGCACCACACGCCACTCATTTTCCGGTGACTCTAGC
*****

otutc_S      GATACCGGTGACAACACTCATCTTGTGGTGACACTGTTGTACCGTCCAGGGCACTACGAC
otutc_P      GTTACCGGTGACAACACTTCTCTTGTGGTGACACTGTTGTACCGTCCAGGGCACTACGAC
*****

otutc_S      CTCTGTACAAGTGA
otutc_P      CTCTGTACAAGTGA
*****
```

Figura 12. Alinhamento dos alelos *otutc_S* e *otutc_P*. *otutc_S*: alelo *Esmeraldo-like*; *otutc_P*: alelo *Non-Esmeraldo-like*. Os asteriscos embaixo de cada nucleotídeo alinhado indica que esses são idênticos para ambos os alelos. Já os nucleotídeos destacados em amarelo correspondem àqueles em que não há identidade entre os nucleotídeos alinhados dos alelos.

III. Identidade entre as sequências de aminoácidos codificados pelos alelos de *otutc*, identificação do domínio OTU e do sítio catalítico

Os alelos *otutc_S* e *otutc_P* codificam para um produto de 264 aminoácidos, como consta da plataforma TryTripDB. Por intermédio do alinhamento das sequências de aminoácidos codificadas pelos alelos *otutc_S* e *otutc_P*, obteve-se que os ambas as sequências primárias possuem 2 % de polimorfismo entre si, conferindo às duas 98 % de identidade. Concomitantemente, a partir da plataforma UniProtKB, obteve-se que tanto o alelo *otutc_S* quanto o alelo *otutc_P* possuem domínio OTU constituído por 200 aminoácidos entre as posições 65 – 264 da sequência de aminoácidos e tríade catalítica constituída por resídeos de aspartato, cisteína e histidina localizados, respectivamente, nas posições 73, 76 e 258 (**Figura 13**). Os três resíduos de aminoácidos componentes da tríade catalítica encontram-se dentro do domínio OTU tanto para o alelo *otutc_S* quanto para o alelo *otutc_P*. Em *OtuTc*, o domínio OTU alberga cinco dos seis polimorfismos presentes na sequência primária da proteína.

```
OtuTc_S      MTS[AH]DREMQM[AI]QSEIESVPLLSDPVEALSETCSLVKEFANSASILPKVL[SL]FASDN
OtuTc_P      MTS[AH]DREMQM[AI]QSEIESVPLLSDPVEALSETCSLVKEFANSASILPKVL[SL]FASDN
***.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

OtuTc_S      DDRY[SG]IRYARRDGN[C]FFRCVVFSLLESMLGDNELTARYLEQATELRTKLI[EDY]GDFVED
OtuTc_P      DDRY[SG]IRYARRDGN[C]FFRCVVFSLLESMLGDSELTARYLEQATELRTKLI[EDY]GDFVED
*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

OtuTc_S      FC[AAI]AVIR[Q]IESGGCTTSEELYALATSHDSEYVIYFYRYAVSNYIRGHKDDFLPFV[M]G
OtuTc_P      FC[AAI]AVIR[Q]IESGGCTTSEELYALATSHDSEYVIYFYRYAVSNYIRGHKDDFLPFV[M]G
**.*.*****.*.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

OtuTc_S      LNYENVEDFCRAEVD[AV]SSES[DN]VQVAFARCFQ[K]IVVEYLDG[SV]GTR[TR]RHSFSGDSS
OtuTc_P      LNYENVEDFCRAEVD[AV]SSES[DN]VQVAFARCFQ[K]IVVEYLDG[SV]GTR[TR]RHSFSGDSS
*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

OtuTc_S      DTGDNT[SL]VVTLLYRPGHYD[LL]YK
OtuTc_P      CTGDNT[SL]VVTLLYRPGHYD[LL]YK
*****.*****.*****.*****.*****
```

Figura 13. Alinhamento das sequências de aminoácidos codificadas pelos alelos *otutc_S* e *otutc_P*. *otutc_S*: alelo *Esmeraldo-like*; *otutc_P*: alelo *Non-Esmeraldo-like*. Os asteriscos correspondem a aminoácidos que possuem identidade entre si para ambos os alelos. Os que não possuem identidade entre si para ambos os alelos encontram-se destacados em verde, roxo e vermelho. Os destacados em verde correspondem a aminoácidos que compartilham de fortes propriedades similares, ao passo que os em roxo compartilham de fracas propriedades similares. O destacado em vermelho corresponde a nenhuma propriedade bioquímica similar. Em azul, encontra-

se destacado o domínio OTU. Em cinza, encontra-se destacado os resíduos de aminoácido que compõem a tríade catalítica: D (aspartato), C (cisteína) e H (histidina).

Análise *in silico* da proteína OtuTc

Tendo em vista que o alelo clonado em pET19b correspondeu ao alelo *Esmeraldo-like* (Figura 20), procedeu-se à uma análise *in silico* de seu produto de expressão OtuTc. Assim, obteve-se que OtuTc é uma proteína de 264 resíduos de aminoácidos, cuja massa molecular corresponde a 29 kDa e apresenta ponto isolétrico teórico de 4,52. A protease, também, não possui qualquer domínio transmembrana, tampouco sítio de clivagem para peptídeo-sinal. No que tange a modificações pós-traducionais, não apresenta qualquer sítio para N-glicosilação, mas possui os sítios nas posições para O-glicosilação (Figuras 14, 15, 16, 17 e 18).

ProtParam

User-provided sequence:

```
10      20      30      40      50      60
MTSTAHDRM QMAIIQSEIE SVPLLSDPVE ALSETCSLVK EFANSASILP KVLSLFASDN

70      80      90      100     110     120
DDRYSGIRYA RRDGNCFFRC VVFSLLSML GDSELTARYL EQATELRTKL IEDYGFVED

130     140     150     160     170     180
FCEAAIAVIH QIESGGCTTS EELYALATSH DSEYVIYFYR YAVSNYIRGH KDFLFPVVG

190     200     210     220     230     240
LNYENVEDFC RAEVDAVSSE SDNVQVVAFA RCFQLKIVVE YLDGSGVTRT TRHSFSGDSS

250     260
GTGDNTSLV TLLYRPGHYD LLYK
```

[References](#) and [documentation](#) are available.

Number of amino acids: 264

Molecular weight: 29620.08

Theoretical pI: 4.52

Figura 14. Propriedades físico-químicas da proteína OtuTc codificada pelo alelo *Esmeraldo-like*. Imagem obtida do programa ProtParam.

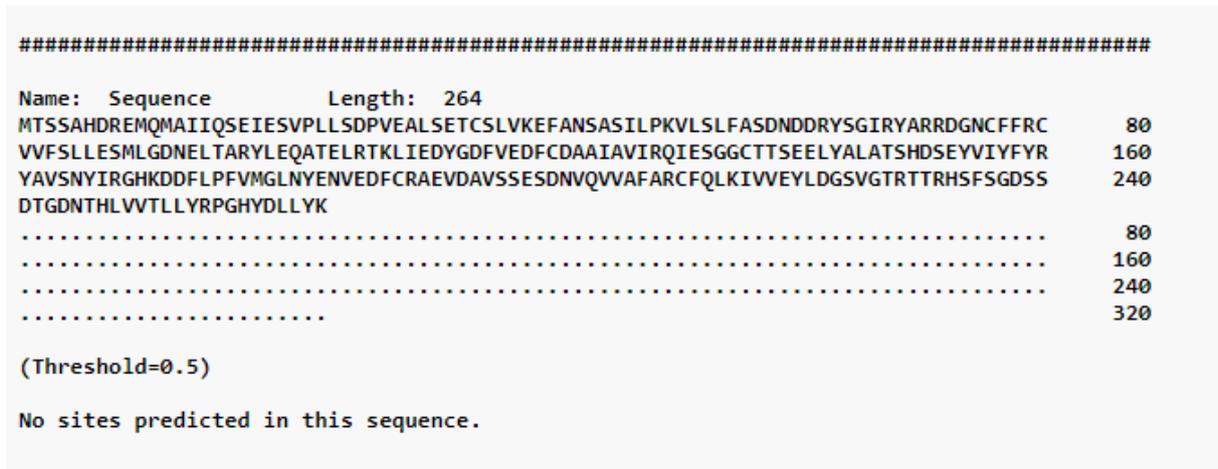


Figura 17. Gráfico mostrando a ausência de motivos de N-glicosilação na proteína OtuTc codificada pelo alelo *Esmeraldo-like*. Imagem obtida do programa NetNGlyc 1.0.

SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	108	108	0.196876	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	134	134	0.249748	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	138	138	0.127776	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	139	139	0.142751	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	140	140	0.516715	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	148	148	0.124127	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	149	149	0.0791899	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	152	152	0.0405841	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	164	164	0.125132	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	198	198	0.0647013	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	199	199	0.0304381	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	201	201	0.0345334	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	225	225	0.102911	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	228	228	0.184618	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	230	230	0.352488	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	231	231	0.540677	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	234	234	0.753467	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	236	236	0.614645	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	239	239	0.486746	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	240	240	0.317837	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	242	242	0.107911	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	246	246	0.0735502	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	251	251	0.124967	.	.	

Figura 18. Gráfico mostrando possíveis resíduos de aminoácidos para O-glicosilação na proteína OtuTc codificada pelo alelo *Esmeraldo-like*. Imagem obtida do programa NetOGlyc 4.0.

Clonagem do gene *otutc* no vetor de expressão pET19b

A partir da digestão dos plasmídeos TOPO e pET19b com as enzimas de restrição *SlaI* e *BamHI*, constatou-se, por análise eletroforética, que a dupla digestão liberou tanto o inserto *otutc* do vetor TOPO quanto levou à linearização do vetor pET19b, disponibilizando seu sítio múltiplo de clonagem. A liberação do inserto a partir de TOPO foi verificada mediante o aparecimento de uma banda, no gel, entre 650 e 850 bp (**Figura 19**). Tendo em vista que a sequência de *otutc* para ambos os alelos, em sua anotação no genoma, possui 795 bp, inferiu-se que essa banda corresponde justamente à sequência de *otutc*. A confirmação, contudo, deu-se mediante o sequenciamento do sítio de clonagem da preparação plasmidial *otutc*_pET19b e seu alinhamento com a sequência para ambos os alelos de *otutc* (**Figura 20**).

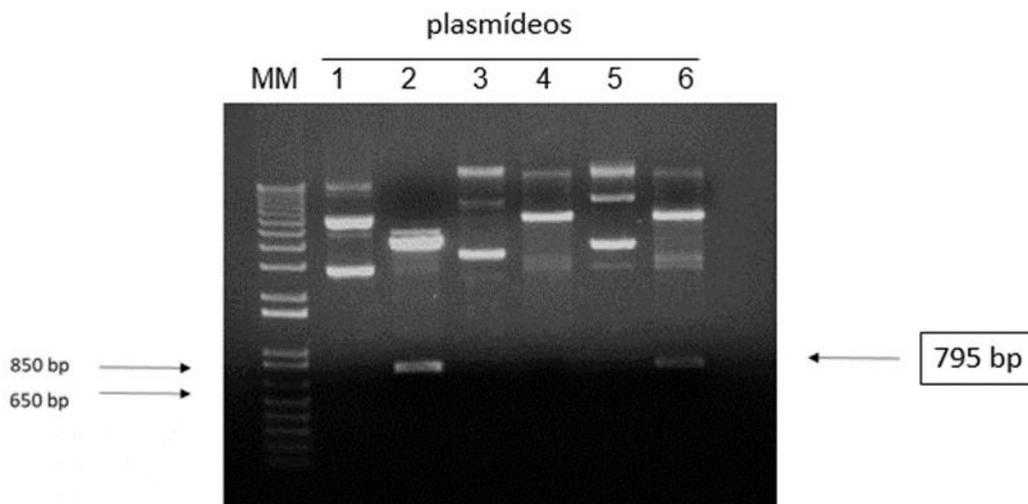


Figura 19. Perfil eletroforético das digestões dos vetores TOPO e pET19b com as enzimas *SlaI* e *BamHI* para clonagem de *otutc*. Gel de agarose 0,8 %. **MM** (Marcador Molecular): 1 Kb plus DNA ladder Invitrogen®; **(1)**: plasmídeo TOPO não-linearizado; **(2)**: plasmídeo TOPO digerido com *SlaI* e *BamHI*; **(3)**: plasmídeo pET19b não-linearizado; **(4)**: plasmídeo pET19b linearizado com *SlaI* e *BamHI*; **(5)**: plasmídeo pET19b com *otutc* clonado em sítio múltiplo de clonagem; **(6)**: plasmídeo pET19b com *otutc* clonado em seu sítio múltiplo de clonagem, porém digerido com *SlaI* e *BamHI*. As setas em preto indicam, respectivamente, o tamanho dos fragmentos de referência do marcador molecular (650 bp e 850 bp) e do fragmento de *otutc* correspondente a 795 bp.

