



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

Caracterização de mutantes de *Trypanosoma cruzi* deficientes em dipeptidil peptidase 8 e produção de anticorpos contra proteínas ligadoras de RNA (UBP1 *Tc* e UBP2 *Tc*)

NATÁLIA ALVES DE CASTRO

26 de Fevereiro de 2019, Brasília - DF



NATÁLIA ALVES DE CASTRO

Caracterização de mutantes de *Trypanosoma cruzi* deficientes em dipeptidil peptidase 8 e produção de anticorpos contra proteínas ligadoras de RNA (UBP1 *Tc* e UBP2 *Tc*)

Orientadora: Prof.^a Dra. Izabela Marques Dourado Bastos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Patologia Molecular.

26 de Fevereiro de 2019, Brasília - DF



Castro, Natália Alves de

Caracterização de mutantes de *Trypanosoma cruzi* deficientes em dipeptidil peptidase 8 e produção de anticorpos contra proteínas ligadoras de RNA (UBP1*Tc* e UBP2*Tc*) / Natália Alves de Castro; orientador Izabela Marques Dourado Bastos. -- Brasília, 2019.

104 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Patologia Molecular) - Universidade de Brasília, 2019.

1. doença de Chagas. 2. dipeptidil peptidases. 3. RBPs. 4. CRISPR-Cas9. I. Bastos, Izabela Marques Dourado, orient. II. Título.



Trabalho desenvolvido no Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro (LIPH) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, e Microscopia realizada no *Centre de Microscopie de fluorescence et d'IMagerie numérique* (CeMIM) no Museu Nacional de História Natural de Paris, com apoio financeiro da CAPES, CNPq, FAPDF, FINATEC e COFECUB.



Dedico este trabalho a minha mãe Edilene e a minha avó Tina, por me ensinarem a superar todas as adversidades e serem meu exemplo de resiliência!



AGRADECIMENTOS

Eu agradeço....

A minha orientadora, Profa. Dra **Izabela Marques Dourado Bastos**, por ter me dado a primeira oportunidade através da iniciação científica, e por ter, nesses últimos quatro anos e meio, me orientado e incentivado a sempre sair da zona de conforto, me impulsionando quando eu mesma não acreditava no meu potencial. Obrigada pelas broncas bem dadas, por toda a compreensão nos momentos devidos e companheirismo durante a reta final de conclusão desse trabalho.

Ao Prof. Dr. **Jaime Martins de Santana** pela oportunidade em fazer parte desse grupo de pesquisa, pelas palavras de incentivo e conselhos em meio as dificuldades, além do compartilhamento da sua experiência.

A Profa. Dra. **Carla Nunes de Araújo** pelos ensinamentos dados e por ser tão solícita em responder os questionamentos e auxiliar em nosso desenvolvimento científico.

A Profa. Dra. **Flávia Nader Motta** pelas palavras de apoio, por sua grande sensibilidade em momentos difíceis e por sua contribuição significativa nos meus primeiros anos de pesquisa, compartilhando comigo muito dos seus conhecimentos bioquímicos e sempre disposta a ensinar.

Ao Prof. Dr. **Sébastien Olivier Charneau** pelos ensinamentos transmitidos e por todo auxílio prestado.

Ao Dr. **Marcos Rodrigo Alborghetti**, a Profa. Dra. **Aline Lima de Oliveira** e ao Técnico **Luiz** pelos ensinamentos e contribuição essencial para os experimentos de RMN, me introduzindo a essa nova técnica.

A Dra. **Graziella Feitosa Figueiredo** por dividir a DPP8 *Tc* comigo, me permitindo amadurecer e crescer cientificamente.

A Dra. **Cissé Sow** pelo entusiasmo em ensinar e por todo carinho apesar do período curto de tempo. A “petite” se tornou “expert em western blot” te acompanhando.



Aqueles que entraram comigo nessa caminhada a um tempo atrás e nossos caminhos se desencontraram por diversos motivos. **Marina, Ana Carolina, Ingrid, Guilherme** (*in memoriam*), foi muito bom ser IC e aprender junto com vocês.

Aos doutores que contribuíram para o início da minha formação científica, **Raquel Negreiros, Hugo Almeida e David Neves**, muito obrigada.

A todos os colegas do LIPH que me acompanham diariamente e tornam meus dias mais leves e descontraídos. Em especial a **Camila Lasse, Amanda Rocha, Marcelle Carminha, Clênia Azevedo, Milene Andrade, Kaio Bentes e Laís Garreto**, obrigada por todos os ensinamentos e auxílios prestados com toda disposição, o companheirismo nos finais de semana e noites a fio no laboratório e as palavras de consolo e ânimo.

Aos colegas dos laboratórios **LaBioGene, LAMP e LBQP** por todo o auxílio seja através de uma conversa amiga, doação de células, permitindo usar equipamentos, entre outros.

Aos meus amigos da UnB, por sempre acreditarem no meu potencial, me incentivarem e me distraírem nos momentos de descanso. **Nayara Soares, Luís Henrique Corrêa, Bárbara Dias, Yasmim Marcaccini, Hamile Mey, Ana Clara Pova, Heloíse Maite e Camila Gomes**, vocês são minha saudade diária.

A plataforma de microscopia *Centre de Microscopie de fluorescence et d'IMagerie numérique* (CeMIM) no Museu Nacional de História Natural de Paris, e a pessoa do Prof. Dr. **Philippe Grellier**.

Ao CNPq, CAPES, COFECUB, FAPDF e FINATEC pelo financiamento que possibilitou a realização deste trabalho.

A minha segunda família, **Noranei, Romildo e Fernanda**, por todo o carinho e amor com que me receberam. Me sinto muito grata a Deus por ter vocês e poder contar com seu apoio.

Ao meu amor, **Rafael Sudré**, pelo companheirismo, incentivo e amparo durante essa jornada. Obrigada por entender as ausências e estar sempre me apoiando. Seu carinho e suas palavras de apoio foram essenciais nesse período.

A **minha mãe**, por estar sempre ao meu lado, me acompanhar e sofrer comigo nas noites e feriados dedicados a este trabalho. Obrigada por ser um exemplo de força,



determinação e por me ensinar a correr atrás dos meus sonhos, pois como você sempre me diz: “o não você já tem...”.

A **minha amada vovó**, que sempre tem uma palavra de otimismo para dar. Uma mulher de garra, que não se deixa abater pelas piores dificuldades e sempre vê o copo meio cheio. Sempre serei a “neguinha da vovó”. Se hoje tenho a oportunidade de completar um mestrado e ingressar em um doutorado é porque você e minha mãe galgaram um longo e árduo caminho de vitória.

A **Deus**, por me fortalecer, me amparar e me dar um propósito de vida muito maior. Obrigada por me permitir contemplar mais ainda sua perfeição a partir do estudo da sua complexa criação. A cada detalhe e nas centenas de moléculas envolvidas em processos biológicos eu percebo a sua imensidão.



“Viver é enfrentar um problema atrás do outro. O modo como você o encara é que faz a diferença.”

Benjamin Franklin

RESUMO

A doença de Chagas é uma patologia crônica, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, endêmica em países da América Latina. Entretanto, possui impacto mundial uma vez que estudos econômicos indicam um custo de 7,2 bilhões de dólares por ano associado a doença. O medicamento disponível para seu combate, benzonidazol, apresenta baixa eficácia em fase crônica e a grande complexidade biológica do organismo dificulta o desenvolvimento de novos fármacos. Portanto, se faz necessário o melhor entendimento do tripanossomatídeo, assim como das moléculas envolvidas nos seus processos celulares. Nesse aspecto se sobressaem a dipeptidil peptidase 8 (DPP8*Tc*), que ainda não possui sua função biológica conhecida, mas apresenta homólogos com papel importante em diversas patologias, e as proteínas ligadoras de RNA (UBP1*Tc* e UBP2*Tc*), por sua atuação na regulação da expressão gênica. O presente trabalho almejou contribuir com a elucidação da função da DPP8*Tc* e produzir ferramentas para estudos posteriores sobre as RBPs. Linhagens de *T. cruzi* simples nocaute para o gene *dpp8tc* foram caracterizadas, sendo observado uma diminuição na taxa de metaciclogênese do clone F9, que apresentou a menor expressão da proteína vista por *western blot* e imunofluorescência. Ensaio de metabolômica mostraram uma maior produção de prolina intracelular no clone C8, e o estudo da expressão de outras proteases permitiu se constatar uma superexpressão de enzimas da mesma família (POP*Tc*80, OPB*Tc*) nos mutantes simples. Além disso, as formas tripomastigotas metacíclicas selvagens apresentaram menor expressão da DPP8*Tc* em relação as formas epimastigotas. Em conjunto, esses dados indicam um possível papel dessa enzima no processo de diferenciação. A tentativa de duplo nocaute foi realizada por meio da técnica de CRISPR-Cas9, ainda que este não pôde ser confirmado. Ademais, as RBPs, UBP1*Tc* e UBP2*Tc* foram expressas de forma heteróloga, e anticorpos policlonais foram produzidos para essas proteínas. Esses anticorpos serão importantes ferramentas de validação para estudos proteômicos da interação entre RBPs e RNAs.

Palavras-chaves: Doença de Chagas, dipeptidil peptidases, RBPs, CRISPR-Cas9.



ABSTRACT

Chagas disease is a chronic pathology, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, and is endemic in Latin American countries. However, it has a worldwide impact, since economic studies indicate an annually cost of 7.2 billion of dollars associated with the disease. Its available treatment, benznidazole, has low efficacy in the chronic phase, and the great biological complexity of the organism hinders the development of new drugs. Therefore, it is necessary to have a better understanding of the trypanosomatid, as well as the molecules involved in their cellular processes. In this aspect are highlighted the dipeptidyl peptidase 8 (DPP8*Tc*), which does not have its biological function known, but presents homologues with important role in several pathologies, and the RNA-binding proteins (UBP1*Tc* e UBP2*Tc*) for their performance in the regulation of gene expression. The present work aimed to contribute to the elucidation of DPP8*Tc* function and to produce tools for further studies on RBPs. *T. cruzi* single knockouts for the *dpp8tc* gene were characterized, with a decrease in the metacyclogenesis rate of clone F9, which also showed the lowest expression of the protein seen by western blot and immunofluorescence. Metabolomic assays showed higher production of intracellular proline in clone C8, and the study of the expression of other proteases revealed an overexpression of enzymes of the same family (POP*Tc*80, OPB*Tc*) in the single mutants. In addition, wild type metacyclic trypomastigote forms showed lower expression of DPP8*Tc* in relation to epimastigote forms. Together, these results indicate a possible role of this enzyme in the differentiation process. The double knockout attempt was performed using the CRISPR-Cas9 technique, although this could not be confirmed. In addition, the RBPs, UBP1*Tc* and UBP2*Tc* were expressed in procariote system, and polyclonal antibodies were produced for these proteins. These antibodies will be important validation tools for proteomic studies of the interaction between RBPs and RNAs.