```
otutc_seq      ATGACTTCCTCCGCCCATGACAGGGAGATGCAGATGGCGATCATTCAGAGCGAAATCGAG
otutc_S       ATGACTTCCTCCGCCCATGACAGGGAGATGCAGATGGCGATCATTCAGAGCGAAATCGAG
otutc_P       ATGACTTCCACCGCCCATGACAGGGAGATGCAGATGGCGATCATTCAGAGCGAAATCGAG
*****

otutc_seq      TCGGTACCGCTTCTTAGTGATCCCGTAGAGGCGCTGTCGGAGACATGTAGTCTCGTGAAG
otutc_S       TCGGTACCGCTTCTTAGTGATCCCGTAGAGGCGCTGTCGGAGACATGTAGTCTCGTGAAG
otutc_P       TCGGTACCGCTTCTTAGTGATCCCGTGAGGCGCTGTCGGAGACATGTAGTCTCGTGAAG
*****

otutc_seq      GAATTTGCCAATAGTGCATCGATTTTGCCAAAAGTACTTTTCGCTTTTTGCGTCCGACAAT
otutc_S       GAATTTGCCAATAGTGCATCGATTTTGCCAAAAGTACTTTTCGCTTTTTGCGTCCGACAAT
otutc_P       GAATTTGCCAATAGTGCATCGATTTTGCCAAAAGTACTTTTCGCTTTTTGCGTCCGACAAT
*****

otutc_seq      GACGACCGCTACAGTGGCATCCGGTATGCACGACGGGATGGGAACTGTTTCTTCCGCTGC
otutc_S       GACGACCGCTACAGTGGCATCCGGTATGCACGACGGGATGGGAACTGTTTCTTCCGCTGC
otutc_P       GACGACCGCTACAGTGGCATCCGGTATGCACGACGGGATGGGAACTGTTTCTTCCGCTGC
*****

otutc_seq      GTTGTATTTTCTCTGCTGGAAAGTATGCTTGGCGATAACGAGCTGACGGCGAGGTACTTG
otutc_S       GTTGTATTTTCTCTGCTGGAAAGTATGCTTGGCGATAACGAGCTGACGGCGAGGTACTTG
otutc_P       GTTGTATTTTCTCTGCTGGAAAGTATGCTTGGCGATAACGAGCTGACGGCGAGGTACTTG
*****

otutc_seq      GAACAGGCCACAGAAACTGCGCACGAAGCTCATTGAGGACTACGGTGATTTTGTGGAGGAC
otutc_S       GAACAGGCCACAGAAACTGCGCACGAAGCTCATTGAGGACTACGGTGATTTTGTGGAGGAC
otutc_P       GAACAGGCCACAGAAACTGCGCACGAAGCTCATTGAGGACTACGGTGATTTTGTGGAGGAC
*****

otutc_seq      TTCTGCGACCGCGCGATTGCTGTGATTCGCCAAATTGAGTCTGGAGGCTGCACGACGTCG
otutc_S       TTCTGCGACCGCGCGATTGCTGTGATTCGCCAAATTGAGTCTGGAGGCTGCACGACGTCG
otutc_P       TTCTGCGAACGCGCGATTGCTGTGATCCGCCAAATTGAGTCTGGAGGCTGCACGACGTCG
*****

otutc_seq      GAGGAGCTGTATGCACTGGCGACCTCGCATGATTCCGAGTACGTGATTTACTTCTACCGC
otutc_S       GAGGAGCTGTATGCACTGGCGACCTCGCATGATTCCGAGTACGTGATTTACTTCTACCGC
otutc_P       GAGGAGCTGTATGCACTGGCGACCTCGCATGATTCCGAGTACGTGATTTACTTCTACCGC
*****

otutc_seq      TACGCTGTTTCAAATTACAT
otutc_S       TACGCTGTTTCAAATTACAT
otutc_P       TACGCTGTTTCAAATTACAT
*****
```

Figura 20. Alinhamento de 500 bp da sequência clonada de *otutc* (*otutc_pET19b*) com os alelos *otutc_S* e *otutc_P*. *otutc_seq*: *otutc_pET19b* sequenciado; *otutc_S*: alelo *Esmeraldo-like*; *otutc_P*: alelo *Non-Esmeraldo-like*. Os nucleotídeos destacados em azul correspondem àqueles em que houve identidade com o fragmento sequenciado. Já os nucleotídeos destacados em verde correspondem àqueles em que não houve identidade com o fragmento sequenciado.

O alinhamento da sequência clonada em pET19b (*otutc_pET19b*) com os alelos *otutc_S* e *otutc_P* mostra que houve identidade de 100 % entre a sequência de *otutc_pET19b* e *otutc_S*. Contrariamente, seis polimorfismos foram observados entre *otutc_pET19b* e *otutc_P*, resultando em apenas 98 % de identidade. Logo, o sequenciamento sugere que o alelo clonado em pET19b corresponde ao alelo *Esmeraldo-like*.

Confirmação da clonagem por PCR de colônia

No sentido de confirmar a clonagem do inserto *otutc* no vetor de expressão pET19b, sete colônias randomicamente selecionadas por *screening blue-white* e submetidas a PCR de colônia foram analisadas por eletroforese. Constatou-se que apenas duas colônias, C1 e C5, foram positivas, amplificando dois amplicons entre 650 e 850 bp (**Figura 21**). Todas as demais, incluindo os grupos controles, como esperado, foram negativos.

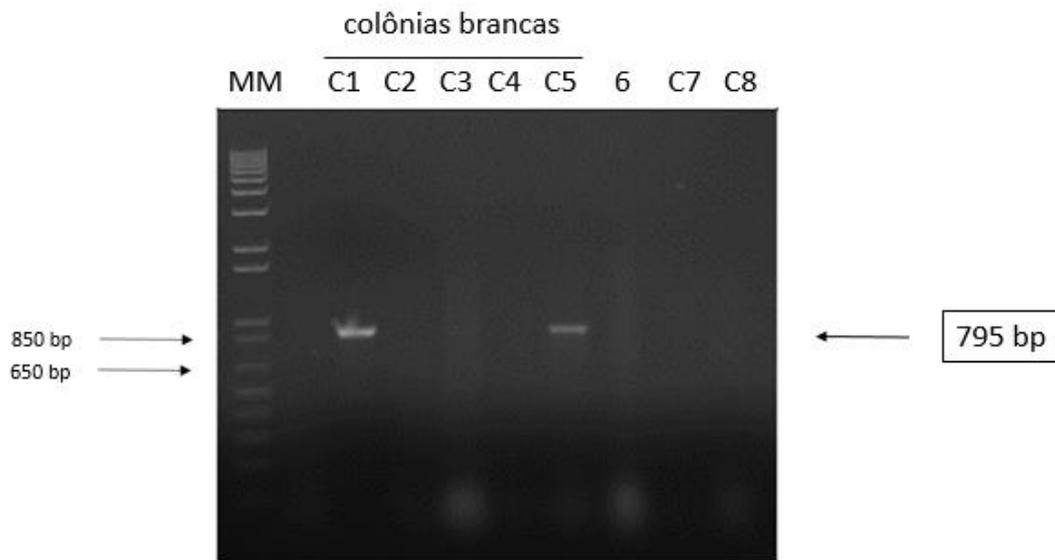


Figura 21. Perfil eletroforético da PCR de colônia de *E. coli* (DH5 α) transformadas com o plasmídeo *otutc_pET19b*. Gel de agarose 0,8 %. **MM** (Marcador Molecular): 1 Kb plus DNA ladder Invitrogen®; **C1-C5**: colônias brancas randomicamente selecionadas; **6**: sem DNA genômico; **C7**: colônia azul (controle); **C8**: pET19b vazio (controle). As setas, em preto, indicam, respectivamente, os fragmentos de referência do marcador molecular (850 bp e 650 bp) e o amplicon *otutc* (795 bp).

Indução, Expressão e Purificação de rOtuTc

A fim de averiguar em qual fração OtuTc seria expressa, seis colônias foram randomicamente selecionadas para indução: uma contendo pET19b vazio e as outras cinco contendo o inserto *otutc*, proveniente de C5, clonado no vetor pET19b (*otutc_pET19b*). Na indução a 37 °C, com 1 mM de IPTG e 0,2 % de L-arabinose, rOtuTc foi expressa na fração insolúvel (**Figura 22**). Porém, quando induzida a 20 °C, mantendo-se as mesmas concentrações de IPTG e L-arabinose, rOtuTc foi expressa na fração solúvel (**Figura 23**).

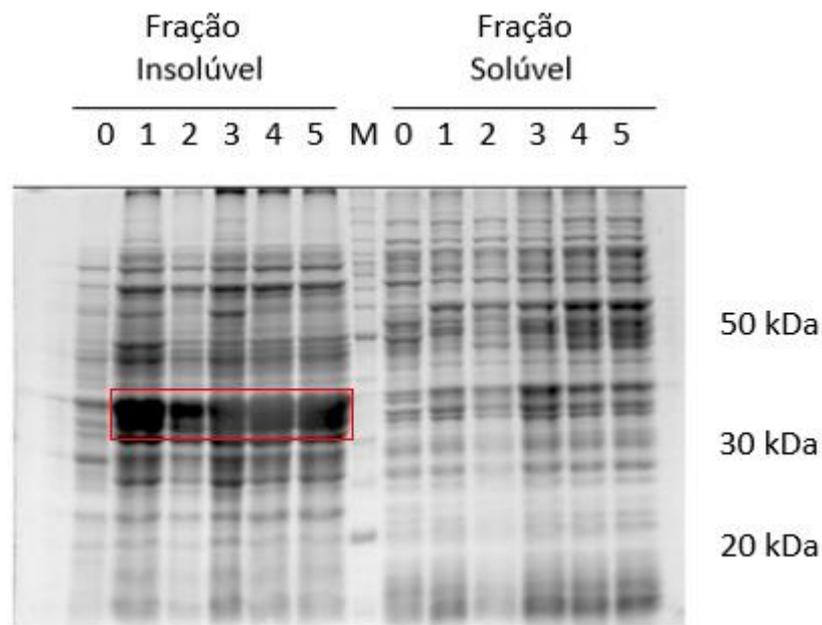


Figura 22. Perfil eletroforético das frações solúvel e insolúvel de proteínas de inóculos BL21-AI transformados com *otutc_pET19b* e pET19b vazio induzidos a 37 °C, por 5 h e a 1 mM de IPTG e 0,2 % de L-arabinose. Gel de poliacrilamida (SDS/PAGE) 12 % corado com azul de comassie. **M** (marcador molecular, kDa). **0-5**: extratos proteicos fracionados (solúvel e insolúvel) de seis diferentes induções. **0** (pET19b vazio, controle), **1-5** (*otutc_pET19b*). O retângulo horizontal, em vermelho, identifica a suposta resolução de rOtuTc.

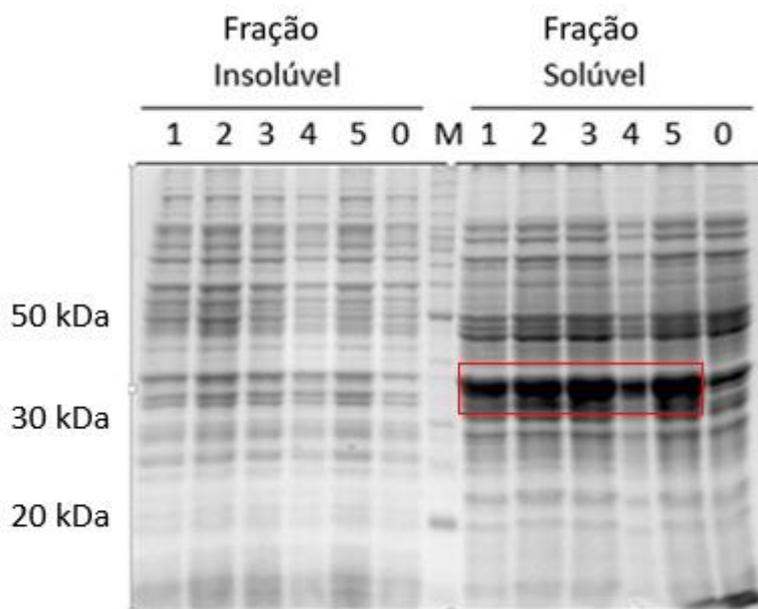


Figura 23. Perfil eletroforético das frações solúvel e insolúvel de proteínas de inóculos BL21-AI transformados com *otutc_pET19b* e *pET19b* vazio induzidos a 20 °C, por 5 h e a 1 mM de IPTG e 0,2 % de L-arabinose. Gel de poliacrilamida (SDS/PAGE) 12 % corado com azul de comassie. **M** (marcador molecular, kDa). **0-5**: extratos proteicos fracionados (solúvel e insolúvel) de seis diferentes induções. **0** (*pET19b* vazio, controle), **1-5** (*otutc_pET19b*). O retângulo horizontal, em vermelho, identifica a suposta resolução de rOtuTc.

Tendo em vista que na indução a 20 °C, por 5 h, sob 1 mM de IPTG e 0,2 % de L-arabinose, obteve-se rOtuTc na fração solúvel, esta indução foi novamente reproduzida, em maior escala, a partir do inóculo proveniente da transformação e plaqueamento de linhagem BL21-AI transformada com *otutc_pET19b*. Assim, a otubaína recombinante de *T. cruzi* (rOtuTc) teve sua expressão induzida sob as mesmas condições já citadas, tendo sido melhor eluída em 50 mM de imidazol a partir da fração solúvel (**Figura 24**).

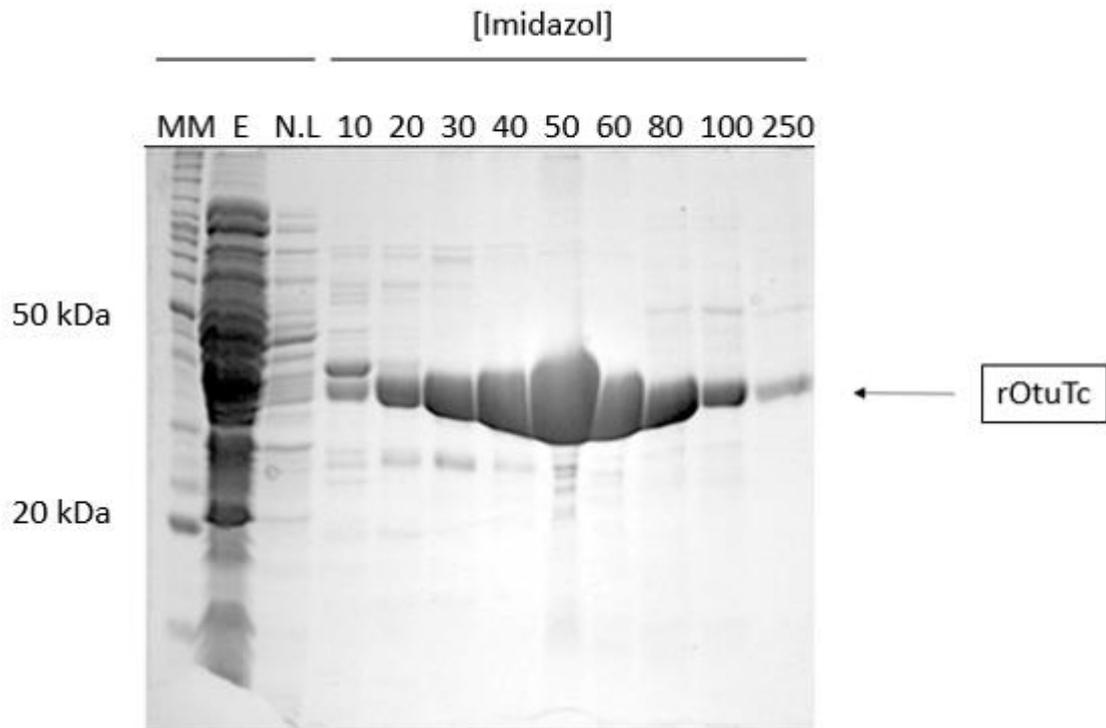


Figura 25. Análise da purificação de rOtuTc por cromatografia de afinidade a partir da fração solúvel de BL21-AI transformada com *otutc_pET19b* induzida a 20 °C, por 5 h, com 1 mM de IPTG e 0,2 % de L-arabinose. Gel de poliacrilamida (SDS/PAGE) 12 %c corado com azul de comassie. **MM (marcador molecular, kDa); **E**: extrato toal de BL21-AI não transformada; **N.L**: não-ligado (fluxo recolhido após a primeira lavagem sem imidazol); **[10-250]**: diferentes concentrações de imidazol em mM.**

Confirmação de expressão da otubaína recombinante (rOtuTc)

Por *Western blotting*, obteve-se que a proteína recombinante purificada na coluna de Ni²⁺-agarose consistiu em rOtuTc, uma vez que essa foi expressa carregando uma cauda de histidina (His), a qual é marcada por anticorpo anti-His (Figura 25).

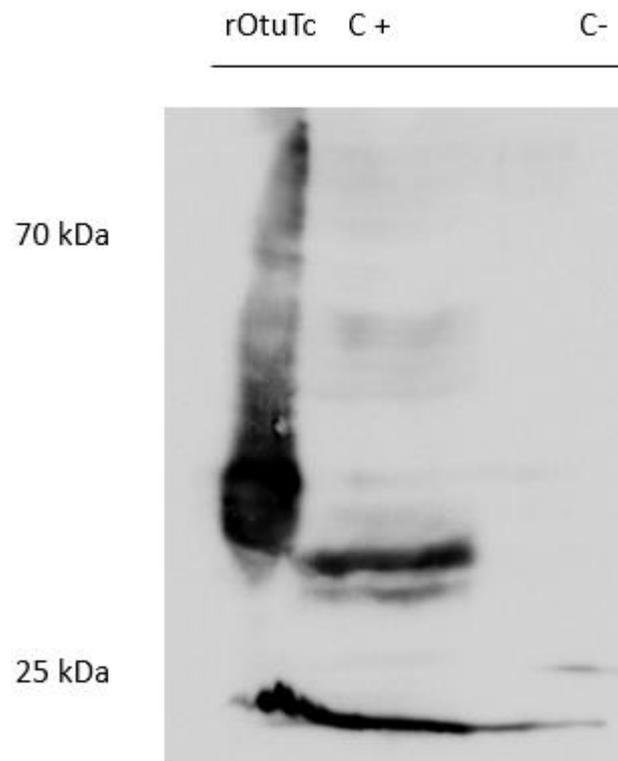


Figura 25. Marcação da otubaína recombinante de *T. cruzi* a partir do anticorpo anti-His. rOtuTc: proteína recombinante (29 kDa). **C+** (controle positivo): antígeno 5. **C-** (controle negativo): fração solúvel de *E. coli* transformada com plasmídeo vazio.

Avaliação enzimática de rOtuTc

rOtuTc foi avaliada quanto à sua atividade enzimática para o substrato tetra-ubiquitina de origem humana (K48). OtuTc é uma protease putativa do tipo otubaína em *T. cruzi*. Assim, seu papel de desubiquitinase foi testado para esse substrato tanto na presença do agente redutor DTT quanto em sua ausência.

A reação de coloração com prata mostrou que, de fato, rOtuTc cliva o substrato tetra-ubiquitina humana (K48). Na ausência do agente redutor DTT, o substrato tetra-ubiquitina é clivado à tri, di e mono-ubiquitina. Contudo, na presença do agente redutor, o substrato é completamente clivado à mono-ubiquitina. Logo, tem-se que a rOtuTc, além de expressa na fração solúvel, foi, também, expressa enzimaticamente ativa, apresentando atividade ótima para o substrato tetra-ubiquitina em pH neutro e na presença de DTT (**Figura**).

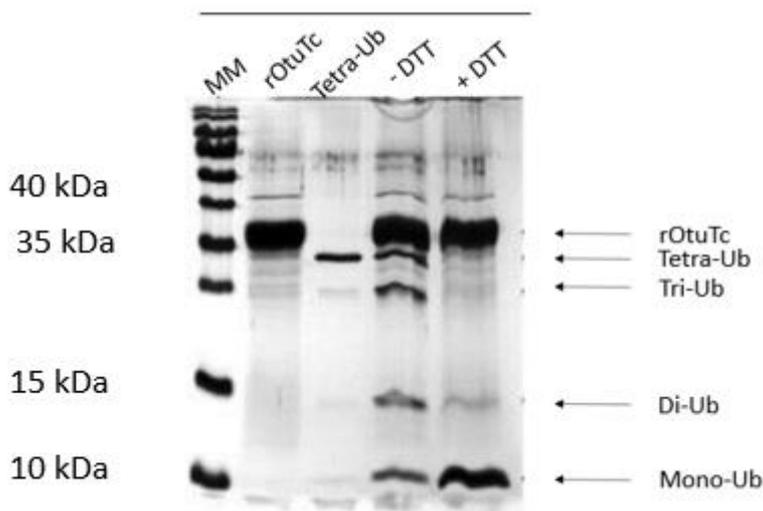


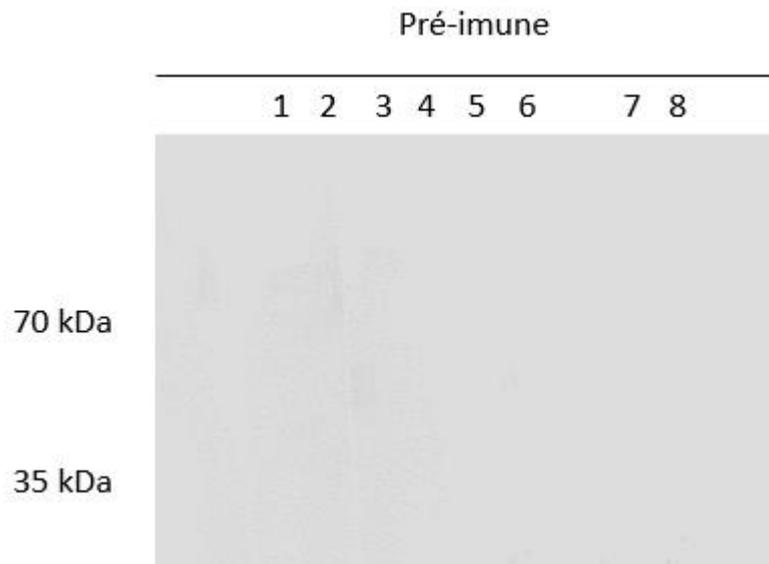
Figura 26. Avaliação da atividade de rOtuTc sobre o substrato tetra-ubiquitina humana (K48).

Gel de poliacrilamida 12 % corado com prata. MM (marcador molecular, kDa; Thermo Protein Prestained) BenchMark®; rOtuTc: otubaína recombinante de *T. cruzi*; Tetra-Ub: tetra-ubiquitina; Tri-Ub: tri-ubiquitina; Di-Ub: di-ubiquitina; Mono-Ub: mono-ubiquitina; DTT: ditioneitol; + DTT: presença de DTT; - DTT: ausência de DTT.

Produção de anticorpos policlonais anti-rOtuTc

Uma vez obtido rOtuTc purificada e sua consequente imunização em quatro camundongos, um ensaio de *Western blotting* foi executado a fim de averiguar a produção de anticorpos policlonais anti-rOtuTc. O experimento, utilizando tanto dos soros obtidos antes da imunização (pré-ímenes) quanto os soros pós-ciclo de imunizações (ímenes), demonstrou a obtenção de anti-rOtuTc para os quatro camundongos imunizados. Contudo, as afinidades pelo antígeno rOtuTc variou entre os anticorpos de obtidos de cada camundongo (**Figura 27**).

A



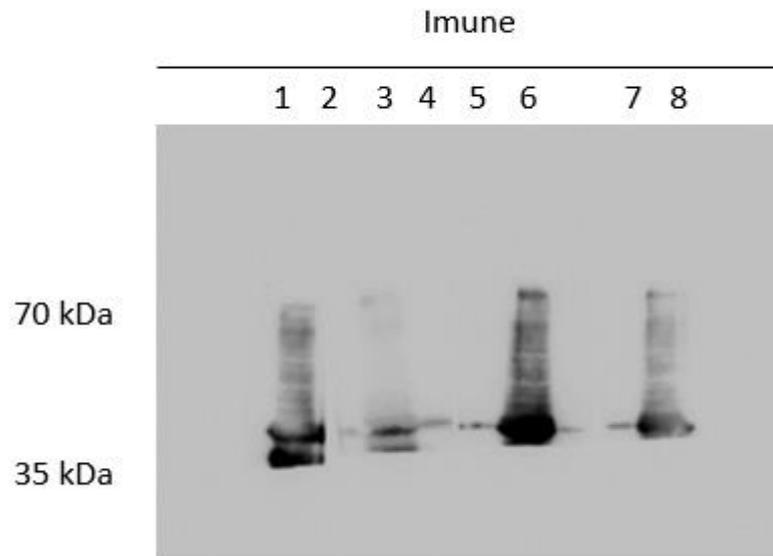
B

Figura 27. Análise por *Western blotting* dos soros pré-imune e imune dos camundongos imunizados com rOtuTc. A: soro pré-imune; **B:** soro imune. **1, 3 6, 8:** rOtuTc. **2, 4, 5, 7:** Extratos proteicos de *T. cruzi* da linhagem CL Brener. As amostras foram resolvidas em gel de poliacrilamida 12 %. Então, extrato e proteína recombinante foram transferidos do gel para membrana de nitrocelulose, a qual foi bloqueada com leite 1 %, separadas em quatro tiras e cada uma inoculada por 24 h com os soros pré-imune e imune, respectivamente. Por fim, foram inoculadas com anticorpo secundário antimouse por 1 h. As membranas foram analisadas por quimioluminescência a partir de peroxidase.

Transcrição *in vitro* do sgRNA (sgRNA_ otutc_412_revcom)

A partir de um oligonucleotídeo de 150 bp contendo a sequência de 20 nucleotídeos referente à sequência alvo, por transcrição *in vitro*, foi produzido o sgRNA_ otutc_412_revcom, o qual é específico para anelamento na posição 412 tanto do alelo *otutc_S* quanto do alelo *otutc_P* (Figura 28).

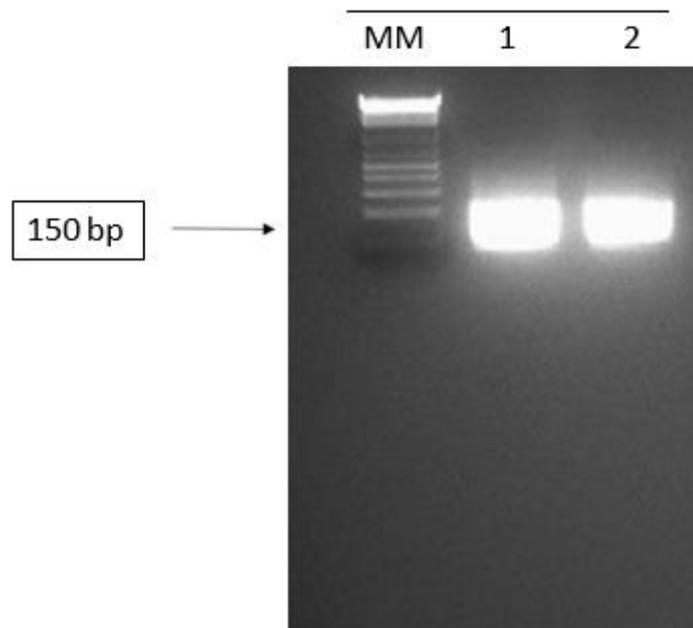


Figura 28. Perfil eletroforético de sgRNA_ otutc_412_revcom transcrito *in vitro*. Gel de agarose 1,5 %. **MM** (marcador molecular): 1 Kb plus. **1-2:** amostras transcritas *in vitro* de sgRNA_ otutc_412_revcom.

Construção do cassete *hx1_tub*

Os genes de resistência às marcas de seleção higromicina (*hph*), neomicina (*npt*), puromicina (*pac*) e blasticidina (*bsd*) foram amplificados por PCR (**Figura 29**). Paralelamente, as regiões intergênicas *hx1* e *tub*, provenientes, respectivamente, dos *loci* da proteína tubulina de *T. cruzi* e *Trypanosoma brucei* também foram igualmente amplificados (Figura 19). A análise do perfil eletroforético de ambas as PCRs atestam a amplificação de todas as sequências, com seus amplicons correspondendo, no gel, aos tamanhos preditos de 1.038 bp (*hph*), 816 bp (*npt*), 612 (*pac*), 411 (*bsd*), os quais correspondem aos tamanhos dos amplicons para os genes de resistência de cada marca de seleção somados com 12 bp provenientes de dois sítios de restrição.

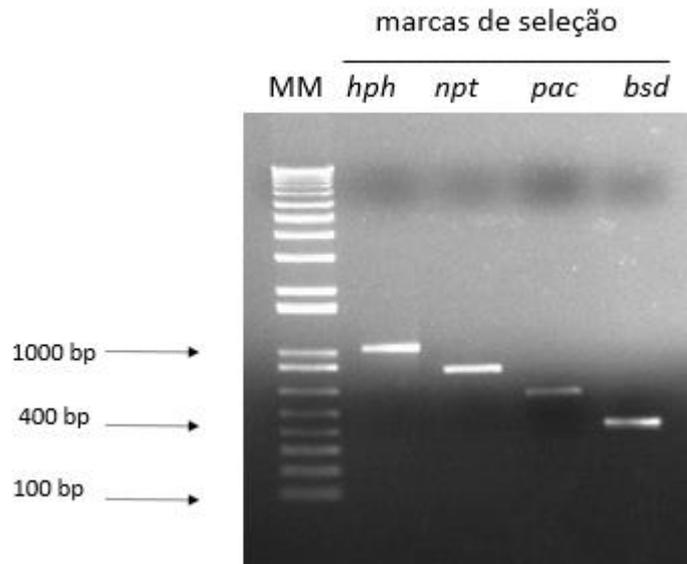


Figura 29. Perfil eletroforético dos genes de resistências às marcas de seleção. Gel de agarose 0,8 %. **MM** (marcador molecular): 1 Kb plus. ***hph***: 1026 bp; ***npt***: 804 bp; ***pac***: 600 bp; ***bsd***: 399 bp.

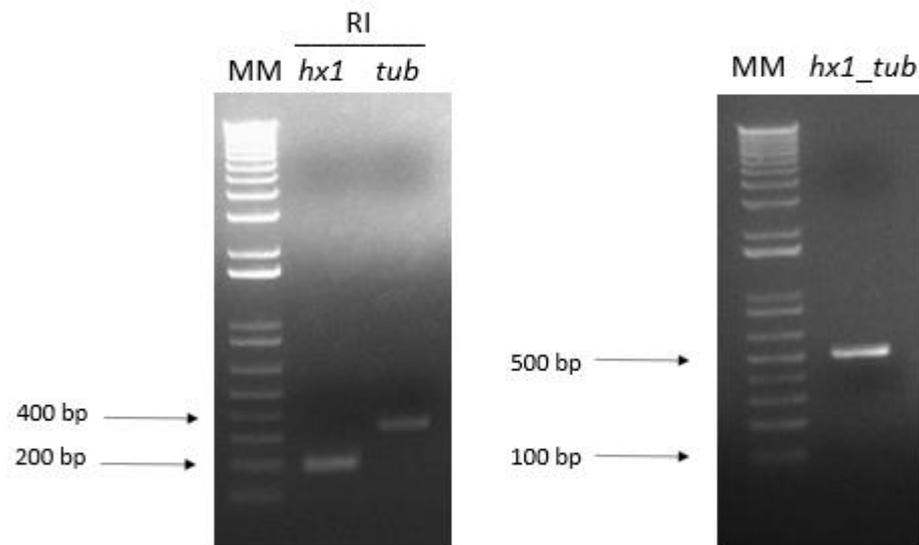


Figura 30. Perfil eletroforético das regiões intergênicas. Gel de agarose 0,8 %. **MM** (marcador molecular): 1 Kb plus. **hx1**: 193 bp; **tub**: 326 bp; **hx1_tub**: 519 bp. **RI**: região intergênica.