Keywords: Chagas disease, dipeptidyl peptidases, RBPs, CRISPR-Cas9.



LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anti-HIS	Anticorpo contra aminoácido histidina
Anti-TAT	Anticorpo contra proteína tubulina
BENEFIT	Avaliação do benzonidazol para interrupção da tripanossomíase (<i>BENZnidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis</i>)
BSA	Albumina de soro bovino
Cas9	Proteína associada a CRISPR 9
CRISPR	Curtas repetições palindrômicas agrupadas e regularmente interespaçadas (<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>)
crRNA	CRISPR RNA
D ₂ O	Água deuterada
DAKO	Meio de montagem para fluorescência (<i>Fluorescence Mounting Medium</i>)
DAPI	4'6'-diamino-2-fenil-indol
DSB	Quebra da dupla fita (<i>double strand break</i>)
dCas9	Cas9 inativa
DNA	Ácidos desoxirribonucleico
DSS	Ácido 4,4-dimetil-4-silapentano-1-sulfônico
DTU	Unidades discretas de tipagem (<i>Discrete Typing Unit</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
G418	Geneticina
HDR	Reparo por homologia (<i>Homology Directed Repair</i>)
HX1	Região intergênicas do gene <i>Tc2β</i>
IPTG	Isopropil-β-D-galactopiranosídeo
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LIT	<i>Liver Infusion Tryptone</i>
miRNA	microRNA



mRNA	RNA mensageiro
MMEJ	Junção de extremidades mediada por micro-homologia (<i>Microhomology-Mediated End Joining</i>)
NaCl	Cloreto de sódio
NHEJ	Junção de extremidades não-homólogas (<i>Non-Homologous End Joining</i>)
NTD/DTN	Doença Tropical Negligenciada (<i>Neglected Tropical Diseases</i>)
OOPS	Separação de fase orgânica ortogonal (<i>Orthogonal Organic Phase Separation</i>)
ORF	Fase de leitura aberta (<i>Open reading frame</i>)
PAHO/OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde (<i>Pan-American Health Organization</i>)
pb	Pares de base
PBS	Tampão Fosfato Salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reação de polimerase em cadeia (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
POP _{Tc80}	Profil Oligopeptidase de <i>Trypanosoma cruzi</i>
RBP	Proteína ligadora de RNA (<i>RNA-Binding Protein</i>)
RISC	Complexo silenciador induzido por RNA (<i>RNA-induced silencing complex</i>)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	Tecnologia de RNA de interferência
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rUBP1 _{Tc}	Uridine-binding protein 1 recombinante de <i>Trypanosoma cruzi</i>
rUBP2 _{Tc}	Uridine-binding protein 2 recombinante de <i>Trypanosoma cruzi</i>
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
sgRNA	RNA guia
siRNA	Pequeno RNA de interferência
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
tracrRNA	CRISPR RNA transativador



TUB	β -tubulina
UTR	Região não traduzida (<i>Untranslated Region</i>)
WHO/OMS	Organização Mundial de Saúde
WT	Selvagem (<i>wilt type</i>)



SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	VII
INTRODUÇÃO	1
Doença de Chagas	1
Distribuição, transmissão e impacto	2
Tratamento e complexidade biológica do <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
Biologia molecular e regulação gênica	7
Edição genética em <i>Trypanosoma cruzi</i> e CRISPR-Cas9	11
Proteases	14
Dipeptidil peptidases	15
Dipeptidil peptidase 8 de <i>T. cruzi</i> (DPP8Tc)	17
Proteínas ligadoras de RNA (RBPs)	19
<i>Uridine-Binding proteins</i> (UBPs)	21
JUSTIFICATIVA	24
OBJETIVOS	26
METODOLOGIA	28
Cultura de células	28
Extratos proteicos de parasitos	28
Análises por <i>Western Blot</i>	28
Imunofluorescências	30
Metaciclogênese <i>in vitro</i> dos parasitos selvagens e clones C8 e F9	31
Quantificação de prolina e metabólitos por RMN (Ressonância Magnética Nuclear) dos parasitos selvagens e clones C8 e F9	31
Desenho e clonagem do sgRNA para nocaute por CRISPR-Cas9	32
Transformação bacteriana e confirmação de clonagem do sgRNA no pTREX-n/Cas9	34



Amplificação de cassete para reparo por Homologia (HDR) utilizando ultrâmeros	36
.....	36
Transfecção com pTREX-n/Cas9/sgRNA e cassete <i>ult-hx1-hyg-tub-ult</i>	36
Confirmação de integração do cassete por PCR	38
Expressão da rUBP1 <i>Tc</i> e rUBP2 <i>Tc</i> e purificação	39
Produção de anticorpos policlonais anti-UBP1 <i>Tc</i> e anti-UBP2 <i>Tc</i>	40
Gráficos e análises de dados	41
Aspectos éticos	41
RESULTADOS	43
Análise da metaciclogênese <i>in vitro</i> dos mutantes para DPP8 <i>Tc</i>	43
Metabolômica comparativa do clone C8 deficiente em DPP8 <i>Tc</i>	44
Imunocitocalização da DPP8 <i>Tc</i> em formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas de <i>T. cruzi</i>	47
Nível de expressão de DPP8 <i>Tc</i> e outras Prolil Oligopeptidases em parasitos mutantes	50
Clonagem do sgRNA e amplificação do cassete	51
Nocautê gênico da DPP8 <i>Tc</i> e confirmação por PCR	55
Avaliação da expressão de DPP8 <i>Tc</i> nos parasitos transfectados	58
Expressão e purificação das UBPs 1 e 2 de <i>T. cruzi</i>	59
Produção de anticorpos e imunomarcação contra as UBPs 1 e 2 de <i>T. cruzi</i>	61
Imunofluorescência das UBPs 1 e 2 de <i>T. cruzi</i>	64
DISCUSSÃO	68
CONCLUSÃO	77
PERSPECTIVAS	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81



INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Doença de Chagas

A doença de Chagas, também conhecida como Tripanossomíase Americana, é uma enfermidade potencialmente fatal, crônica, sistêmica e causada por um protozoário flagelado denominado *Trypanosoma cruzi*. O agente etiológico é um organismo eucarioto pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, caracterizada por possuir uma estrutura rica em DNA mitocondrial conhecida como cinetoplasto. Faz parte de um dos gêneros mais importantes, o gênero *Trypanosoma*, por possuir diversos organismos causadores de patologias humanas (BRENER, 1997).

A enfermidade foi descoberta pelo pesquisador brasileiro Carlos Chagas, sendo reportada em 1909 (CHAGAS, 1909; DIAS, 2017). Este recebeu notoriedade uma vez que em seu relato, Chagas como único pesquisador, descreveu diversos aspectos do seu ciclo de transmissão, como um novo grupo de organismos vetores e uma nova espécie de tripanossomatídeo como agente etiológico, além de descrever a manifestação clínica da doença em fase aguda do primeiro caso humano (CHAGAS, 1909; RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Por isso, como forma de homenageá-lo, a patologia recebe seu nome.

Sua manifestação clínica se dá em duas fases, sendo uma inicial aguda, que dura de 4 a 8 semanas, onde cerca de 30% dos indivíduos pode evoluir para uma fase crônica da doença, que irá persistir até o final de sua vida (Figura 1). A fase aguda é caracterizada por uma alta carga parasitária no sangue, geralmente assintomática ou apresentando sintomas leves e inespecíficos como: febre, dor de cabeça, dor muscular, dificuldade respiratória e para engolir. Os sintomas aparecem de 1 a 2 semanas após a exposição ao vetor infectado ou alguns meses após transfusões sanguíneas (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010; STANAWAY; ROTH, 2015). Em menos de 50% dos casos podem ocorrer sinais característicos indicando o local do repasto, como um edema unilateral nas pálpebras chamado de sinal de Romaña ou um nódulo na pele denominado chagoma de

inoculação. Após 4 a 8 semanas a parasitemia diminui e os sinais de manifestação podem desaparecer espontaneamente.

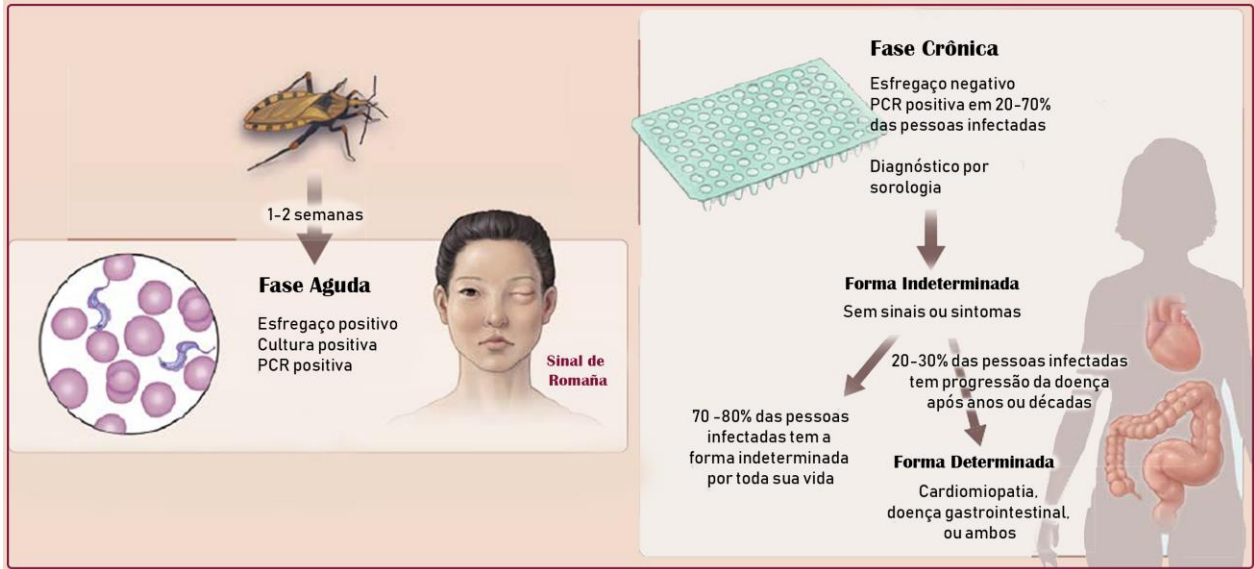


Figura 1. Fases da doença de Chagas e características acerca do diagnóstico. Adaptado de (BERN, 2011).