A partir dos transformantes *hx1_tub_pGEM* positivos, dez colônias foram selecionadas: sete colônias com fenótipo branco e três com o fenótipo azul. Dentre as três selecionadas que exibiram fenótipo azul, uma, chamada de “C”, constitui um transformante que internalizou o pGEM vazio. A análise eletroforética da PCR de colônia de *hx1_tub* mostra que a integração do inserto *hx1_tub* no sítio de clonagem não foi eficaz para todas as colônias, ainda que tenham exibido fenótipo branco. É o caso, por exemplo, das colônias C3 e C6. Por outro lado, as colônias C8 e C9, as quais exibiram fenótipo azul, não geraram um amplicon correspondente ao tamanho esperado do inserto *hx1_tub* (519 bp), o que vai ao encontro do princípio de *screening blue-white* (**Figura 30**). O amplicon na altura de 500 bp, da PCR de colônia de *hx1_tub_pGEM*, juntamente com a liberação do inserto de aproximadamente 500 bp (**Figura 31**), mostram, em conjunto, que o oligo *hx1_tub* foi clonado no vetor pGEM.

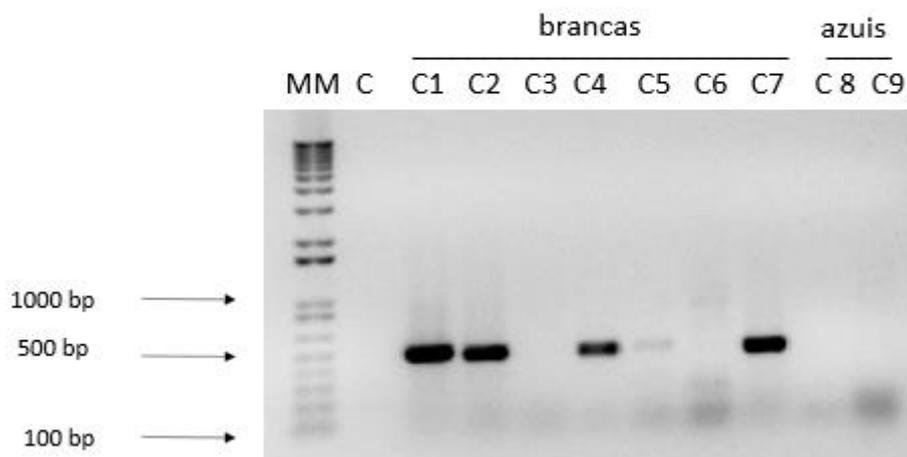


Figura 31. Perfil eletroforético da PCR de colônia do oligonucleotídeo *hx1_tub*. Gel de agarose 0,8 %. **MM** (marcador molecular): 1 Kb plus. **C**: colônia azul transformada com pGEM vazio (controle). **C1-C7**: colônias brancas. **C8-C9**: colônias azuis (controle). As setas pretas indicam o tamanho dos amplicons em pares bases (bp).

No sentido de reforçar o resultado obtido na PCR de colônia, uma digestão de *hx1_tub_pGEM* foi realizada utilizando a enzima de restrição *EcoRI*, de modo a linearizar o vetor pGEM e, ao mesmo tempo, liberar o inserto *hx1_tub* de 509 bp.

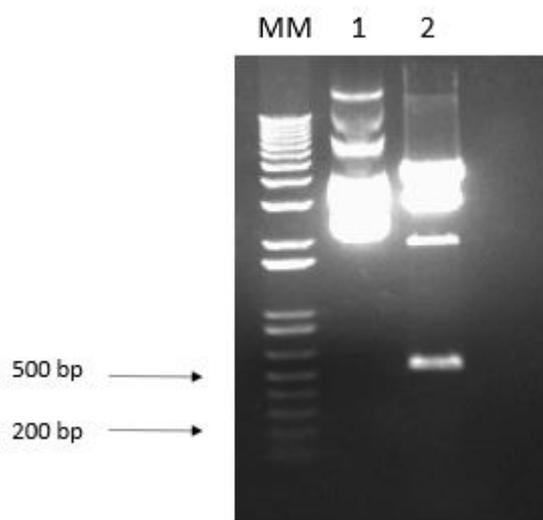


Figura 33. Perfil eletroforético da digestão do plasmídeo *hx1_tub_pGEM*. Gel de agarose 0,8 %. **MM** (marcador molecular): 1 Kb plus. **1**: *hx1_tub_pGEM* não-digerido. **2**: *hx1_tub_pGEM* parcialmente linearizado com *EcoRI*. As setas pretas indicam o tamanho dos amplicons em pares bases (bp).

O amplicon na altura de 500 bp (**Figura 33**), da PCR de colônia de *hx1_tub_pGEM*, juntamente com a liberação do inserto de aproximadamente 500 bp (**Figura 33**), da digestão incompleta de *hx1_tub_pGEM*, mostram, em conjunto, que o inserto clonado no vetor pGEM corresponde ao oligo *hx1_tub*, com o qual se construiu o cassete *ultra/otutc_hx1_hph_tub_otutc/ultra*.

Clonagem de *hph* em pGEM

A análise eletroforética da PCR de colônia de *hph_pGEM* mostra que todas as colônias brancas selecionadas foram positivas para a geração do amplicon *hph* (1038 bp) na altura de 1000 bp. Ademais, assim como na PCR de colônia para *hx1_tub_pGEM*, a única colônia azul selecionada também não foi positiva para a amplificação.

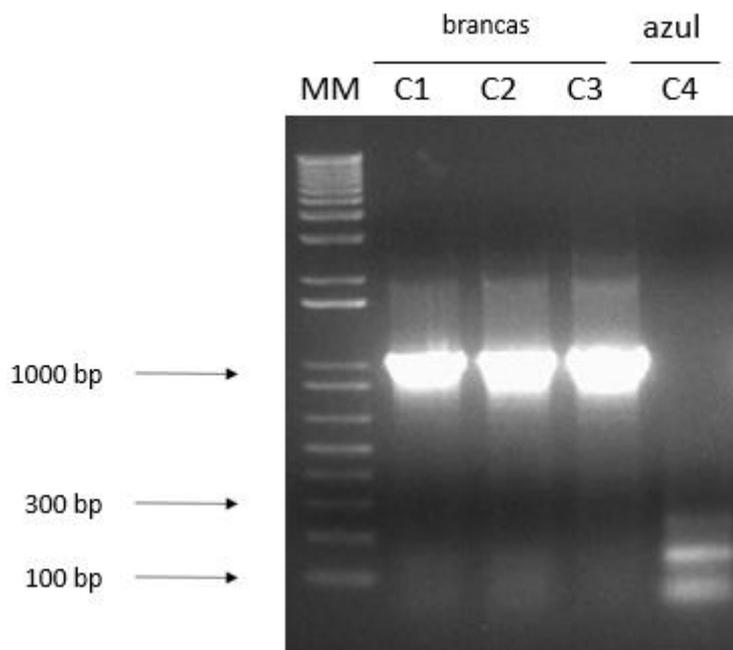


Figura 34. Perfil eletroforético da PCR de colônia do plasmídeo *hph_pGEM*. Gel de agarose 0,8 %. **MM** (marcador molecular): 1 Kb plus. **C1-C3**: colônias brancas **C4**: colônia azul. As setas pretas indicam o tamanho dos amplicons em pares bases (bp).

A análise eletroforética da PCR de colônia de *hph*_pGEM mostra que todas as colônias brancas selecionadas foram positivas para a geração do amplicon *hph* (1038 bp) na altura de 1000 bp (**Figura 34**). Ademais, assim como na PCR de colônia para *hx1_tub*_pGEM, a única colônia azul selecionada também não foi positiva para a amplificação (**Figura 34**).

Uma vez que a clonagem de *hph* no vetor pGEM foi eficaz e tendo em vista que tanto o cassete *hx1_tub* foi confeccionado quanto o *hph* clonado no vetor pGEM, foi possível a confecção do cassete *ultra/otutc_hx1_hph_tub_otutc/ultra*.

Construção do Cassete *ultra/otutc_hx1_hph_tub_otutc/ultra*

O plasmídeo resultante dessa ligação, *hx1_hph_tub*_pGEM foi transformada em *E. coli* (DH5 α) e os transformantes plaqueados em meio LB-ágar contendo ampicilina, X-gal e IPTG. As colônias resultantes foram, então selecionadas pelo método de *screening blue-white*. Dez colônias foram selecionadas: oito colônias exibindo fenótipo branca e duas exibindo fenótipo azul (**Figura 35**).

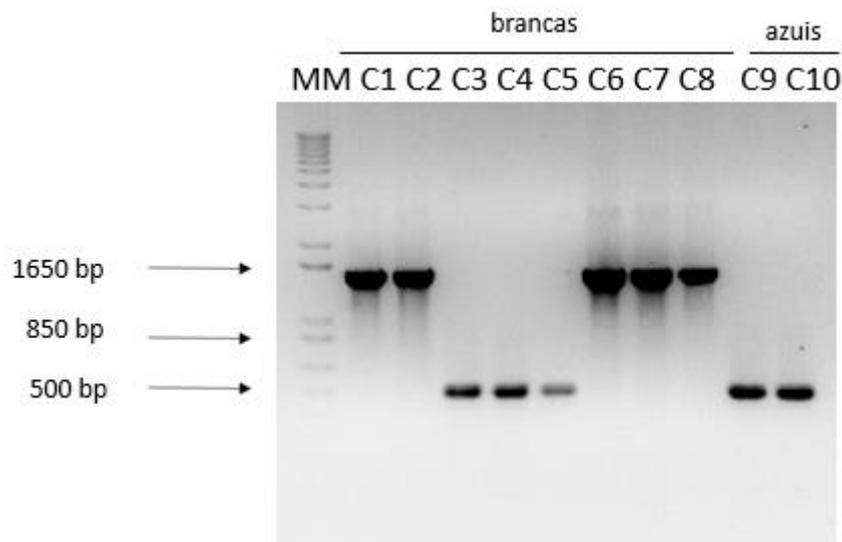


Figura 35. Perfil eletroforético da PCR de colônia do cassete *hx1_hph_tub*. Gel de agarose 0,8 %. **MM** (marcador molecular): 1 Kb plus. **C1-C8**: colônias brancas. **C9-C10**: colônias azuis (controle). As setas pretas indicam o tamanho dos amplicons em pares bases (bp).

A PCR de colônia oriunda dos transformantes que receberam o plasmídeo *hx1_hph_tub_pGEM* mostra que, das oito colônias brancas selecionadas, apenas cinco geraram um amplicon próximo à altura de 1650 bp, sendo esperado que o amplicon resultante da amplificação do cassete *hx1_hph_tub_pGEM* seja de 1.572 bp. As colônias de fenótipo branco C3, C4 e C5 reproduziram o mesmo padrão de banda das duas colônias azuis, gerando um amplicon aproximado de 500 bp, o qual corresponde exatamente ao amplicon da PCR de colônia de *hx1_tub*, que não possui o gene *hph* clonado em seu sítio ativo. Este resultado segure, portanto, que o cassete *hx1_hph_tub* clonado no vetor pGEM.

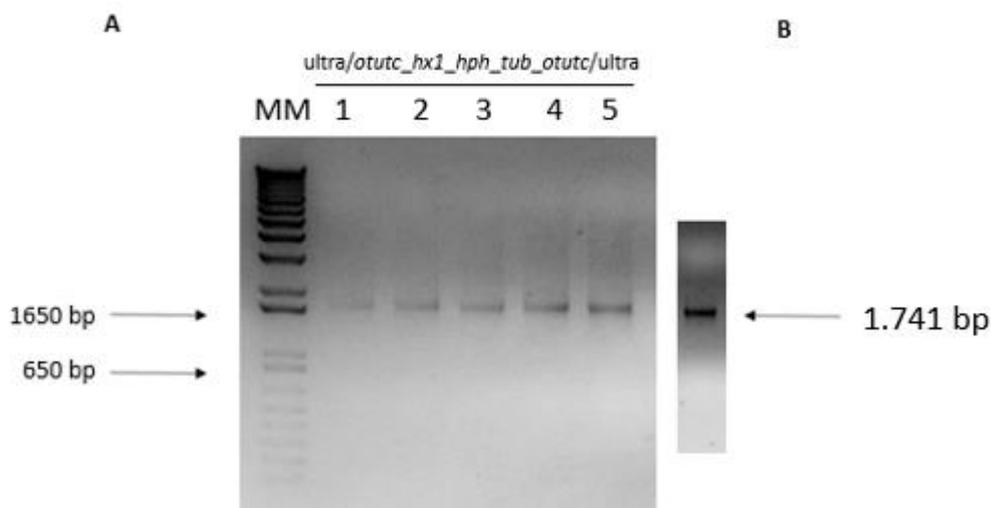


Figura 36. Perfil eletroforético da PCR de confecção do cassete *ultra/otutc_hx1_hph_tub_otutc/ultra* e posterior precipitação. Gel de agarose 0,8 %. MM (marcador molecular): 1 Kb plus. **A.** 1-5: PCR do cassete *ultra/otutc_hx1_hph_tub_otutc/ultra*. **B.** Precipitação, com acetato de sódio, das PCRs em A. As setas pretas indicam o tamanho dos amplicons em pares bases (bp).

A partir da análise eletroforética exibida em **A**, na figura 27, tem-se que o cassete foi gerado por PCR com seus amplicons correspondendo ao tamanho esperado (1741 bp). Por fim, a precipitação das cinco PCRs do cassete (Figura 35, B) permitiu sua concentração em 25 µg para a transfecção.

Transfecção e clonagem de epimastigotas de *T. cruzi* utilizando o cassete *ultra/otutc_hx1_hph_tub_otutc/ultra*

Uma vez confeccionado o cassete, este foi transfectado em epimastigotas de *T. cruzi*, linhagem CL Brener *luccas9*, juntamente com o RNA guia (sgRNA_otutc_412_revcom). Decorridas 24 h da transfecção, os parasitos transfectados foram submetidos à pressão seletiva para higromicina e clonados em placas de 24 poços. Duas semanas após a clonagem, porém, os parasitos transfectados não expandiram clonalmente, morrendo logo em seguida, o que impossibilitou sua contagem.

Nesse sentido, não foi possível a coleta de material para avaliar tanto a integração do cassete quanto alterações no fenótipo, como, por exemplo, a diminuição ou mesmo a ausência de OtuTc.

Citocalização de OtuTc nas diferentes formas morfológicas

A imunofluorescência das formas epimastigota, tripomastigota e amastigota revela que uma variação da concentração de OtuTc de acordo com a fase de vida do parasito (**Figura 37**). A quantidade de OtuTc em amastigotas é superior àquela em tripomastigota metacíclico, tripomastigota circulante e epimastigota (**Figura 38**). Este resultado está em consonância com o transcriptoma de *T. cruzi*, em que o mRNA de *otutc* está regulado positivamente para amastigotas que para as demais formas (**Figura 39**) (LI, YUAN *et al.*, 2016).

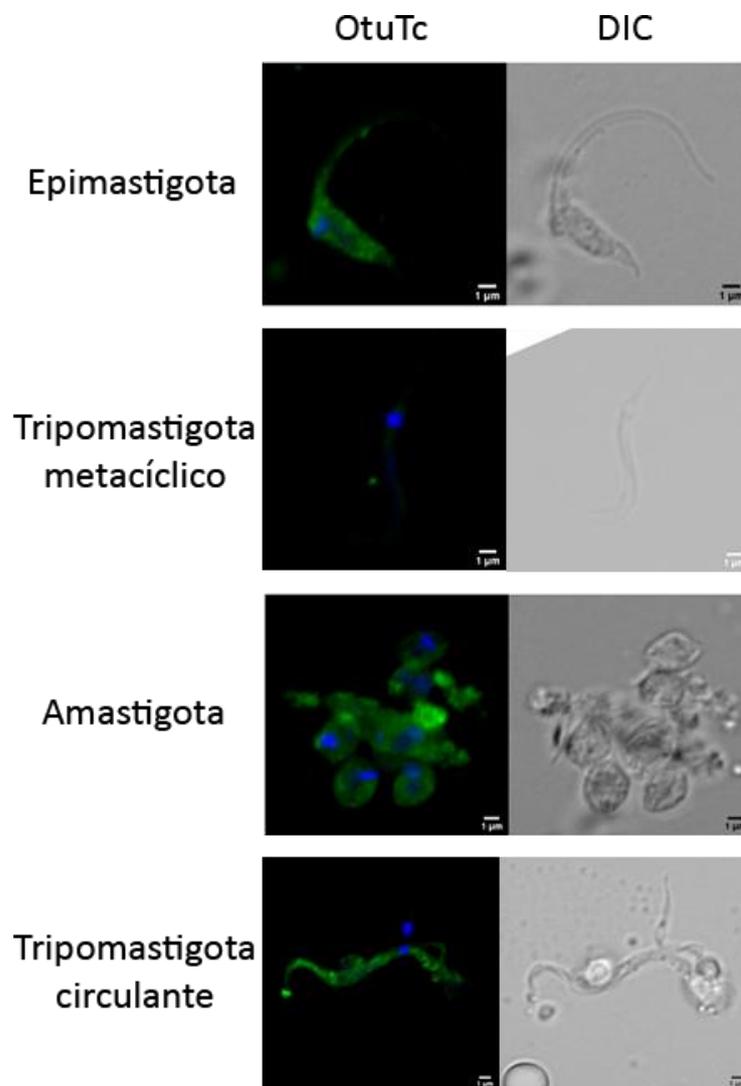


Figura 37. Microscopia confocal de parasitos com marcação para OtuTc nas formas epimastigota, tripomastigota metacíclico, tripomastigota e amastigota. Imunofluorescência realizada com soro imune para OtuTc (1:100) e anticorpo secundário goat anti-mouse IgG conjugado com Alexa Fluor 488 (1:2000) (verde). O cinetoplasto e o núcleo foram marcados com DAPI (azul). Imagens obtidas a partir da compactação de vários planos.

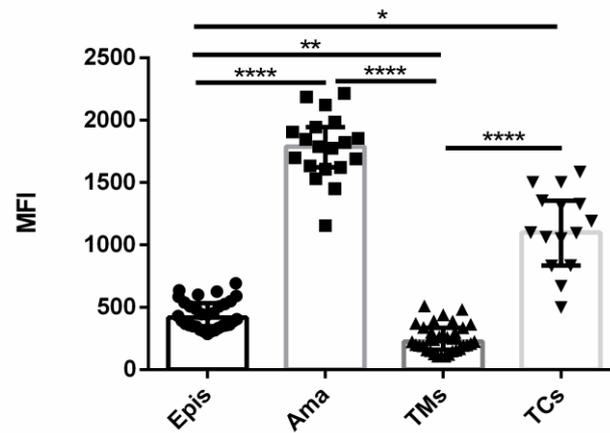


Figura 38. Gráfico de mensura da quantidade de OtuTc em cada fase celular. Epis: epimastigota. Ama: amastigota. TMs: tripomastigota metacíclico. TCs: tripomastigota circulantes.

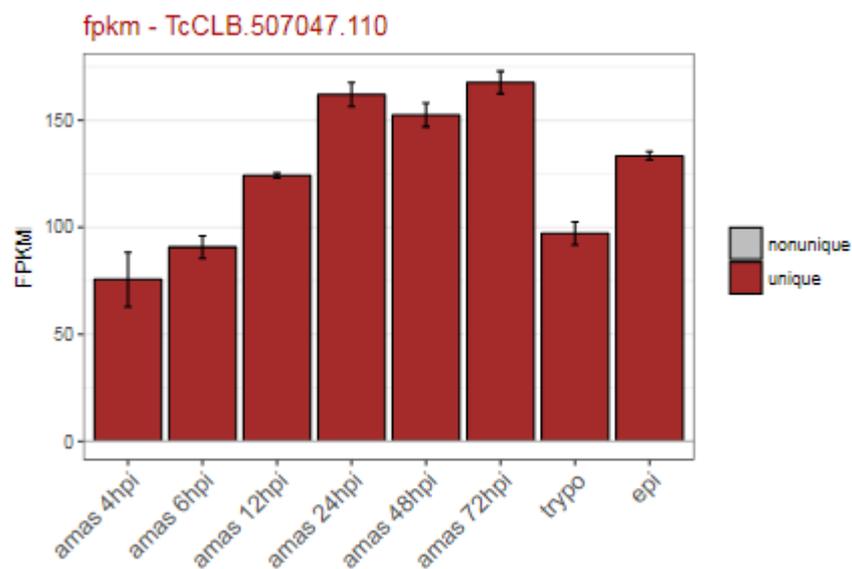


Figura 39. Gráfico de mensura dos transcritos de *otutc* (alelo *Esmeraldo-like*) em cada fase celular em diferentes intervalos de tempo. Epi: epimastigota. Amas: amastigota. Trypo: tripomastigotas. Imagem retirada de TriTrypsDB (<https://tritrypdb.org/tritrypdb/>).

Confecção do cassete *ultra/otutc_bsd_otutc/ultra*

Para obtenção do cassete *ultra/otutc_bsd_otutc/ultra*, foram executadas duas PCRs tendo ultrâmeros por iniciadores, gerando amplicons de 590 bp (**Figura 40**).

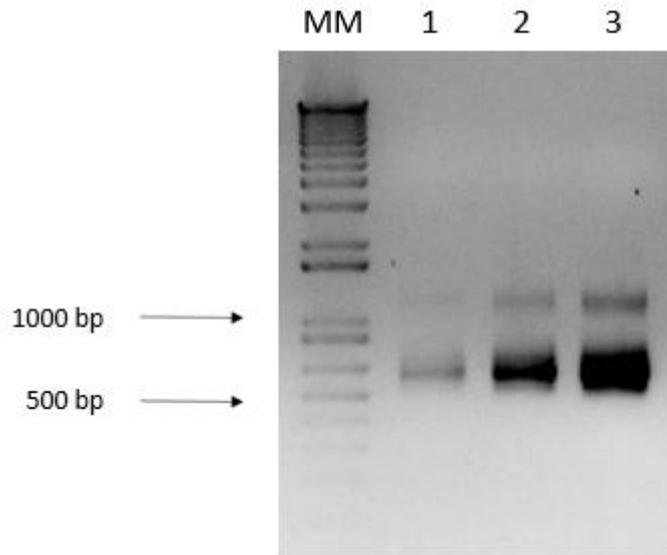


Figura 40. Perfil eletroforético da PCR de confecção do cassete *ultra/otutc_bsd_otutc/ultra* e posterior precipitação. Gel de agarose 0,8 %. **MM** (marcador molecular): 1 Kb plus. **1-2**: PCRs do cassete *ultra/otutc_bsd_otutc/ultra*. **3**: Precipitação, com acetato de sódio, das PCRs 1 e 2. As setas pretas indicam o tamanho dos fragmentos do marcador em pares bases (bp).

Transfecção e clonagem de epimastigotas de *T. cruzi* utilizando o cassete *ultra/otutc_bsd_otutc/ultra*

Decorridos seis semanas de pressão seletiva com antibiótico blasticidina, apenas os poços **B2**, **B6**, **D2**, **D4** e **D5** resultaram em clones resistentes na placa de vinte e quatro poços.

A análise eletroforética da PCR de confirmação (**Figura 41**) revela a amplificação do gene *bsd* para todos os clones e para os parasitos que restatram no frasco de cultura após a clonagem em placa de 24 poços. O gene *otutc*, porém, não foi amplificado para os clones B2 e D5. Já a amplificação do amplicon referente à integração do cassete ao *locus* de *otutc*, só é observado para os transfectados cultivados no frasco de cultura e para os clones B6 e B2. No que tange aos controles *otutc*, *bsd*, *bsd_pTREX* e *bsd_u*, estes tiveram por molde o genoma de epimastigotas da linhagem CL Brener *luccas9*. Neles, observa-se que o gene *otutc* foi amplificado, confirmando sua presença nesta linhagem de *T. cruzi*. Para *bsd_u*, referente a integração do cassete no *locus otutc*, não se observa nenhum amplicon, o que vai ao encontro do esperado no delineamento experimental, haja vista *T. cruzi* CL Brener *luccas9* não foi transfectado nem com o cassete nem com o sgRNA_ *otutc_412_revcom*. *bsd_pTREX*, por sua vez, enquadra-se como um controle do gene *bsd*.

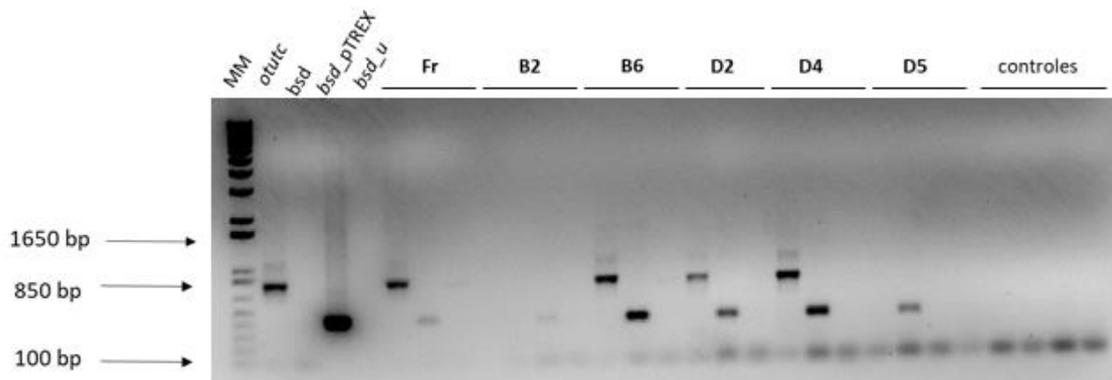


Figura 41. Perfil eletroforético da PCR de confirmação da deleção de *otutc* pelo cassete *ultra/otutc_bsd_otutc/ultra*. Gel de agarose 0,8 %. **MM** (marcador molecular): 1 Kb plus. **otutc**: gene *otutc* (controle LUCAS9); **bsd**: gene *bsd* (controle LUCAS9); **bsd_pTREX**: gene *bsd* de pTREX (controle); **bsd_u**: controle dos primers de confirmação. Fr(frasco): *otutc*, *bsd*, cassete. **B2**, **B6**, **D2**, **D4** e **D5** (clones): *otutc*, *bsd*, cassete. **Controles**: controle dos iniciadores. As setas pretas indicam o tamanho dos amplicons em pares bases (bp).



Em conjunto, esses resultados mostram que o cassete *ultra/otutc_bsd_otutc/ultra* foi, de fato, integrado ao genoma do parasito, porém, não necessariamente no *locus* de interesse. Apenas nos transfectados cultivados no frasco de cultura e do clone B6 observou-se um amplicon referente à amplificação do cassete integrado ao *locus* de *otutc*, que possui um amplicon de 590 bp.



DISCUSSÃO

Neste trabalho, buscou-se estudar o papel de uma proteína putativa para otubaína em *T. cruzi*. A partir da expressão heteróloga dessa proteína e sua posterior avaliação enzimática para um substrato tetra-ubiquitina de origem humana, obteve-se que essa proteína não só clivou o substrato em seu resíduo de lisina na posição 48 (K48), como sua atividade foi otimizada na presença de DTT. Tal resultado mostra que essa enzima tem atividade de desubiquitinação, sugerindo que talvez possa se tratar de uma nova otubaína. As análises *in silico*, por sua vez, revelaram que a proteína possui um domínio OTU e que seu sítio catalítico, composto pelos resíduos de aminoácidos cisteína, histidina e aspartato, encontram-se conservados na região do domínio. Apesar da presença de polimorfismos nessa região, nenhum deles ocorrem sobre os resíduos que compõem a tríade catalítica. Esses resultados vão ao encontro do que foi observado na descrição de uma nova otubaína para o micro-organismo *Cryptosporidium parvum*. Neste fungo, assim como em *T. cruzi*, a proteína heterologicamente expressa também apresentou atividade de desubiquitinase para o resíduo K48 em um substrato. Porém, ao contrário do que foi observado neste trabalho, a presença do agente redutor DTT não interferiu na atividade enzimática de CpOTU (JU *et al.*, 2014).

A obtenção da proteína recombinante, rOtuTc, resultou na obtenção da proteína em fração solúvel e enzimaticamente ativa quando induzida a 20 °C. Em contraposição quando a indução deu-se a 37 °C. O mesmo foi observado para *C. parvum* e para outra cisteíno-protease de *T. cruzi*, cruzipaína (LIMA, ANA PAULA C.A. *et al.*, 2001). As análises *in silico* do alelo *Esmeraldo-like*, o qual foi aquele clonado no vetor pET19b, como revelado pelo sequenciamento, mostraram que a proteína codificada por esse alelo em específico não possui modificações pós-traducionais como glicosilação ou peptídeos-sinais que pudessem levá-la a fazer parte de alguma via secretiva ou sublocação em uma organela específica. O mesmo foi observado, por exemplo, para *L. infantum* (AZEVEDO *et al.*, 2017) e para *C. parvum* (JU *et al.*, 2014). Logo, a ausência de modificações pós-traducionais nessas proteínas as torna disponíveis para expressão em modelos procarióticos como *E. coli*.

A produção de anticorpos policlonais mediante imunização de camundongos com a proteína recombinante permitiu que esses anticorpos fossem utilizados em ensaios de sublocalização celular. Assim, os ensaios de microscopia confocal revelaram que OtuTc, assim como em *L. infantum*, encontra-se localizada no citoplasma desses micro-organismos (AZEVEDO *et al.*, 2017). Em *T. cruzi*, a abundância da proteína é mais acentuada nas formas tripomastigotas e amastigotas que nas formas epimastigotas, em consonância com avaliação com resultados obtidos do transcriptoma desse parasito, onde a presença de mRNA para *otutc* foi menor para a forma replicativa não-infectiva do hospedeiro vertebrado (LI, YUAN *et al.*, 2016). Por outro lado, quando se compara os resultados obtidos para OtuTc com aqueles em *Plasmodium falciparum*, tem-se que neste a localização subcelular da otubaína não se dá no citoplasma, mas em vesículas citoplasmáticas, sugerindo que essa proteína, em *P. falciparum*, pudesse estar envolvida com o tráfego de materiais celulares, em especial, na fase infectiva desse protozoário (DATTA *et al.*, 2017).

No tangente à genômica funcional, a construção de cassetes indutores de homologia direta em *loci* específicos constitui uma estratégia recorrente em *T. cruzi* (DATE *et al.*, 2016). A deleção de genes codificadores para TcMCU (CHIURILLO *et al.*, 2017), um transportador mitocondrial de Ca^{2+} , e TcIP₃R (QUIÑONES *et al.*, 2004), um receptor do tipo inositol-fosfato na membrana de acidocalcisomos, a partir da ferramenta de edição gênica CRISPR/Cas9, mostraram que essa estratégia de deleção é eficiente. Nos dois trabalhos supracitados, contudo, a cepa utilizada não é híbrida, ou seja, não possui mais de um alelo ou cópia do mesmo gene; tampouco os genes de interesse selecionados constituem genes essenciais (*housekeeping*) ao parasito (DATE *et al.*, 2016). Todas estas variáveis corroboram para um sucesso em termos de obtenção de linhagens deletórias para um dado gene, em especial, em um micro-organismo que, em geral, costuma ser refratário à edição genética (VAZQUEZ, 2007). Um dos mecanismos que o torna refratário, por exemplo, consiste na resistência natural ou adquirida a antibióticos, como já reportado para a marca de seleção higromicina (DATE *et al.*, 2016). Nesse sentido, as tentativas de obtenção de linhagens deletórias para *otutc*, a partir da estratégia de flanqueamento do gene resistência à higromicina por intermédio de regiões intergênicas que otimizam a expressão, e o consequente insucesso dessas tentativas podem ser explicados à luz do exposto: o fato do gene *otutc* possuir dois alelos, por se tratar de

uma cepa híbrida (CL Brener), bem como na opção por higromicina por marca de seleção (NOELIA LANDER, ZHU-HONG LI, A SAYANTANEE NIYOGI, 2015).

Por outro lado, a obtenção dos clones B2, B6, D2, D4 e D5 a partir de um cassete que confere resistência à blasticidina, o qual, até o presente momento, não há relatos, na literatura, de resistência natural ou adquirida, corrobora com a ideia da resistência a antibióticos como um entrave a manipulação genética em tripanossomatídeos de uma maneira geral (DUO PENG, SAMARCHITH P. KURUP, PHIL Y. YAO, TODD A. MINNING, 2015). A PCR de confirmação do nocaute mostra que o gene de resistência à blasticidina encontra-se presente no genoma dos clones resistentes. Contudo, a ausência de confirmação da integração do cassete no *locus* de interesse não permite afirmar que houve, de fato, a deleção de ao menos um dos alelos de *otutc*, mas sugere que as linhagens resistentes ao antibiótico possam ser deletérias para ao menos um dos alelos. Tendo em vista que nessa estratégia de deleção, ao contrário daquela em que há o emprego do gene de resistência à higromicina, um dos braços de homologia, na extremidade 5', provém da região 5' UTR do alelo *Esmeraldo-like*, uma possível deleção pode ter ocorrido para esse alelo, em detrimento do alelo *Non-Esmeraldo-like*. Isso foi observado tanto para o clone B6 quanto para os parasitos resistentes cultivados no frasco utilizado para clonagem, em que um fragmento na altura de *otutc* ocorre. Isso pode ser explicado pelo fato do corte pela Cas9 dar-se exatamente na posição 409, uma vez que a Cas9 promove o corte da dupla-fita três bases antes do PAM e o gRNA_ *otutc*_412_rev com marcar a região 412 de ambos os alelos. Concomitante, *bsd* possui 399 bp cujo braço na extremidade 5' promove a integração do cassete ainda no início do gene. Logo, a perda de 409 bp do alelo *Esmeraldo-like* e sua substituição por 399 bp, resulta em um fragmento com 13 bp a menos que o alelo de 795 bp, resultado, assim, em um fragmento de altura semelhante ao de *otutc*.

Nesse contexto, assim como observado para outras otubaínas putativas em organismos patogênicos como *L. infantum* e *C. parvum*, OtuTc é uma desubiquitinase da família OTU, de localização citoplasmática, a qual pode se tratar, de fato, de uma nova otubaína, a primeira descrita em *T. cruzi*, mas cujo papel biológico necessita ser elucidado. A obtenção de linhagens deletérias para ao menos um dos alelos do gene, na cepa CL Brener, constitui um passo preponderante nesse objetivo.



CONCLUSÃO



Os resultados obtidos nesse trabalho permitem concluir que:

1. O gene *otutc* foi expresso em um sistema procariótico, validando essa metodologia para outras proteases de *T. cruzi*, inclusive cisteíno-proteases;
2. A rOtuTc foi expressa enzimaticamente ativa na fração solúvel, tendo tido atividade otimizada na presença de DTT, em pH neutro;
3. A utilização de CRISPR/Cas9 é uma ferramenta viável para a edição gênica em *T. cruzi*;
4. Foi possível a obtenção de cinco linhagens resistentes à blasticidina, as quais podem estar deletadas para o gene *otutc*.



PERSPECTIVAS



No intuito de aperfeiçoar e corroborar com este trabalho, os seguintes passos podem ser efetuados:

- a. Caracterização bioquímica de rOtuTc;
- b. Realização de *Western blotting* para avaliar a expressão diferencial de *otutc* entre os clones;
- c. Realização de *Southern blotting* para averiguação da quantidade cópias do gene *otutc* existem no genoma de *T. cruzi*, bem como a integração ou não do cassete *bsd* aos alelos;
- d. Testagem da linhagem deletéria para *otutc* em ensaios de diferenciação, infecção *in vitro* e *in vivo*, infectividade e patogenicidade.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTUN, Mikael *et al.* **The human otubain2-ubiquitin structure provides insights into the cleavage specificity of poly-ubiquitin-linkages.** *PLoS ONE*, v. 10, n. 1, p. 1–15, 2015.

ALVES, Lysangela R *et al.* **mRNA Localization Mechanisms in *Trypanosoma cruzi*.** v. 8, n. 12, 2013.

ANDRADE, Daniela V.; GOLLOB, Kenneth J.; DUTRA, Walderez O. **Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 7, p. 1–10, 2014.