Na fase crônica, a maioria dos indivíduos (90%) apresenta sua forma indeterminada em que permanece infectado e sorologicamente positivo, mas não apresenta sintomas. Destes, 20 a 30% sofrem progressão para a forma determinada, onde os parasitos apresentam tropismo para certos tecidos. Devido a esse aspecto, são desenvolvidas cardiomiopatias e síndromes digestivas (megaesôfago e megacólon), que se manifestam separadamente ou em conjunto. As mortes atribuídas a doença de Chagas são resultado de sequelas cardiovasculares, onde em seus anos finais, o paciente pode vir a óbito por causa de arritmias e falência cardíaca progressiva (BERN, 2015).

Distribuição, transmissão e impacto

Apesar dos baixos percentuais de evolução para fase crônica, dados mostram que existem cerca de 6 a 7 milhões de pessoas acometidas em todo o mundo (WHO, 2019). Sua distribuição se dá de forma endêmica em 21 países da América Latina, sendo

classificada como uma doença tropical negligenciada (*Neglected tropical diseases – NTDs*) pois atingia principalmente populações rurais e pobres e por possuir poucos investimentos no desenvolvimento de novos medicamentos. Todavia, o fenômeno de urbanização alastrou sua transmissão para regiões urbanas e existe a falta de programas de prevenção e conscientização acerca da doença. Devido a movimentos migratórios, o parasito pôde ser levado, também, a países não endêmicos, como observado na Figura 2, sendo esses: Estados Unidos, Canadá, Japão, Austrália e muitos países Europeus como Suíça e Itália (COURA; VIÑAS, 2010; SORIANO-ARANDES et al., 2016)

Essa dispersão ao redor do mundo nas últimas duas décadas tem constituído novos desafios epidemiológicos, políticos e sociais, tendo uma maior distribuição da doença para regiões ainda não infectadas quando comparado com sua evolução desde mais de 9.000 anos atrás. Estudos econômicos indicam um custo global de 7,2 bilhões de dólares por ano associado a doença, o que corresponde a cerca de 27 bilhões de reais (LEE et al., 2013). Estima-se ainda, que mais de 10.000 pessoas morrem anualmente por causa de suas manifestações clínicas (WHO, 2019).



Figura 2. Distribuição mundial de indivíduos infectados com o protozoário *Trypanosoma cruzi*. Adaptado de (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Sua transmissão em regiões não endêmicas ocorre por meio de transfusões sanguíneas e transmissão vertical, enquanto que o transplante de órgãos e acidentes laboratoriais constituem formas menos expressivas de transmissão. Isso ocorre, porque, nesses países não existia uma fiscalização e controle nacional para doença de Chagas, sendo estimado que em 2012 mais de 200.000 indivíduos estavam acometidos nos Estados Unidos (MANNE-GOEHLER et al., 2016). Outras formas de transmissão hipoteticamente viáveis, mas ainda sem consenso dos estudiosos é a via sexual e por aleitamento materno.

Em regiões endêmicas, as principais formas de transmissão são a forma oral e a forma vetorial, sendo a transmissão oral no Brasil mais comum na região Amazônica e ocorrendo através da ingestão de alimentos não processados e contaminados com as fezes do inseto vetor. Foram relatados surtos dessa transmissão, mais comumente relacionados a ingestão de açaí *in natura* ou sucos não processados e ao suco da cana de açúcar, com histórico de mortes (DE SOUZA-LIMA et al., 2013; SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012).

A forma vetorial de dispersão da doença é realizada por meio de insetos da família Reduviidae, subfamília Triatominae, conhecidos popularmente como “barbeiros”. Existem mais de 150 espécies, todas consideradas capazes de transmitir o *T. cruzi*, todavia, as pertencentes aos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* possuem o maior impacto epidemiológico. Anteriormente mais encontrados em ambientes rurais, os processos de desflorestamento e urbanização mudaram esse cenário, constituindo maior risco de transmissão em ambientes domiciliares e peridomiciliares (COURA, 2015; VIEIRA et al., 2018).

Tratamento e complexidade biológica do *Trypanosoma cruzi*

O tratamento utilizado é pautado no medicamento benzonidazol, que corresponde ao quimioterápico recomendado no Brasil há mais de 40 anos. Sua eficácia em fase aguda é significativa podendo levar à cura, no entanto, em fase crônica sofre uma drástica diminuição. Um estudo internacional e multicêntrico para avaliar a utilização do benzonidazol na interrupção da doença (BENEFIT) demonstrou que esse tratamento não

promove melhora em pacientes com cardiomiopatia crônica já estabelecida (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012; RASSI; MARIN-NETO; RASSI, 2017). Outros estudos indicam que esse medicamento é capaz de causar efeitos genotóxicos em células humanas, gerando danos ao DNA em concentrações próximas às utilizadas no tratamento clínico. Diante do potencial mutagênico do tratamento existente, seus efeitos colaterais e baixa eficácia em fase crônica, há a necessidade de desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para a doença de Chagas (BUSCHINI et al., 2009; SANTOS; TAKAHASHI; NATARAJAN, 1994)

Alguns desafios são enfrentados para esse desenvolvimento, entre eles, a grande complexidade biológica do protozoário. Isso pode ser observado em seu ciclo de vida (Figura 3), onde o *T. cruzi* apresenta quatro formas distintas de desenvolvimento, apresentando diferenças morfológicas, metabólicas e bioquímicas. Além disso, possui um ciclo heteroxênico, onde são observados a capacidade de sobreviver a dois ambientes totalmente diferentes, passando pelo trato digestivo de um hospedeiro invertebrado, os triatomíneos, e alternando para um hospedeiro mamífero onde pode se localizar no ambiente intracelular de tecidos ou na corrente sanguínea (BRINGAUD; RIVIÈRE; COUSTOU, 2006).

Como observado na parte superior e lado esquerdo da Figura 3, o ciclo se inicia durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro humano infectado, o inseto vetor pode adquirir as formas tripomastigotas sanguíneas do *T. cruzi*. Essas formas não replicativas e infectantes são alongadas e finas, possuem um cinetoplasto arredondado e localizado na porção posterior ao núcleo e o flagelo emergindo da bolsa flagelar também na porção posterior, estando aderido ao longo do corpo do parasito como uma membrana ondulante e se tornando livre na porção anterior. Uma vez presente no intestino médio do barbeiro, o protozoário se transforma na forma epimastigota. Os epimastigotas são formas não infectivas e que se replicam por fissão binária, apresentando morfologia alongada, um cinetoplasto em formato de bastão e anterior ao núcleo. Seu flagelo emerge da bolsa flagelar lateralmente e se torna livre na porção anterior (ZIGMAM; ZILTON; MANOEL, 2000).

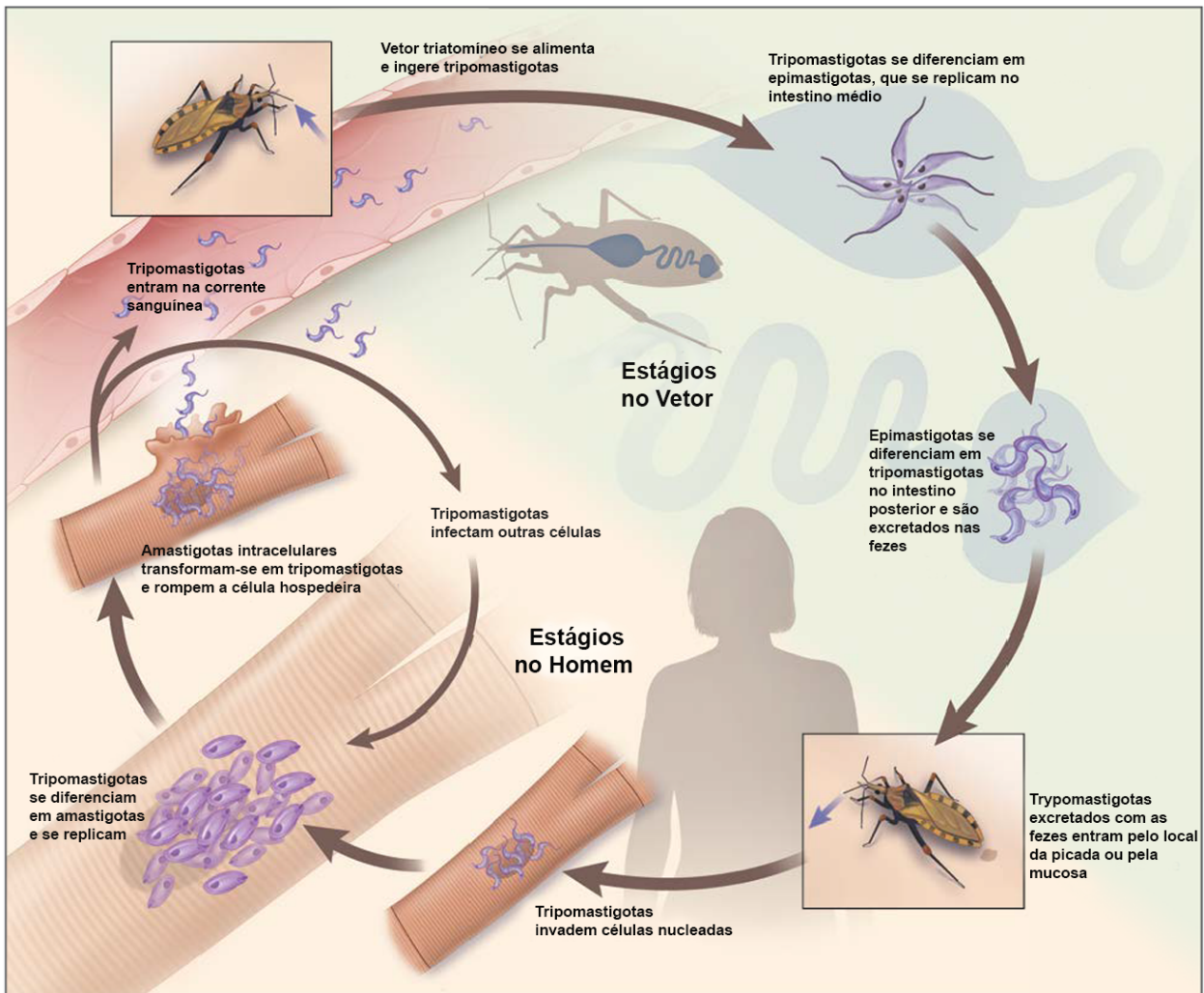


Figura 3. Ciclo de vida dos parasitos *Trypanosoma cruzi*. Adaptado de (BERN, 2011).