ARAÚJO, Patricia R; TEIXEIRA, Santuza M. **Regulatory elements involved in the post-transcriptional control of stage-specific gene expression in *Trypanosoma cruzi* - A Review.** v. 106, n. May, p. 257–266, 2011.

ARAÚJO, Renato Freitas *et al.* **Description of a newly discovered *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) foci in Ibipeba, State of Bahia, Brazil.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 47, n. 4, p. 513–516, 2014.

ATKINSON, Holly J.; BABBITT, Patricia C.; SAJID, Mohammed. **The global cysteine peptidase landscape in parasites.** *Trends in Parasitology*, v. 25, n. 12, p. 573–581, 2009.

AZEVEDO, Clênia S *et al.* **Revealing a Novel Otubain-Like Enzyme from *Leishmania infantum* with Deubiquitinating Activity toward K48-Linked Substrate.** v. 5, n. March, p. 1–11, 2017.

BAIETTI, Maria Francesca *et al.* **OTUB 1 triggers lung cancer development by inhibiting RAS monoubiquitination .** *EMBO Molecular Medicine*, v. 8, n. 3, p. 288–303, 2016.

BARRY, Meagan A. *et al.* **A therapeutic vaccine prototype induces protective immunity and reduces cardiac fibrosis in a mouse model of chronic *trypanosoma cruzi* infection.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 13, n. 5, p. 1–17, 2019.

BASTOS, Izabela M.D. *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.** *Biochemical Journal*, v. 388, n. 1, p. 29–38, 2005.

BEKONO, Boris D. *et al.* **Targeting Cysteine Proteases from *Plasmodium falciparum*: A General Overview, Rational Drug Design and Computational Approaches for Drug Discovery.** *Current Drug Targets*, v. 19, n. 5, p. 501–526, 2018.

BELTRAN-HORTELANO, Ivan; PEREZ-SILANES, Silvia; GALIANO, Silvia. **Trypanothione Reductase and Superoxide Dismutase as Current Drug Targets for *Trypanosoma cruzi*: An Overview of Compounds with Activity against Chagas Disease.** *Current Medicinal Chemistry*, v. 24, n. 11, p. 1066–1138, 2017.

BENEKE, Tom *et al.* **A CRISPR Cas9 high-throughput genome editing toolkit for kinetoplasts** Subject Category : Subject Areas : 2017.

- BERN, Caryn. **Chagas' Disease**. *New England Journal of Medicine*, v. 373, n. 5, p. 456–466, 2015. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1410150>>.
- BISHOP, A. J.R. **Homologous recombination as a mechanism for genome rearrangements: environmental and genetic effects**. *Human Molecular Genetics*, v. 9, n. 16, p. 2427–2334, 2000.
- BIVONA, Augusto E. *et al.* **Trypanosoma cruzi 80 kDa prolyl oligopeptidase (Tc80) as a novel immunogen for Chagas disease vaccine**. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 12, n. 3, p. 1–23, 2018.
- BOIANI, Mariana *et al.* **Mode of action of Nifurtimox and N-oxide-containing heterocycles against Trypanosoma cruzi: Is oxidative stress involved?** *Biochemical Pharmacology*, v. 79, n. 12, p. 1736–1745, 2010.
- BOND, Judith S. **Proteases: History, discovery, and roles in health and disease**. *Journal of Biological Chemistry*, v. 294, n. 5, p. 1643–1651, 2019.
- BOTERO, Adriana *et al.* **The kinetoplast DNA of the Australian trypanosome, Trypanosoma copemani, shares features with Trypanosoma cruzi and Trypanosoma lewisi**. *International Journal for Parasitology*, v. 48, n. 9–10, p. 691–700, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.02.006>>.
- BRAZELTON, Vincent A. *et al.* **A quick guide to CRISPR sgRNA design tools**. *GM crops & food*, v. 6, n. 4, p. 266–276, 2015.
- BREDDAM, Klaus. **Serine carboxypeptidases**. A review. *Carlsberg Research Communications*, v. 51, n. 2, p. 83–128, 1986.
- BRIX, Klaudia; STÖCKER, Walter. **Proteases: Structure and function**. [S.l.: s.n.], 2013. v. 9783709108.
- BURLEIGH, Barbara A. *et al.* **A cytosolic serine endopeptidase from Trypanosoma cruzi is required for the generation of Ca²⁺ signaling in mammalian cells**. *Journal of Cell Biology*, v. 136, n. 3, p. 609–620, 1997.
- CABRERA, Gabriel; MARCIPAR, Iván. **Vaccines and the regulatory arm of the immune system. An overview from the Trypanosoma cruzi infection model**. *Vaccine*, v. 37, n. 28, p. 3628–3637, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.05.015>>.
- CAMPO, Vanina A. **Comparative effects of histone deacetylases inhibitors and resveratrol on Trypanosoma cruzi replication, differentiation, infectivity and gene expression**. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v. 7, n. 1, p. 23–33, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpddr.2016.12.003>>.
- CAMPOS, Mônica C. *et al.* **Genome-wide mutagenesis and multi-drug resistance in American trypanosomes induced by the front-line drug benznidazole**. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2017.
- CARDOSO, Josiane *et al.* **Analysis of proteasomal proteolysis during the in vitro metacyclogenesis of Trypanosoma cruzi**. *PLoS ONE*, v. 6, n. 6, p. 1–9, 2011.

- CARDOSO, Mariana S.; REIS-CUNHA, João Luís; BARTHOLOMEU, Daniella C. **Evasion of the immune response by trypanosoma cruzi during acute infection.** *Frontiers in Immunology*, v. 6, n. JAN, p. 1–15, 2016.
- CAVALCANTI, Danielle Pereira; DE SOUZA, Wanderley. **The kinetoplast of trypanosomatids: From early studies of electron microscopy to recent advances in atomic force microscopy.** *Scanning*, v. 2018, 2018.
- CERA, Enrico Di. **Serine Proteases Enrico.** *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, v. 61, n. 5, p. 510–515, 2009.
- CHAGAS, C. **Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, [s. l.], v. 1, p. 159–218, 1909.
- CHEN, Hongfan; CHOI, Jihoon; BAILEY, Scott. **Cut site selection by the two nuclease domains of the Cas9 RNA-guided endonuclease.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 289, n. 19, p. 13284–13294, 2014.
- CHIURILLO, Miguel A *et al.* **crossm Different Roles of Mitochondrial Calcium Uniporter Complex Subunits in Growth.** v. 8, n. 3, p. 1–16, 2017.
- CLAYTON, Christine. **Regulation of gene expression in trypanosomatids: living with polycistronic transcription.** *Open biology*, v. 9, n. 6, p. 190072, 2019.
- COSTA, Tatiana F R; LIMA, Ana Paula C A. **Natural cysteine protease inhibitors in protozoa: Fifteen years of the chagasin family.** *Biochimie*, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2015.11.002>>.
- COURA, José Rodrigues. **The main sceneries of chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review.** *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 3, p. 277–282, 2015.
- COURA, José Rodrigues; BORGES-PEREIRA, José. **Chronic phase of Chagas disease: Why should it be treated? A comprehensive review.** *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 106, n. 6, p. 641–645, 2011.
- CUBBON, Andrew; IVANCIC-BACE, Ivana; BOLT, Edward L. **CRISPR-Cas immunity, DNA repair and genome stability Interplay of DNA repair and CRISPR-Cas immunity: the fundamentals.** *Bioscience Reports*, v. 38, p. 20180457, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1042/BSR20180457>>.
- DA FONSECA, Leonardo Marques *et al.* **Theft and Reception of Host Cell's Sialic Acid: Dynamics of *Trypanosoma Cruzi* Trans-sialidases and Mucin-Like Molecules on Chagas' Disease Immunomodulation.** *Frontiers in immunology*, v. 10, n. February, p. 164, 2019.
- DANIELS, J.-P.; GULL, K.; WICKSTEAD, B. **Cell Biology of the Trypanosome Genome.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 74, n. 4, p. 552–569, 2010.
- DATE, Received *et al.* **Genome Editing by CRISPR/Cas9: a Game Change in the Genetic Manipulation of Protists.** 2016.

- DATTA, Gaurav *et al.* **Plasmodium falciparum OTU-like cysteine protease (PfOTU) is essential for apicoplast homeostasis and associates with noncanonical role of Atg8.** *Cellular Microbiology*, v. 19, n. 9, p. 1–15, 2017.
- DE ANDRADE, Micássio Fernandes *et al.* **Involvement of neutrophils in Chagas disease pathology.** *Parasite Immunology*, v. 40, n. 12, p. 0–3, 2018.
- DEMIDYUK, I. V.; CHUKHONTSEVA, K. N.; KOSTROV, S. V. **Glutamyl endopeptidases: The puzzle of substrate specificity.** *Acta Naturae*, v. 9, n. 2, p. 17–33, 2017.
- DORN, Patricia L. *et al.* **The diversity of the Chagas parasite, *Trypanosoma cruzi*, infecting the main Central American vector, *Triatoma dimidiata*, from Mexico to Colombia.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 9, p. 1–15, 2017.
- DUO PENG, SAMARCHITH P. KURUP, PHIL Y. YAO, TODD A. MINNING, Rick L. Tarleton. **CRISPR-Cas9-Mediated Single-Gene and Gene Family Disruption in *Trypanosoma cruzi*.** v. 6, n. 1, p. 1–11, 2015.
- DUSCHAK, Vilma; COUTO, Alicia. **Cruzipain, the Major Cysteine Protease of *Trypanosoma cruzi*: A Sulfated Glycoprotein Antigen as Relevant Candidate for Vaccine Development and Drug Target. A Review.** *Current Medicinal Chemistry*, v. 16, n. 24, p. 3174–3202, 2009.
- DWORAK, Elaine Schultz *et al.* **Sympatry influence in the interaction of *Trypanosoma cruzi* with triatomine.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 50, n. 5, p. 629–637, 2017.
- EL-SAYED, Najib M *et al.* **The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease.** v. 4975, n. July, p. 409–415, 2005.
- FERRÃO, Patrícia Mello *et al.* **Cruzipain activates latent TGF- β from host cells during *T. cruzi* invasion.** *PLoS ONE*, v. 10, n. 5, p. 1–15, 2015.
- FILARDY, Alessandra Almeida *et al.* **Human Kinetoplastid Protozoan infections: where Are we Going Next?** *Frontiers in Immunology*, v. 9, n. JUL, p. 1–7, 2018.
- FILHO, Dário C.Sobral. **An approach to the acute phase of chagas' disease: The continuing challenge it presents in the 21st century.** *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 112, n. 3, p. 247–248, 2019.
- FOOT, Natalie; HENSHALL, Tanya; KUMAR, Sharad. **UBIQUITINATION AND THE REGULATION OF MEMBRANE PROTEINS.** p. 253–281, 2017.
- FRAGA, Jorge *et al.* **Phylogenetic analysis of the *Trypanosoma* genus based on the heat-shock protein 70 gene.** *Infection, Genetics and Evolution*, v. 43, p. 165–172, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2016.05.016>>.
- FREITAS, Yannara Barbosa Nogueira *et al.* **Natural infection by *trypanosoma cruzi* in triatomines and seropositivity for chagas disease of dogs in rural areas of Rio Grande do Norte, Brazil.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 51, n. 2, p. 190–197, 2018.