Após o hábito hematófago e no intestino posterior do vetor, os nutrientes são consumidos e esses epimastigotas podem sofrer de uma privação e estresse metabólico, ocorrendo a diminuição da sua taxa de divisão e se aderindo ao endotélio epitelial através de seu flagelo (ALVES et al., 2007). Assim, essas formas sofrem o processo de metaciclôgênese, se diferenciando para formas tripomastigotas metacíclicas. Essas são infectivas e não replicativas, se assemelhando as formas tripomastigotas sanguíneas e sendo mais afinadas. Muitos aspectos ainda precisam ser elucidados acerca dos fatores que levam a essa diferenciação, mas sabe-se que a presença de aminoácidos livres, principalmente prolina, na urina do vetor auxilia a desencadear esse processo (BARISÓN et al., 2017; CONTRERAS et al., 1985).

Em um novo repasto, as formas tripomastigotas metacíclicas são liberadas pelas fezes e urinas do inseto, adentrando pelo local da picada quando o hospedeiro o coça. O parasito não consegue penetrar a pele a menos que haja uma ferida ou através de mucosas. Uma vez dentro do hospedeiro mamífero, essas formas infectam células nucleadas, e no interior dessas diferenciam-se em formas amastigotas como resultado da exposição ao ambiente ácido do vacúolo parasitóforo. As amastigotas são formas replicativas e não infectivas, apresentam morfologia arredondada, com cinetoplasto em formato de bastão na região anterior ao núcleo e com um flagelo curto não visível em microscópio óptico. Dentro da célula as amastigotas se proliferam e se diferenciam para formas tripomastigotas sanguíneas que rompe as células hospedeiras, podendo infectar novas células e tecidos ou sendo adquiridas por vetores pelo hábito hematófago e assim completando seu ciclo (DE SOUZA, 1984; TYLER; ENGMAN, 2001).

Biologia molecular e regulação gênica

Além dos processos de diferenciação, a complexidade do ciclo de vida do *T. cruzi* é extensa, pois a interação entre o parasito e as células hospedeiras é extremamente variável. Isso ocorre devido ao grande número de cepas existentes e a capacidade de infectar diversos tipos celulares, induzindo diferentes respostas nas células hospedeiras. Também sabe-se que o *T. cruzi* expressa diferentes moléculas de adesão, possui outras formas de internalização celular além da fagocitose, e que existem diversos mecanismos de evasão da resposta imune (BAYER-SANTOS; MARINI; DA SILVEIRA, 2017; BORGES et al., 2016; ROMANO et al., 2012). Essas grandes mudanças fenotípicas observadas em seu ciclo, adaptações a diferentes ambientes, e variável interação com a célula hospedeira depende de extensiva modulação da expressão gênica do protozoário.

A cepa CL-Brener de *T. cruzi* teve seu genoma sequenciado em 2005, sendo escolhida por ser bem caracterizada experimentalmente. O indivíduo é heterozigoto com pares de cromossomos homólogos de tamanhos distintos. A cepa citada foi originalmente distribuída pelo Dr. Zigman Brener e foi nomeada em sua honra. É uma cepa híbrida, possuindo um alelo de haplótipo Esmeraldo-like, e um alelo não Esmeraldo-like provenientes de dois ancestrais de diferentes DTUs (*discrete typing units*), TcII e TcIII

respectivamente. O termo DTU foi criado uma vez que o protozoário apresenta alta variabilidade genética entre cepas e as classifica em seis unidades discretas de tipagem, com grupos formados por cepas de maior semelhança genética entre si (HIGUERA; GUHL; RAMÍREZ, 2013).

O projeto que sequenciou o genoma do *T. cruzi* revelou existir 22.750 genes preditos como codificadores de proteínas, dos quais 6.159 estão presentes em um haplótipo e 6.043 no outro, representando pares de alelos, e mais de 50% do genoma é composto por sequências repetitivas de retrotransposons e genes de grandes famílias de moléculas de superfície (EL-SAYED et al., 2005). Contrária a maioria dos eucariotos, em que o genoma se organiza em unidades monocistrônicas de transcrição, a organização dos genes de tripanossomatídeos no geral é feita em longas unidades policistrônicas de transcrição (*clusters*) contendo genes não relacionados entre si. Diferentemente dos procaríotos que também possuem seu genoma organizado em unidades policistrônicas, os genes dos tripanossomos necessitam de processamento anterior a sua tradução. Por isso, esses possuem diferentes mecanismos de regulação gênica em relação aos demais organismos (CLAYTON, 2013).

A maioria dos organismos eucariotos possuem diversos mecanismos de controle da expressão gênica, entre eles, a remodelação da cromatina, a metilação do DNA, o *splicing* alternativo, a estabilidade e transporte do mRNA, o controle traducional e por modificação pós-traducionais. Porém, a maior parte da regulação ocorre a nível transcricional, onde existem sequência regulatórias que flaqueiam cada gene individual chamadas de promotores (WRAY et al., 2003).

Enquanto a organização e transcrição de um único gene permite uma boa regulação da expressão de genes eucarióticos em geral, em tripanossomos o controle da expressão individual não é possível. A regulação da expressão gênica é então baseada em processos co-transcricionais, por meio de *trans-splicing* e poliadenilação para maturação e geração dos transcritos monocistrônicos (individuais e maduros), e ainda não foi totalmente elucidada (JÄGER et al., 2006). Se sabe que em *T. cruzi* existem poucos promotores identificados para RNA polimerase II, e não foi identificado nenhum gene que fosse transcrito por outras RNA polimerases, ainda que seu genoma tenha regiões gênicas conservadas para as RNAs polimerases I, II e III (VAZQUEZ, 2007).

Na figura 4, podemos observar que o processo de transcrição em tripanossomatídeos se inicia (1) geralmente de forma bidirecional com um promotor para RNA polimerase II precedendo múltiplas fases de leitura abertas (ORFs - *open reading frames*), em regiões com variações e modificações específicas de histonas. A terminação (2) é marcada por uma combinação epigenética e pela presença de genes transcritos por outras polimerases. A RNA polimerase II é responsável por iniciar e terminar especificamente a transcrição de centenas de genes idênticos (3) com uma sequência de aproximadamente 140 nucleotídeos (*spliced leader RNA - SLRNA*) (CLAYTON, 2016).

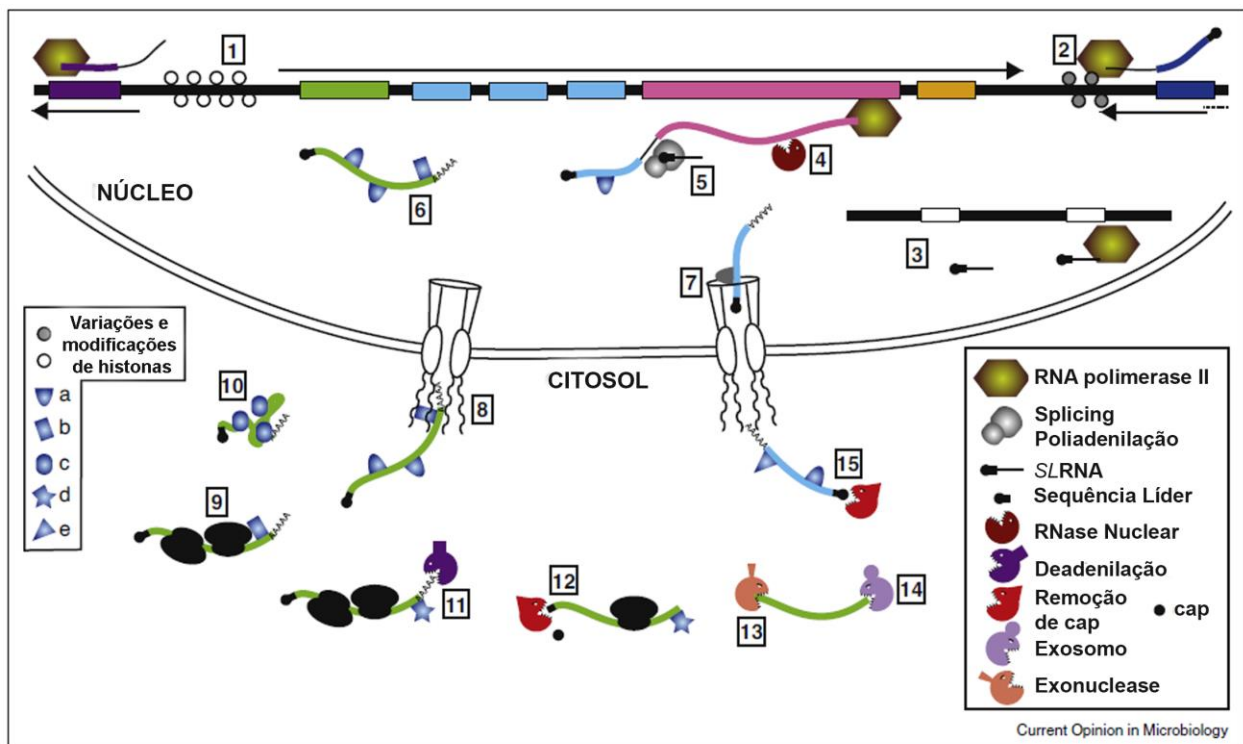


Figura 4. Esquema de regulação gênica em tripanossomatídeos. Adaptado de (CLAYTON, 2016).

Os RNAs mensageiros (mRNAs) individuais são processados ao mesmo tempo em que ocorre a transcrição do seu precursor (pré-mRNA). Em um processo de controle da expressão, os pré-mRNAs podem ser degradados (4) por RNases nucleares, sendo a competição entre a degradação do precursor e o seu processamento importante para a regulação da quantidade de mRNA na célula. A maturação do pré-mRNA (5) é realizada pela clivagem e poliadenilação da extremidade 3' de forma simultânea ao processo de *trans-splicing* na extremidade 5', com uma distância aproximadamente fixa entre eles.

O *trans-splicing* ocorre utilizando o SLRNA citado anteriormente, uma vez que este é composto de duas regiões, uma região intrônica sem função conhecida e uma porção exônica (BITAR et al., 2013). Dessa região exônica, uma sequência de cerca de 39 nucleotídeos (que carrega uma sequência metilada, *cap*, responsável por proteger o mRNA de degradação) é transferida para a extremidade 5' de transcritos policistrônicos, em sítios aceptores de *splicing* para obtenção de transcritos monocistrônicos (GÜNZL, 2010). A sequência é denominada *splice leader* (SL). A poliadenilação, por sua vez, ocorre na extremidade 3' com adição de uma cauda poli-A. Apesar de não existir uma sequência consenso para a poliadenilação e a adição do SL, se sabe que regiões ricas em polipirimidinas entre regiões intergênicas podem guiar esses processos (DE GAUDENZI et al., 2011).