- GARCIA, Vanessa *et al.* **Influence of *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) Infection on Mortality of the Sylvatic Triatomine Vector, *Mepraia spinolai* (Heteroptera: Reuviidae), Under Fasting.** *Journal of Medical Entomology*, n. X, p. 1–5, 2019. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jme/advance-article/doi/10.1093/jme/tjz124/5536239>>.
- GEBOW, D.; MISELIS, N.; LIBER, H. L. **Homologous and Nonhomologous Recombination Resulting in Deletion: Effects of p53 Status, Microhomology, and Repetitive DNA Length and Orientation.** *Molecular and Cellular Biology*, v. 20, n. 11, p. 4028–4035, 2000.
- GENOIS, Marie-michelle *et al.* **DNA Repair Pathways in Trypanosomatids : from DNA Repair to.** v. 78, n. 1, p. 40–73, 2014.
- GLEDITZSCH, Daniel *et al.* **PAM identification by CRISPR-Cas effector complexes: diversified mechanisms and structures.** *RNA Biology*, v. 16, n. 4, p. 504–517, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/15476286.2018.1504546>>.
- GONÇALVES, Camila Silva *et al.* **Revisiting the *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis: Morphological and ultrastructural analyses during cell differentiation.** *Parasites and Vectors*, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2018.
- GUO, Tao *et al.* **Harnessing accurate non-homologous end joining for efficient precise deletion in CRISPR/Cas9-mediated genome editing.** *Genome Biology*, v. 19, n. 1, p. 1–20, 2018.
- GUPTA, Ishita *et al.* **Ubiquitin Proteasome pathway proteins as potential drug targets in parasite *Trypanosoma cruzi*.** *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-26532-z>>.
- HABIB, Naomi *et al.* **Multiplex Genome Engineering Using CRISPR / Cas Systems.** n. January, 2013.
- HE, Mingjing *et al.* **The emerging role of deubiquitinating enzymes in genomic integrity , diseases , and therapeutics.** *Cell & Bioscience*, p. 1–15, 2016.
- HIGUERA, Sonia L.; GUHL, Felipe; RAMÍREZ, Juan David. **Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (DTUs) through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay.** *Parasites and Vectors*, v. 6, n. 1, p. 1–6, 2013.
- HUTCHINS, Andrew Paul *et al.* **The Repertoires of Ubiquitinating and Deubiquitinating Enzymes in Eukaryotic Genomes.** v. 30, n. 5, p. 1172–1187, 2013.
- IGLESIAS-GATO, Diego *et al.* **OTUB1 de-ubiquitinating enzyme promotes prostate cancer cell invasion in vitro and tumorigenesis in vivo.** p. 1–14, 2015.
- JANSEN, Ana Maria; XAVIER, Samanta Cristina Das Chagas; ROQUE, André Luiz Rodrigues. ***Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil.** *Parasites and Vectors*, v. 11, n. 1, p. 1–25, 2018.
- JIANG, Fuguo; DOUDNA, Jennifer A. **CRISPR – Cas9 Structures and Mechanisms.** p. 505–531, 2017.

- JINEK, Martin *et al.* **A Programmable Dual-RNA – Guided.** n. August, p. 816–822, 2012.
- JINEK, Martin *et al.* **RNA-programmed genome editing in human cells.** *eLife*, v. 2013, n. 2, p. 1–9, 2013.
- JU, Hye-lim *et al.* **Characterization of a novel otubain-like cysteine protease of *Cryptosporidium parvum*.** *Parasitology International*, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2014.03.005>>.
- JUNQUEIRA, Angela C.V.; DEGRAVE, Wim; BRANDÃO, Adailton. **Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations.** *Trends in Parasitology*, v. 21, n. 6, p. 270–272, 2005.
- JUNQUEIRA, Caroline *et al.* **The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: Lessons for and beyond Chagas disease.** *Expert Reviews in Molecular Medicine*, v. 12, n. May, p. 1–23, 2010.
- KAUFER, Alexa *et al.* **The evolution of trypanosomatid taxonomy.** *Parasites and Vectors*, v. 10, n. 1, p. 1–17, 2017.
- KOMANDER, David; RAPE, Michael. **The Ubiquitin Code.** *Annual Review of Biochemistry*, v. 81, n. 1, p. 203–229, 2012.
- KRATZ, Jadel Müller. **Drug discovery for chagas disease: A viewpoint.** *Acta Tropica*, v. 198, p. 105107, 2019.
- LANDER, Noelia *et al.* **CRISPR/Cas9-mediated endogenous C-terminal tagging of.** 2016.
- LANDFEAR, Scott M.; ZILBERSTEIN, Dan. **Sensing What's Out There – Kinetoplastid Parasites.** *Trends in Parasitology*, v. 35, n. 4, p. 274–277, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.12.004>>.
- LATORRE, Antonio *et al.* **Dipeptidyl nitroalkenes as Potent Reversible Inhibitors of Cysteine Proteases Rhodesain and Cruzain Dipeptidyl Nitroalkenes as Potent Reversible Inhibitors of Cys- - teine Proteases Rhodesain and Cruzain.** 2016.
- LE RHUN, Anaïs *et al.* **CRISPR-Cas in *Streptococcus pyogenes*.** *RNA Biology*, v. 16, n. 4, p. 380–389, 2019.
- LI, Xuan; HEYER, Wolf-Dietrich. **Homologous recombination in DNA repair and DNA.** *Cell Res.*, v. 18, n. 1, p. 99–113, 2008.
- LI, Yuan *et al.* **Transcriptome Remodeling in *Trypanosoma cruzi* and Human Cells during Intracellular Infection.** *PLoS Pathogens*, v. 12, n. 4, p. 1–30, 2016.
- LIANG, Xue-hai; HARITAN, Asaf; ULIEL, Shai. **trans and cis Splicing in Trypanosomatids : Mechanism , Factors , and Regulation MINIREVIEWS trans and cis Splicing in Trypanosomatids : Mechanism , Factors , and Regulation.** v. 2, n. 5, 2003.
- LIDANI, Kárita Cláudia Freitas *et al.* **Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem.** *Frontiers in Public Health*, v. 7, n. July, p. 1–13, 2019.

LIMA, Ana Paula C.A. *et al.* **Cysteine protease isoforms from *Trypanosoma cruzi*, cruzipain 2 and cruzain, present different substrate preference and susceptibility to inhibitors.** *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 114, n. 1, p. 41–52, 2001.

LIMA, M *et al.* **Genome Size , Karyotype Polymorphism and Chromosomal Evolution in *Trypanosoma cruzi*.** v. 6, n. 8, 2011.

LIU, Chang *et al.* **The Otubain YOD1 Suppresses Aggregation and Activation of the Signaling Adaptor MAVS through Lys63-Linked Deubiquitination.** *The Journal of Immunology*, v. 202, n. 10, p. 2957–2970, 2019.

LÓPEZ-CANCINO, Sury Antonio *et al.* **Landscape ecology of *Trypanosoma cruzi* in the southern Yucatan Peninsula.** *Acta Tropica*, v. 151, n. 1, p. 58–72, 2015.

LÓPEZ-OTÍN, Carlos; BOND, Judith S. **Proteases: Multifunctional enzymes in life and disease.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 283, n. 45, p. 30433–30437, 2008.

LUKEŠ, Julius *et al.* **Trypanosomatids Are Much More than Just Trypanosomes: Clues from the Expanded Family Tree.** *Trends in Parasitology*, v. 34, n. 6, p. 466–480, 2018.

LV, Zhengtong; CHU, Yuan; WANG, Yong. **HIV protease inhibitors: A review of molecular selectivity and toxicity.** *HIV/AIDS - Research and Palliative Care*, v. 7, p. 95–104, 2015.

MACEDO, Andrea M. *et al.* **DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: A new tool for characterization of strains and clones.** *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 55, n. 1–2, p. 147–153, 1992.

MACHADO-SILVA, Alice *et al.* **How *Trypanosoma cruzi* deals with oxidative stress: Antioxidant defence and DNA repair pathways.** *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, v. 767, p. 8–22, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2015.12.003>>.

MAKAROVA, Kira S.; ARAVIND, L.; KOONIN, Eugene V. **A novel superfamily of predicted cysteine proteases from eukaryotes, viruses and *Chlamydia pneumoniae*.** *Trends in Biochemical Sciences*, v. 25, n. 2, p. 50–52, 2000.

MANCHOLA, Nubia C. *et al.* **Biochemical Characterization of Branched Chain Amino Acids Uptake in *Trypanosoma cruzi*.** *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 63, n. 3, p. 299–308, 2016.

MARAÑÓN, C. *et al.* **Benznidazole treatment reduces the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) enzymatic activity in Chagas disease symptomatic patients.** *Parasite Immunology*, v. 35, n. 5–6, p. 180–187, 2013.

MARTIN JINEK *et al.* **A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity.** *Science*, v. 337, n. 6096, p. 816–821, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17379808>><<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17379808>>.

MARTÍNEZ-DÍAZ, Rafael A. *et al.* **Biological Characterization of *Trypanosoma cruzi* Strains.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96, n. 1, p. 53–59, 2001.

MASLOV, Dmitri A.; PODLIPAEV, Sergei A.; LUKEŠ, Julius. **Phylogeny of the Kinetoplastida: Taxonomic Problems and Insights into the Evolution of Parasitism**. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96, n. 3, p. 397–402, 2001.

MCCANN, Aidan P *et al.* **Deubiquitylating enzymes in receptor endocytosis and trafficking**. n. September, p. 4507–4525, 2016.

MENEZES, Cristiane *et al.* **Clinical aspects of Chagas disease and implications for novel therapies**. *Drug Development Research*, v. 72, n. 6, p. 471–479, 2011.

MESSENGER, Louisa A; MILES, Michael A; BERN, Caryn. **Between a bug and a hard place : *Trypanosoma cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease**. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, v. 13, n. 8, p. 0, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1586/14787210.2015.1056158>>.

MILES, M. A.; CIBULSKIS, R. E. **Zygodeme characterization of *Trypanosoma cruzi***. *Parasitology Today*, v. 2, n. 4, p. 94–97, 1986.

MIYAHIRA, Yasushi; DVORAK, James A. **Kinetoplastidae display naturally occurring ancillary DNA-containing structures**. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 65, n. 2, p. 339–349, 1994.

MOREIRA, Sandrine *et al.* **Novel modes of RNA editing in mitochondria**. *Nucleic Acids Research*, v. 44, n. 10, p. 4907–4919, 2016.

NARDY, Ana F.F.R. *et al.* **Role of *Trypanosoma cruzi* Trans-sialidase on the escape from host immune surveillance**. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, n. MAR, p. 1–9, 2016.

NEMOTO, Takayuki K.; OHARA-NEMOTO, Yuko. **Exopeptidases and gingipains in *Porphyromonas gingivalis* as prerequisites for its amino acid metabolism**. *Japanese Dental Science Review*, v. 52, n. 1, p. 22–29, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jdsr.2015.08.002>>.