Os transcritos maturados, podem então se associar a proteínas ligadoras de RNA (RNA *binding proteins* – RBPs) no núcleo (6), formando complexos de ribonucleoproteína com os mRNAs (mRNP), antes de serem exportados para o citosol (7). Uma vez que passaram pelo poro nuclear (8), os transcritos se associam a fatores de transcrição que recrutam os ribossomos (9). Então, o processo de tradução pode remover algumas proteínas ligadoras de RNA (RBPs) ligadas, como a proteína a, enquanto outras RBPs, especialmente as que se ligam na porção 3' das regiões não traduzidas (*untranslated region* - UTR), como a proteína b, podem permanecer ligadas, ou serem substituídas por proteínas competindo pelo mesmo sítio de ligação (proteína c). Alguns transcritos podem ser armazenados antes de sua tradução (10), formando vários tipos de agregados e grânulos com diferentes conteúdos proteicos.

A degradação então, começa pela remoção gradual da cauda poli-A, num processo de deadenilação (11). Provavelmente, este começa enquanto o mRNA ainda está sendo traduzido. O mRNA tem sua *cap* removida (12) e é digerido por uma exonuclease (13) na direção 5'-3', ou pelo exossomo (14) na direção 3'-5'. Um subconjunto de mRNAs é degradado em cerca de 5 a 10 minutos após sua síntese e sem a necessidade de deadenilação prévia, tendo seu *cap* removido e digeridos a partir da extremidade 5', impedindo sua tradução (CLAYTON, 2016).

Edição genética em *Trypanosoma cruzi* e CRISPR-Cas9

A manipulação genética é uma ferramenta muito importante para o estudo funcional de genes e processos biológicos de um organismo. Há muitos anos, técnicas têm sido criadas e a realização de nocaute gênico é uma das principais metodologias para elucidar o papel de proteínas em sistemas biológicos. Tendo em vista essas diferenças na organização genômica e regulação gênica de tripanossomatídeos, a edição genética nesses organismos também possui características diferenciadas (ARAÚJO; TEIXEIRA, 2011).

Em *T. brucei*, o estudo de genes por meio de edição se encontra mais estabelecido do que em *T. cruzi*, graças a codificação em seu genoma das proteínas argonauta e DICER que permitem a realização da técnica de RNA de interferência (RNAi). Esta consiste em um mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional em que um RNA dupla fita (dsRNA), classificado como miRNA ou siRNA, é clivado e processado no núcleo pela ação da enzima Drosha. Esses pré-miRNAs, então, são exportados para o citoplasma, onde a enzima Dicer cliva uma das fitas gerando o miRNA maduro. A fita restante serve de guia para um complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*, complexo silenciador induzido por RNA), se pareando com o mRNA alvo. Quando o pareamento é efetivo, ocorre a clivagem e degradação do transcrito pela ação da proteína argonauta. Ainda que o pareamento não seja perfeito e a clivagem não ocorra, há a inibição da tradução (DJIKENG et al., 2001; KOLEV; TSCHUDI; ULLU, 2011).

O RNAi é uma técnica poderosa e rápida, mas que não pode ser aplicada ao *T. cruzi*, uma vez que ele não apresenta genes codificadores para as proteínas argonauta e DICER, não possuindo a maquinaria necessária para esse mecanismo de silenciamento gênico (DE ASSIS BURLE-CALDAS et al., 2015). Os estudos relacionados a nocaute gênico nesse protozoário se baseavam, então, na recombinação por homologia espontânea de um DNA doador, chamado de cassete, contendo um gene de resistência a algum antibiótico flaqueado por sequências da UTR ou do gene de interesse.

Ainda que o nocaute gênico por recombinação tenha sido possível, é um método laborioso, de baixa eficiência e requer que sejam realizados dois turnos de deleção, uma

vez que a abordagem é limitada ao nocaute de um único alelo por marca de seleção (PENG et al., 2014). Nesse contexto, o desenvolvimento e aprimoramento de novas tecnologias para nocaute de genes, como o sistema CRISPR/Cas9, são de grande importância, representando uma revolução no estudo gênico em diferentes espécies.

O sistema é baseado no mecanismo de defesa (CRISPR tipo II) presente no sistema imune adaptativo de alguns procariontes, como de *Streptococcus pyogenes*, e algumas espécies de Archaea (BARRANGOU; HORVATH, 2017). Frente a uma infecção por vírus, sequências de DNA exógeno são incorporadas ao genoma procarionte de forma interespaçada ao DNA por sequências endógenas curtas, palindrômicas e repetitivas, constituindo um locus CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*). Caso uma nova infecção viral aconteça, serão gerados dois tipos de transcritos. Um crRNA (CRISPR RNA) que contém uma sequência variável correspondente ao DNA do invasor, conhecida como sequência protospaçadora, e responsável por reconhecer e direcionar o corte da dupla fita (*double strand break – DSB*). Esse crRNA se hibridiza com um tracrRNA (crRNA transativador ou *transactivating CRISPR RNA*) que possui uma estrutura secundária permitindo o acoplamento do complexo à endonuclease Cas9. A parte protoespaçadora do crRNA direciona a Cas9 para o sítio de clivagem específico que são adjacentes a curtas sequências conhecidas como PAMs (*protospacer adjacent motifs*) (SANDER; JOUNG, 2014).

Para nocaute gênico, o sistema é adaptado pelo desenho de um único RNA guia (*single guide – sgRNA*) que realiza a função do crRNA e do tracrRNA. Entretanto, a ferramenta biotecnológica de edição genética CRISPR-Cas9, baseada no sistema biológico descrito acima, pode ser utilizada não somente para nocaute gênico, mas têm sido adaptada para edição de bases com uma Cas9 modificada cataliticamente; modulação de transcrição com uma dCas9 (*dead Cas9*, ou Cas9 inativa mas capaz de se ligar a sequência alvo) que pode ativar ou reprimir a transcrição sem gerar mudança na sequência nucleotídica; e modulação epigenética utilizando repressores modificados (ZHANG; WANG; QUAN, 2018). São descritos ainda modificações buscando criar um sistema fotoativo para indução de diferenciação, além de um sistema suicida de CRISPR-Cas9 visando a eliminação do sistema após ocorrer a edição, permitindo minimizar o

efeito de edição em alvos não almejados (*off-targets*) e complementação (OTABE et al., 2017; WANG et al., 2016).

Em *Trypanosoma cruzi*, o CRISPR-Cas9 aumenta a eficiência de nocaute e inserção por recombinação homóloga, com cerca de 70% da população apresentando fenótipo mutante, e uma diminuição dos níveis de proteína perceptíveis em apenas dois dias após a transfecção (PENG et al., 2014). A edição por meio do sistema pode ainda ocorrer sem a necessidade de um DNA doador para direcionar o reparo por recombinação homóloga (*Homology Directed Repair – HDR*) (Figura 5).

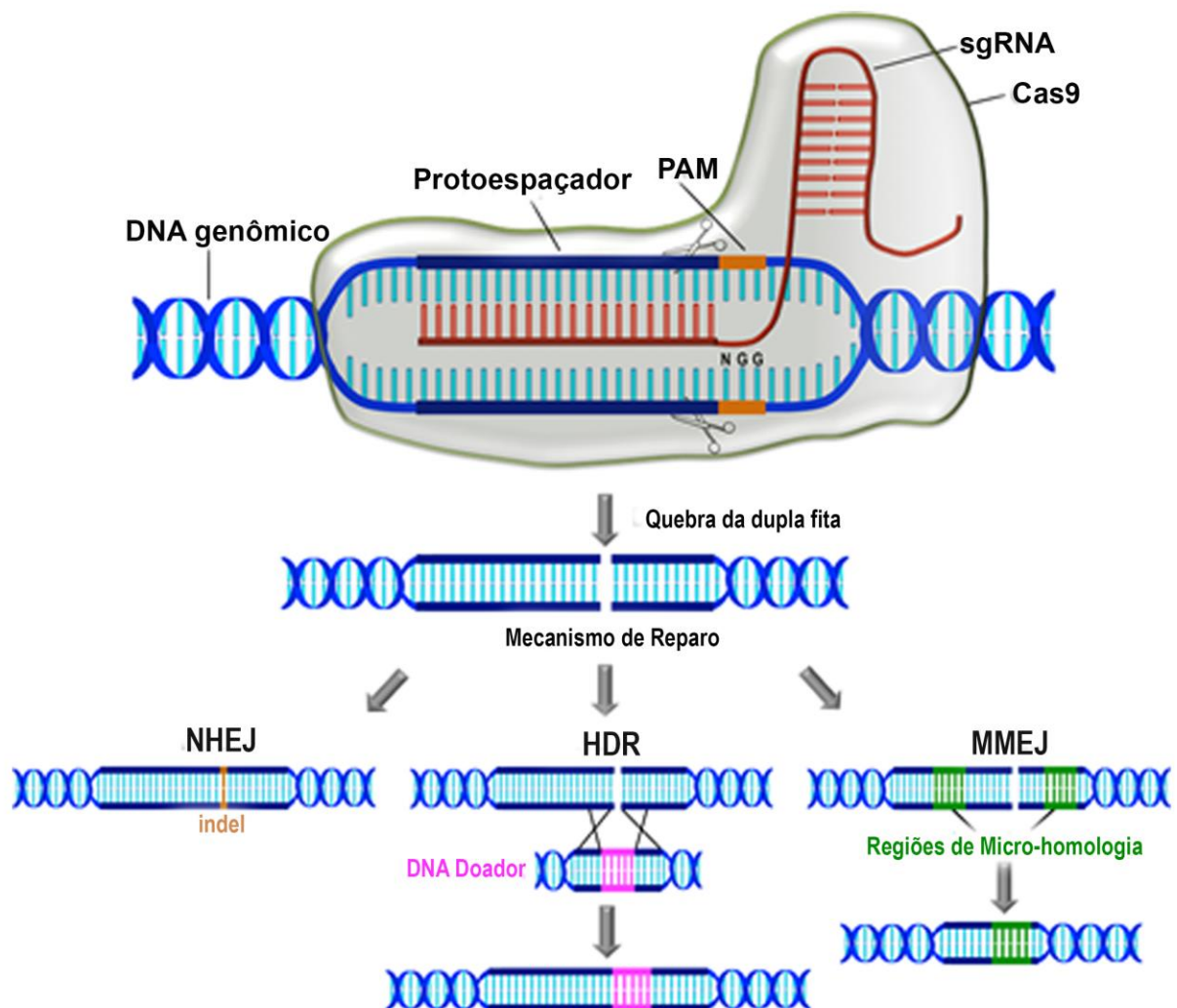


Figura 5. CRISPR-Cas9 e os possíveis sistemas de reparo. Adaptado de (LANDER; CHIURILLO; DOCAMPO, 2016).

Em organismos apicomplexos como *Toxoplasma gondii*, o reparo da DSB ocorre por meio de junção de extremidades não homologas (*Non homologous end-joining* – NHEJ). No caso do *T. cruzi* o reparo é feito por meio de micro-homologia (*microhomology-mediated end joining* – MMEJ), onde, por meio de sequências homólogas curtas de 5 a 20 nucleotídeos que flanqueiam o corte, ocorre a recombinação seguida do anelamento das fitas resultando em deleções de nucleotídeos (GLOVER; JUN; HORN, 2010).

Proteases

Entre as moléculas de interesse para o estudo por meio de manipulações genéticas e com alvo no desenvolvimento de novos medicamentos, as proteases se destacam por estarem envolvidas em diversos processos biológicos importantes como a manutenção fisiológica da célula, regulação e a sinalização de importantes aspectos celulares. Ademais, por seu papel relevante em processos normais e patológicos, podem ser cruciais para a infectividade de microrganismos patogênicos e a persistência da doença, sendo implicadas como possíveis fatores de virulência (ZHANG et al., 2013). Portanto, a caracterização funcional e molecular permite sua validação como alvos moleculares para o desenvolvimento racional de novos fármacos (BASTOS et al., 2013).

As proteases são enzimas que clivam ligações peptídicas, também chamadas de peptidases, degradando proteínas e gerando peptídeos e aminoácidos livres. Podem ser endopeptidases, realizando hidrólise de ligações internas às cadeias polipeptídicas, ou exopeptidases, clivando aminoácidos a partir das extremidades N ou C-terminal dos seus substratos (RAWLINGS; BARRETT, 1994). Sua classificação ocorre de acordo com seu mecanismo catalítico, tendo cinco classes nomeadas por meio do resíduo que atua como aminoácido nucleofílico, encontrado no seu sítio: serino, cisteíno, metalo, aspártico e treonino proteases (TURK; TURK; TURK, 2012).

Em nível de organização, as classes podem se subdividir em clãs que agregam as famílias de proteínas com relações evolutivas mais próximas. Na classe das serino proteases, clã SC (serino-carboxipeptidase) está presente a família das Prolil Oligopeptidases (POP) ou S9 (EC 3.4.21.26), estando distribuídas em diversos organismos e tendo sido estudadas por nosso grupo de pesquisa por aparentar um

potencial de virulência em *T. cruzi* e estarem envolvidas em diversos processos fisiológicos (BASTOS et al., 2005, 2013; DE ALMEIDA et al., 2016; MOTTA et al., 2012). Essa família é subdividida em seus principais representantes: prolil oligopeptidase (POP, EC 3.4.21.26), oligopeptidase B (OPB, EC 3.4.21.83), dipeptidil peptidase IV (DPPIV, EC 3.4.14.5), acilaminoacil peptidase (ACPH, EC 3.4.19.1) e glutamil endopeptidase C (GEP, EC 3.4.21.19) (BASTOS et al., 2013).

Os membros dessa família apresentam relação estrutural tendo o sítio catalítico conservado com resíduos da tríade catalítica em uma ordem Ser-Asp-His. Sua estrutura tridimensional é composta por domínios, onde o domínio catalítico tem arranjo α/β hidrolase conservado e é formado pela porção C-terminal, sendo a porção N-terminal mais variável. Apesar dessa similaridade, essas enzimas possuem diferenças de localização celular e na especificidade por substratos (POLGAR, 2002).

Dipeptidil peptidases

As dipeptidil peptidases são caracterizadas na subdivisão S9b, que engloba enzimas como a DPPIV, a FAP (proteína de ativação de fibroblasto), DPP8, DPP9 e DPP10 (Figura 6). Os membros dessa subfamília clivam dipeptídeos pós prolina, característica rara entre as proteases, com localização N-terminal, tendo sido visto que esse processamento pode ativar, inativar ou modular a atividade de peptídeos bioativos (BARRETT; RAWLINGS, 1995). Essa ação de processamento indica utilidade na resposta imune e funções endócrinas, podendo estar envolvidas na ativação de vias de sinalização (DE MEESTER et al., 1999; DURINX et al., 2000).

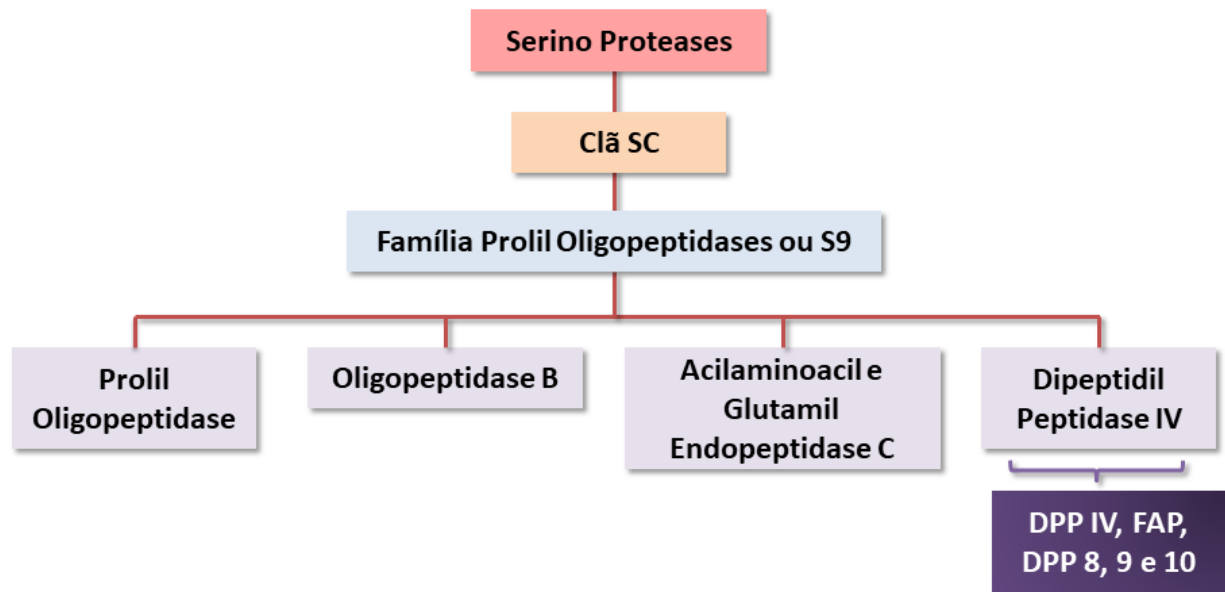


Figura 6. Representação esquemática da organização das serino proteases até a subdivisão onde a DPP8 se encontra.

A DPPIV dá nome a subfamília S9b por atrair grande atenção da indústria farmacêutica, principalmente por seu papel na homeostase da glicose, com inibidores sendo utilizados como fármacos para diabetes tipo 2. Outros papéis importantes atribuídos a essa enzima são na biossíntese de colágenos, degradação de neuropeptídeo Y (NPY) e ativação de células T (ZHANG et al., 2013). Por esse motivo essa enzima foi extensamente estudada, enquanto sua homóloga DPP8, que possui mesma atividade proteolítica, ainda é alvo de poucos estudos e carece de elucidação sobre o seu papel fisiológico em mamíferos.

Estudos mostram que a DPPIV pode estar relacionada à capacidade de virulência para vários tecidos, possuindo ortólogos em diversos organismos e podendo oferecer vantagem a esses patógenos na interação com o hospedeiro. Entre eles, têm-se os do gênero *Aspergillus* e a *Porphyromonas gingivalis*, sendo que este último usa a matriz extracelular como fonte de carbono (BEAUVAIS et al., 1997; GE; FENG; JI, 2009; OHARA-NEMOTO et al., 2014). Outras patologias são relacionadas a essas serino proteases, como inflamatórias do intestino, esclerose múltipla e artrite reumatoide. Entretanto, os ensaios realizados para sua implicação nesses processos patológicos utilizaram inibidores específicos para DPPIV, mas não seletivos para essa proteína em detrimento das outras DPPs, sendo possível que algumas das funções que lhe são

atribuídas possam pertencer, na realidade, a seus homólogos como a DPP8 e a DPP9, por sua atividade semelhante (YAO et al., 2011).

A função desses homólogos ainda não é descrita, porém sua superexpressão em células HEK293T revelou papel na adesão celular, em cicatrização *in vitro*, migração de células e na proliferação e apoptose, de forma a induzir a apoptose e interromper a adesão e migração celular (ABBOTT et al., 2000; YAO et al., 2011). Foi descoberto que estas enzimas são responsivas a ROS, podendo ter função citoplasmática na regulação de peróxido, como nas vias de sinalização, fosforilação e nas já citadas funções imune, apoptótica e no câncer (POOLE; KARPLUS; CLAIBORNE, 2004).

A DPP8 humana é uma proteína citosólica, ativa tanto na forma monomérica como dimérica, e é regulada positivamente durante a resposta imune, apesar de não possuir funções fisiológicas elucidadas (PITMAN; MENZ; ABBOTT, 2010). A função desta enzima em *T. brucei* foi estudada por meio da tecnologia de RNAi, além de outros 20 genes de serino proteases, sendo que sua ausência não provocou morte dos parasitos (MOSS et al., 2015). Já em *Plasmodium falciparum*, a inibição da enzima correspondente (DPPI) provoca a formação de trofozoítos imaturos com tamanhos reduzidos e levando o parasito a morte, sugerindo papel essencial para o organismo (DEU et al., 2010).

Dipeptidil peptidase 8 de *T. cruzi* (DPP8Tc)

A DPP8Tc é uma protease codificada no genoma do protozoário, e vem sendo estudada por nosso grupo de pesquisa, assim como outras POPs, em busca do entendimento da sua função biológica para o patógeno causador da doença de Chagas. Em um primeiro trabalho sobre ela, foi realizado o nocaute gênico por recombinação homóloga espontânea de um dos alelos dessa enzima (FIGUEIRÊDO, 2013). Foi observado que os parasitos mutantes apresentaram taxa de crescimento 25% maior do que o parasito selvagem e tiveram uma maior infectividade em células de mamífero da linhagem L6 (mioblasto de rato) em cerca de 1,7 vezes. Contudo, a atividade enzimática da DPP8Tc foi de 162% nos parasitos nocauteados, indicando que o parasito pode ter duplicado o gene da enzima em outra região do genoma ou estava superexpressando enzimas que clivam o mesmo substrato. A tentativa de obtenção de mutantes nulos foi

realizada, mas sem sucesso, não sendo possível obter parasitos viáveis após a seleção (FIGUEIRÊDO, 2013).