NESSI, Claudio; JEDRZEJAS, Mark J.; SETLOW, Peter. **Structure and mechanism of action of the protease that degrades small, acid-soluble spore proteins during germination of spores of *Bacillus* species**. *Journal of Bacteriology*, v. 180, n. 19, p. 5077–5084, 1998.

NISHIMASU, Hiroshi *et al.* **Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA**. *Cell*, v. 156, n. 5, p. 935–949, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.001>>.

NOELIA LANDER, ZHU-HONG LI, A SAYANTANEE NIYOGI, Roberto Docampo. **CRISPR / Cas9-Induced Disruption of Paraflagellar Rod Protein 1 and 2 Genes in *Trypanosoma cruzi* Reveals Their Role in Flagellar**. v. 6, n. 4, p. 1–12, 2015.

NOIREAU, François; DIOSQUE, Patricio; JANSEN, Ana Maria. ***Trypanosoma cruzi*: Adaptation to its vectors and its hosts**. *Veterinary Research*, v. 40, n. 2, 2009.

NOZAKI, Tomoyoshi; CROSS, George A M. **Effects of 3' untranslated and intergenic regions on gene expression in *Trypanosoma cruzi***. v. 75, p. 55–67, 1995.

- OCAÑA-MAYORGA, Sofía *et al.* **Influence of ecological factors on the presence of a triatomine species associated with the arboreal habitat of a host of *Trypanosoma cruzi*.** *Parasites and Vectors*, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2018.
- OLIVEIRA, Maykon Tavares De *et al.* **TcI, TcII and TcVI *Trypanosoma cruzi* samples from Chagas disease patients with distinct clinical forms and critical analysis of in vitro and in vivo behavior, response to treatment and infection evolution in murine model.** *Acta Tropica*, v. 167, p. 108–120, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.11.033>>.
- OTTO, Hans-hartwig; SCHIRMEISTER, Tanja. **Proteases and their inhibitors.** *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, v. 62, n. 5, p. 76–80, 2002.
- PASSOS-SILVA, Danielle Gomes *et al.* **Overview of DNA Repair in *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* and *Leishmania major*.** v. 2010, 2010.
- PASTRO, Lucía *et al.* **Nuclear Compartmentalization Contributes to Stage-Specific Gene Expression Control in *Trypanosoma cruzi*.** v. 5, n. February, 2017.
- PENA, Sérgio D.J.; MACHADO, Carlos Renato; MACEDO, Andréa Mara. ***Trypanosoma cruzi*: Ancestral genomes and population structure.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. SUPPL. 1, p. 108–114, 2009.
- PUNUKOLLU, Gopikrishna; GOWDA, Ramesh M.; KHAN, Ijaz A. **Early twentieth century descriptions of the Chagas heart disease.** *International Journal of Cardiology*, v. 95, n. 2–3, p. 347–349, 2004.
- QUIÑONES, Wilfredo *et al.* **The glycosome membrane of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: Protein and lipid composition.** *Experimental Parasitology*, v. 106, n. 3–4, p. 135–149, 2004.
- RAKSAKULTHAI, Rocharake; HAARD, Norman F. **Exopeptidases and Their Application to Reduce Bitterness in Food: A Review.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 43, n. 4, p. 401–445, 2003.
- RAMSEY, Janine M. *et al.* **Ecological Connectivity of *Trypanosoma cruzi* Reservoirs and *Triatoma pallidipennis* Hosts in an Anthropogenic Landscape with Endemic Chagas Disease.** *PLoS ONE*, v. 7, n. 9, 2012.
- RAWLINGS, Neil D.; BARRETT, Alan J. **MEROPS: The peptidase database.** *Nucleic Acids Research*, v. 27, n. 1, p. 325–331, 2009.
- RAWLINGS, Neil D; CB, Cambridge. **Families and clans of eysteine peptidases.** v. 6, p. 1–11, 1996.
- ROJAS, Federico *et al.* **The ubiquitin-conjugating enzyme CDC34 is essential for cytokinesis in contrast to putative subunits of a SCF complex in *Trypanosoma brucei*.** p. 1–22, 2017.
- SAJID, M; MCKERROW, J H. **Cysteine proteases of parasitic organisms.** v. 120, p. 1–21, 2002.
- SALASSA, Betiana Nebaí; ROMANO, Patricia Silvia. **Autophagy: A necessary process during the *Trypanosoma cruzi* life-cycle.** *Virulence*, v. 10, n. 1, p. 460–469, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1543517>>.

- SANTOS, Fred Luciano Neves *et al.* **Chronic Chagas disease diagnosis: A comparative performance of commercial enzyme immunoassay tests.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 94, n. 5, p. 1034–1039, 2016.
- SAPRANAUSKAS, Rimantas *et al.* **The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*.** *Nucleic Acids Research*, v. 39, n. 21, p. 9275–9282, 2011.
- SCHMUNIS, Gabriel A.; YADON, Zaida E. **Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem.** *Acta Tropica*, v. 115, n. 1–2, p. 14–21, 2010.
- SCHOFIELD, C J. ***Trypanosoma cruzi* – The Vector-parasite Paradox.**pdf. v. 95, n. 4, p. 535–544, 2000.
- SCHOLZ, Carsten C *et al.* **FIH Regulates Cellular Metabolism through Hydroxylation of the Deubiquitinase OTUB1.** p. 1–22, 2016.
- SCHRADER, Erin K; HARSTAD, Kristine G; MATOUSCHEK, Andreas. **Targeting proteins for degradation.** v. 5, n. 11, p. 815–823, 2009.
- SFEIR, Agnel; SYMINGTON, Lorraine S. **Microhomology-Mediated End Joining : A Back-up Survival Mechanism or Dedicated Pathway ?** *Trends in Biochemical Sciences*, v. xx, n. x, p. 1–14, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2015.08.006>>.
- SIMPSON, Alastair G.B.; STEVENS, Jamie R.; LUKEŠ, Julius. **The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates.** *Trends in Parasitology*, v. 22, n. 4, p. 168–174, 2006.
- SINHA, Supriya *et al.* **Microhomology-mediated end joining induces hypermutagenesis at breakpoint junctions.** p. 1–24, 2017.
- SOLÍS-OVIEDO, Rosa Lidia *et al.* **Biochemical, Cellular, and Immunologic Aspects during Early Interaction between *Trypanosoma cruzi* and Host Cell.** *Chagas Disease - Basic Investigations and Challenges*, 2018.
- STAHL, Philipp *et al.* ***Trypanosoma cruzi* parasites fight for control of the JAK-STAT pathway by disarming their host .** *Jak-Stat*, v. 3, n. 4, p. e1012964, 2014.
- SU, Tianyuan *et al.* **A CRISPR-Cas9 assisted non-homologous end-joining strategy for one-step engineering of bacterial genome.** *Scientific Reports*, v. 6, n. August, p. 1–11, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep37895>>.
- SUN, Xiao-xin; CHALLAGUNDLA, Kishore B. **Positive regulation of p53 stability and activity by the deubiquitinating enzyme Otubain 1.** *The EMBO Journal*, v. 31, n. 3, p. 576–592, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2011.434>>.
- SURESH, Bharathi *et al.* **The Importance of Ubiquitination and Deubiquitination in Cellular Reprogramming.** v. 2016, 2016.
- TAYLOR, ALLEN. **Aminopeptidases : STRUCTURE AND FUNCTION.** v. 32, p. 290–298, 1993.

- TEIXEIRA, Antonio R L; NASCIMENTO, Rubens J; STURM, Nancy R. **Teixeira_et al_ Evolution and pathology in Chagas disease - A Review.pdf**. v. 101, n. August, p. 463–491, 2006.
- TYLER, K. M.; OLSON, C. L.; ENGMAN, D. M. **The Life Cycle Of *Trypanosoma Cruzi***. v. 31, p. 1–11, 2003.
- TZIZIK, Dan M.; BORCHARDT, Roy A. **Chagas disease**. *Journal of the American Academy of Physician Assistants*, v. 31, n. 12, p. 30–33, 2018.
- URBINA, Julio A. **Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease**. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. SUPPL. 1, p. 311–318, 2009.
- VAGO, A R *et al.* **Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues**. *The American journal of pathology*, v. 149, n. 6, p. 2153–9, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8952547>%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1865364>.
- VAZQUEZ, Martin P. **The Genetics and Genomics of *Trypanosoma cruzi***. 2007.
- VEREECKE, Lars; BEYAERT, Rudi; LOO, Geert Van. **The ubiquitin-editing enzyme A20 (TNFAIP3) is a central regulator of immunopathology**. v. 20, p. 383–391, 2009.
- VERMA, Sonia; DIXIT, Rajnikant; PANDEY, Kailash C. **Cysteine Proteases : Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets**. v. 7, n. April, p. 1–12, 2016.
- VIEIRA, Caroline Barreto *et al.* **Triatomines: Trypanosomatids, Bacteria, and Viruses Potential Vectors?** *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 8, n. November, p. 405, 2018.
- VILLALOBOS, Guiehdani *et al.* **A reduction in ecological niche for *Trypanosoma cruzi*-infected triatomine bugs**. *Parasites and Vectors*, v. 12, n. 1, p. 1–9, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13071-019-3489-5>>.
- VILLALTA, Fernando; RACHAKONDA, Girish. **Advances in preclinical approaches to Chagas disease drug discovery**. *Expert Opinion on Drug Discovery*, v. 14, n. 0, p. 1–14, 2019. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17460441.2019.1652593>>.
- WIENER, Reuven *et al.* **The mechanism of OTUB1 inhibition of ubiquitination**. v. 483, n. 7391, p. 618–622, 2012.
- WONG, Nathan; LIU, Weijun; WANG, Xiaowei. **WU-CRISPR : characteristics of functional guide RNAs for the CRISPR / Cas9 system**. *Genome Biology*, p. 1–8, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13059-015-0784-0>>.
- YOUNG, Jacque C. *et al.* **Phage-induced expression of CRISPR-associated proteins is revealed by shotgun proteomics in streptococcus thermophilus**. *PLoS ONE*, v. 7, n. 5, 2012.

ZHANG, Ling; GONG, Feng. **The emerging role of deubiquitination in nucleotide excision repair.** *DNA Repair*, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.05.035>>.

ZHANG, Mingzi M *et al.* **CRISPR – Cas9 strategy for activation of silent *Streptomyces* biosynthetic gene clusters.** n. April, p. 1–5, 2017.

ZINGALES, Bianca *et al.* **The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications.** *Infection, Genetics and Evolution*, v. 12, n. 2, p. 240–253, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>>.

ZINGALES, Bianca. ***Trypanosoma cruzi* genetic diversity : Something new for something known about Chagas disease manifestations , serodiagnosis and.** *Acta Tropica*, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017>>.

ZINGALES, Bianca *et al.* ***Trypanosoma cruzi* genome project : biological characteristics and molecular typing of clone CL Brener.** v. 68, p. 159–173, 1997.

ZUMA, Aline A.; DE SOUZA, Wanderley. **Histone deacetylases as targets for antitrypanosomal drugs.** *Future Science OA*, v. 4, n. 8, 2018.

ZUO, Zhicheng; LIU, Jin. **Structure and Dynamics of Cas9 HNH Domain Catalytic State.** *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-17578-6>>.