Posteriormente, novo projeto foi realizado visando a caracterização bioquímica da proteína com sua expressão heteróloga e o estudo funcional para obtenção dos mutantes nulos (FIGUEIREDO, 2017). A enzima obteve as condições de atividade ótima estabelecidas com tampão, pH e concentração de aditivos. Sua temperatura ótima foi observada em 28 °C, com redução de aproximadamente 50% da sua atividade relativa a 37 °C, que é a temperatura do hospedeiro mamífero (Figura 7A). Ainda, os parâmetros enzimáticos como constante de Michaelis-Menten (K_M), velocidade máxima de reação ($V_{máx}$), constante catalítica (K_{cat}) e eficiência catalítica (K_{cat}/K_M), e testes de inibição da atividade foram realizados utilizando inibidores clássicos de serino proteases e inibidores específicos para DPPIV humana, sendo que estes últimos apresentaram melhor inibição da DPP8Tc (FIGUEIREDO, 2017).

Ensaio de cromatografia de exclusão de tamanho e ultracentrifugação mostraram que a enzima é dimérica, tendo sido visto também, em SDS-PAGE, que sua estrutura quaternária é desfeita por condições desnaturantes de tampão e concentrações gradativas de cloreto de sódio (NaCl). O simples nocaute foi novamente realizado, mas, desta vez foi confirmado por *Southern Blot* (Figura 7B), e corroborou com os resultados obtidos anteriormente.

Constatou-se uma maior taxa de crescimento dos parasitos simples nocautes, com diferença a partir do quarto dia onde os mutantes já apresentaram densidade celular duas vezes maior em relação ao selvagem (Figura 7C). Também foi observado uma maior infectividade *in vitro* por ensaios em células L6 utilizando tripomastigotas de cultura, sendo que os parasitos simples nocautes infectaram 2,9% mais células em relação aos selvagens (Figura 7D). Entretanto ensaios de infectividade do parasito selvagem sobre ação do inibidor enzimático específico para a enzima, não apresentou diferença significativa (Figura 7E) (FIGUEIREDO, 2017). Diante dessas observações, a função biológica dessa enzima ainda precisa ser elucidada.

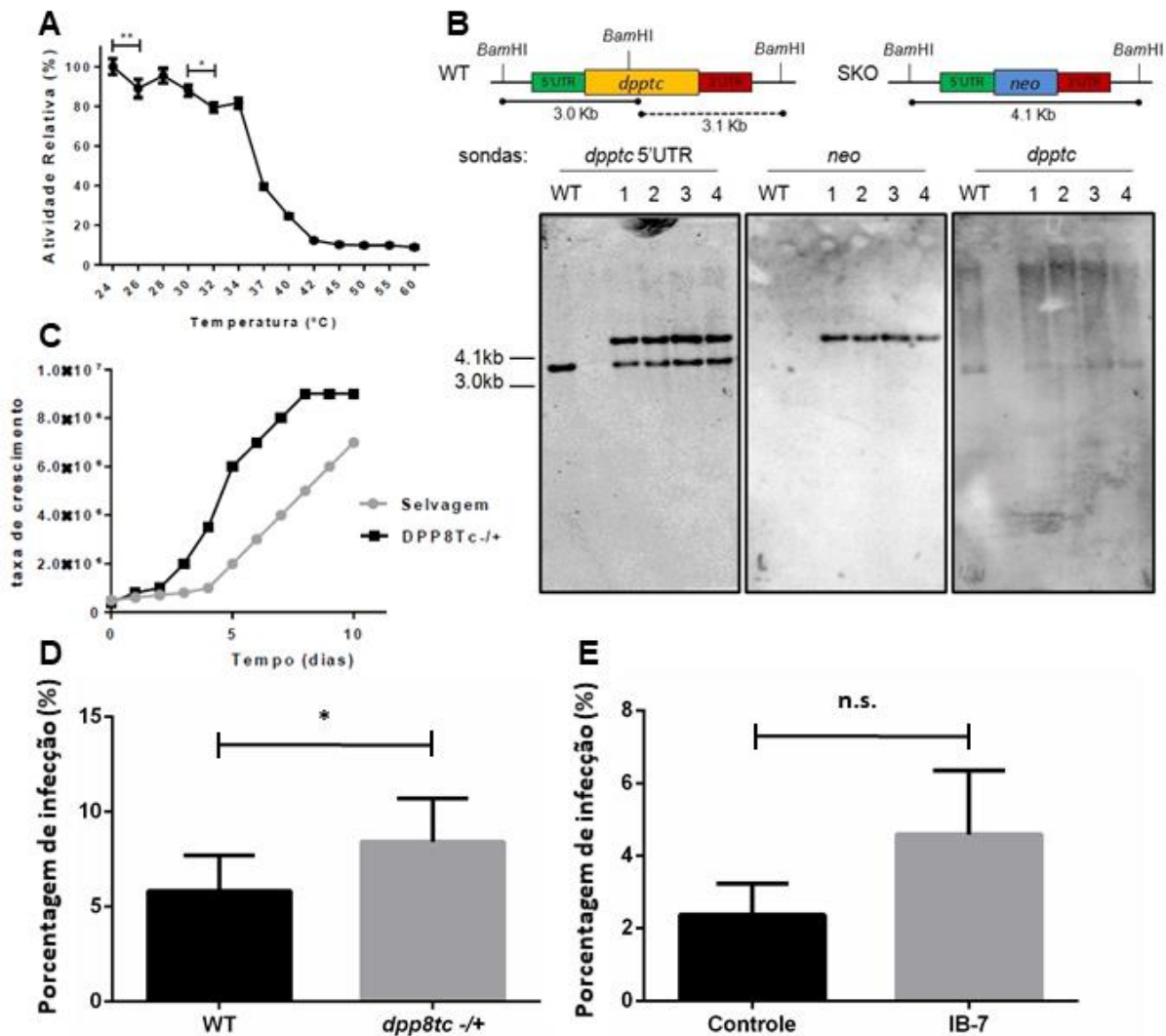


Figura 7. Resultados preliminares sobre a DPP8Tc e os parasitos simples nocaute. **A**, Avaliação da temperatura ótima da rDPP8Tc por ensaio de atividade enzimática. Dados mostrados como atividade relativa, com média \pm desvio padrão de experimento em triplicata. Diferença significativa avaliada por ANOVA, seguido de teste a *post hoc* de Tukey. **B**, Representação esquemática e análise por Southern Blot dos parasitos simples nocautes com sondas para região 5' UTR (marcação do alelo selvagem em 3 kb, e marcação no alelo nocauteado com 4,1 kb), gene *neo* (marcação no alelo nocauteado com 4,1 kb) e gene *dpp8tc* (marcação do alelo selvagem em 3 kb). **C**, Curva de crescimento dos parasitos selvagens e simples nocautes por 10 dias. **D**, Porcentagem de infecção dos parasitos selvagens e simples nocautes. **E**, Porcentagem de infecção dos parasitos selvagens sem tratamento (controle) ou tratados com inibidor (IB-7), específico para DPPs. Diferença significativa em D e E avaliada por teste T. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; n.s. – não significativo). Resultados presentes na tese de doutorado de (FIGUEIREDO, 2017).

Proteínas ligadoras de RNA (RBPs)

Estudos de proteoma realizados após o sequenciamento do genoma mostram que somente cerca de 30% das proteínas identificadas no *T. cruzi* foram encontradas nas

quatro formas do parasito. Isso indica que, para que essas proteases estudadas acima desempenhem seus importantes papéis nos processos celulares específicos, é necessária uma maquinaria de regulação pós-transcricional complexa que atua de acordo com a demanda celular de cada estágio de vida (ARAÚJO; TEIXEIRA, 2011). Portanto, outra classe de proteínas que se destaca por sua ação nesse distinto processo de regulação gênica em tripanossomatídeos, elucidado anteriormente, é a classe das RBPs.

As RBPs ou *RNA-binding proteins* são proteínas essenciais pra alta plasticidade celular e diferenças biológicas observadas no complexo ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Elas possuem domínios de ligação à RNAs e estão envolvidas em vários processos centrais para a célula. O processo de regulação da expressão gênica de tripanossomatídeos pode ser baseado no número de cópias de cada gene (sendo que proteínas mais necessária para o protozoário se apresentam, geralmente, em múltiplas cópias), ou na ordenação dos genes e comprimento das unidades de transcrição (pois quando a transcrição de um gene perto do promotor é inibida, pode afetar outros genes), todavia as RBPs atuam nos processos principais em múltiplos níveis. Sua interação com RNAs podem ter diversos propósitos, incluindo a coordenação e estabilização de complexos proteicos, processamento e maturação de mRNA, estabilidade dos transcritos e seu transporte e localização (BRINEGAR; COOPER, 2016; RE et al., 2014).

Grande variedade de RBPs são codificadas segundo dados do sequenciamento do genoma do protozoário *T. cruzi*. Essas podem regular não só o nível de mRNAs, mas também todo o metabolismo de RNA na célula. Esse fato permite explicar como a regulação nesse organismo é tão fortemente controlada durante seus estágios de vida. As RBPs possuem múltiplos domínios de ligação a RNA como motivo RRM (*RNA-binding domain*), KH (*K-homology*), entre outros (BACHORIK et al., 2008). Um interatoma de *T. cruzi* demonstrou a interação entre a RBP nucleolar RBSR1 e snoRNAs (pequenos RNAs nucleolares - *Small nucleolar RNAs*), sugerindo uma ação no processamento de RNA no núcleo (WIPPEL et al., 2018). Estudos sobre as interações entre RBP-RNAs podem elucidar o processamento, a transcrição, o transporte, a degradação e a tradução, bem como controlar a homeostase da célula e destino celular. Porém, um número limitado de

proteínas ligadoras à RNA foi caracterizado em *T. cruzi* (CLAYTON, 2016; M. L. QUEIROZ et al., 2018).

Uridine-Binding proteins (UBPs)

A família das RBPs mais bem caracterizadas em *Trypanosoma cruzi* é a família da UBPTc. Quando analisado a região 3'UTR dos mRNA dos seis membros dessa família, só é compartilhado 25% de homologia entre eles, sugerindo que são proteínas diferencialmente expressas durante o ciclo de vida, sendo a UBPTc, a mais expressa nas formas amastigotas e tripomastigotas, presentes no hospedeiro mamífero (ARAÚJO; TEIXEIRA, 2011).

As RBPs apresentam importante função na regulação de diversos processos, entre elas a UBPTc é uma RBP citosólica que atua na estabilização e degradação de mRNA, e na proteção de transcritos por recrutamento em grânulos citoplasmáticos (CASSOLA; FRASCH, 2009; KOLEV; ULLU; TSCHUDI, 2014). Estudos mostram que ela reconhece sítios presentes em transcritos de mucinas menores (SMUGTc), importantes para o processo de infecção, e forma complexos com a UBPTc para controlar sua expressão gênica de forma estágio específica (D'ORSO; FRASCH, 2002).

Outros estudos identificaram proteínas nas formas tripomastigotas sanguíneas, que podem se ligar a mRNAs com diferentes especificidades e modos de ação, podendo aumentar ou diminuir expressão de genes (ARAÚJO; TEIXEIRA, 2011). A interação entre RBPs e RNAs, como de UBPTc e mRNAs provavelmente depende de muitos fatores dinâmicos como abundância de transcrito, combinação de elementos em cis no 3'UTR, e as condições à qual a parasito está submetida (NOÉ; DE GAUDENZI; FRASCH, 2008).

Em estudo prévio com colaboração de nosso grupo, foi avaliado a relação entre as proteínas UBPTc e UBPTc nos mecanismos de resistência do tripanossomatídeo *T. brucei*, filogeneticamente próximo ao *T. cruzi*, ao antifúngico posaconazol (Izabela Bastos e John Kelly, dados não publicados). Esse medicamento apresentava promissora atividade antitripanossoma *in vitro*, entretanto, durante um estudo randomizado em pacientes chagásicos, foi observada falha no tratamento (FRANCISCO et al., 2015). As linhagens nocauteados pros genes da UBPT1 e UBPT2 apresentaram menor sensibilidade

ao medicamento, mostrando menor taxa metabólica (local de ação do medicamento), mas sem afetar a viabilidade do parasito. Os dados indicam a possível importante atuação dessas RBPs nos processos celulares e mecanismos de resistência a medicamentos desses tripanossomatídeos.

O mesmo foi observado em linhagens de *T. cruzi* nocauteadas (UBP1 ou UBP2) utilizando o sistema CRISPR-cas9, que se tornaram resistentes à ação do pozocanazol (dados não publicados). Porém a caracterização dessas linhagens de *T. cruzi*, mutadas para um dos alelos, precisa ser realizada quanto ao nível de expressão das proteínas UBP1 e/ou UBP2 e assim relacionadas ao efeito observado. Por esta razão, uma parte desse trabalho foi produzir anticorpos anti-UBP1 ou anti-UBP2, como ferramentas moleculares para auxiliar na análise desses mutantes.

Então o estudo dessa interação RBP-RNAs é importante para entender vias complexas como o processo de infecção, e esses produtos de interação RBPs-RNAs são altamente dinâmicos (ARAÚJO; TEIXEIRA, 2011; CLAYTON, 2013). As metodologias convencionais para análise dessa interação utilizam anticorpos para realização de uma co-imunoprecipitação das RBPs com seus RNAs ligados, e posterior ensaios de proteômica e sequenciamento do RNA. Novas metodologias têm sido criadas buscando obter dados desses complexos de forma menos enviesada como a técnica OOPS (*Orthogonal Organic Phase Separation*) (M. L. QUEIROZ et al., 2018). Adaptada do método AGCP (ou TRIzol[®]), ela realiza a estabilização do complexo RBP-RNAs de forma a manter ambas as características físico químicas, podendo ser retidos na interface de separação fenólica. Para utilização dessas metodologias, ferramentas de validação proteômica por meio das técnicas já estabelecidas como os anticorpos são necessárias.



JUSTIFICATIVA

JUSTIFICATIVA

A doença de Chagas existe em animais selvagens há milhões de anos, tendo sido encontrado o DNA de seu agente etiológico, *Trypanosoma cruzi*, em múmias de mais de 9.000 anos na região norte do Chile e sul do Peru (COURA; VIÑAS, 2010). Contudo, ainda nos dias de hoje ela se apresenta como um desafio para saúde pública, sendo relacionada a problemas socioeconômicos. Ela é classificada pela Organização Mundial de Saúde como uma das, aproximadamente, 20 doenças tropicais negligenciadas (*Neglected tropical diseases* – NTDs) (WHO, 2019).

Segundo a Organização Pan Americana de Saúde, existe uma incidência anual de 28.000 casos na região das Américas, e cerca de 65 milhões de pessoas vivem em áreas de exposição e com risco de aquisição da doença (PAHO; WHO, 2017). Nesta região, o número de mortes por ano ultrapassa as causadas pela malária, e pela Leishmaniose cutânea e visceral juntas. Anteriormente confinada a regiões pobres e rurais da América Latina, tem se alastrado para regiões não endêmicas graças a movimentos migratórios. Os medicamentos utilizados para seu combate não são satisfatórios e o desenvolvimento de novos se faz necessário, além de novas formas de combate da doença (DIAS, 2017; FIELD et al., 2017).

Portanto, o melhor entendimento de processos e proteínas importantes em diferentes estágios do seu ciclo celular, seu processo de regulação gênica e quais moléculas estão envolvidas é de interesse. Dessa forma, o presente trabalho busca contribuir para o conhecimento sobre a importância e função da proteína dipeptidil peptidase 8 de *T. cruzi*, assim como prover ferramentas para posteriores estudos acerca das UBPs 1 e 2 do protozoário.



OBJETIVOS

OBJETIVOS

O propósito desta dissertação de mestrado foi aprofundar os conhecimentos já obtidos acerca da proteína dipeptidil peptidase 8 de *T. cruzi*, por meio da caracterização de mutantes simples obtidos em trabalho anterior (FIGUEIREDO, 2017), assim como utilizar a metodologia de edição gênica, CRISPR-Cas9, para obtenção de mutantes nulos. Além disso, foram produzidas ferramentas para as UBPs 1 e 2, que serão importantes posteriormente para validação de estudos proteômicos, visando o melhor entendimento sobre o processo de regulação gênica e as moléculas envolvidas durante o momento da infecção. Portanto, as seguintes etapas foram realizadas:

1. Dipeptidil peptidase 8:

- 1.1. Avaliar a capacidade de diferenciação dos mutantes simples, nas formas tripomastigotas metacíclicas, em comparação aos parasitos selvagens.
- 1.2. Examinar diferenças metabólicas, com ênfase na quantificação de prolina, nos meios intra e extracelulares de mutantes em relação aos parasitos selvagens através de RMN.
- 1.3. Analisar o nível de expressão da DPP8*Tc* e outras serino proteases de sua família, nos parasitos mutantes.
- 1.4. Verificar a citolocalização e o nível de expressão por fluorescência entre as formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas em parasito selvagens.
- 1.5. Utilizar a metodologia de CRISPR-Cas9, por meio da clonagem do sgRNA, amplificação de cassete de homologia e transfecção, buscando o nocaute gênico de ambos os alelos.

2. UBPs 1 e 2:

- 2.1. Expressar e purificar as UBP1*Tc* e UBP2*Tc* de forma heteróloga em sistema procarioto.
- 2.2. Produzir anticorpos policlonais para imunomarcação, citolocalização e estudos posteriores.



METODOLOGIA

METODOLOGIA

Cultura de células

As formas epimastigotas selvagens de *T. cruzi*, cepa CL-Brener, foram cultivadas em meio *Liver Infusion Tryptone* (LIT) suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino inativado por calor (SBF) e gentamicina (150 µg/mL) a 28 °C. Os parasitos mutantes deficientes em dipeptidil peptidase 8, clones C8 e F9 obtidos anteriormente (FIGUEIREDO, 2017), foram cultivados nas mesmas condições com adição de 150 µg/mL do antibiótico de seleção G418 (geneticina - InvivoGen). As formas metacíclicas foram obtidas pelo procedimento de metaciclogênese *in vitro*, descrito posteriormente.

Extratos proteicos de parasitos

Os extratos proteicos solúveis de formas epimastigotas de *T. cruzi* foram obtidos coletando os parasitos por centrifugação a 1.000 g por 10 min. Esses foram lavados três vezes com tampão fostafo-salino (*Phosphate Saline Buffer* – PBS), e o sedimento de células foi ressuspensionado em PBS contendo coquetel inibidor de protease (*cOmplete™ Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* – Roche) para uma concentração de 1×10^6 parasitos/µL. A lise celular foi realizada por três ciclos de congelamento e descongelamento, e a separação dos extratos solúveis e insolúveis se deu a 16.000 g por 20 min. O extrato solúvel coletado para análise em SDS-PAGE com 1×10^7 parasitos/poço.

Análises por *Western Blot*

Os extratos solúveis das amostras foram aquecidos por 5 min a 95 °C (para identificação da DPP8Tc e primeiros experimentos com as UBPs 1 e 2 de *T. cruzi*) ou a 70 °C (para o último experimento das UBPs 1 e 2 de *T. cruzi*, buscando evitar a possível formação de agregados de proteínas ocasionados por fervura e problemas na entrada das proteínas recombinantes em gel de poliacrilamida) em tampão Laemmli (2% de SDS,

10% de glicerol, 5% de β -mercaptoetanol, 0,002% de azul de bromofenol, 125 mM de Tris HCl, pH 6.8) (Laemmli, 1970). Para controle positivo foram utilizadas 50 ng das proteínas recombinantes em mesmas condições de preparo. As amostras foram submetidas a SDS-PAGE com 10% ou 15% (v/v) acrilamida/bis-acrilamida, para DPP8Tc e UBPsTc respectivamente.

Realizou-se a transferência das proteínas para membranas de nitrocelulose Amersham™ Protran™ (GE Healthcare) a 350 mA por 1h30, utilizando sistema Mini Trans-Blot® (Bio-Rad) de transferência em tanque, submerso em tampão 48 mM Tris pH 9,2, 39 mM glicina, 0,037% (m/v) SDS e 20% (v/v) metanol. Após transferência, as membranas foram bloqueadas com solução contendo 5% (m/v) leite desnatado em *Tris-Buffered Saline* (TBS, 50 mM Tris pH 7,5 e 150 mM NaCl) por 30 min, e incubadas a 4 °C por 16 h com anticorpo primário em 0,1% (v/v) TBS-Tween 20 (TBST) contendo 1% (m/v) leite desnatado, com diluições: 1:50 anticorpo policlonal anti-POP Tc80, 1:100 anticorpo policlonal anti-DPP8Tc, anti-X-PDAP Tc, anti-TAT (tubulina), anti-UBP1Tc e anti-UBP2Tc; 1:200 anticorpo policlonal anti-Oligo B e 1:2000 anticorpo policlonal anti-His (Sigma Aldrich). Em seguida, foram lavadas sete vezes por 5 min com TBST e incubadas por 1 h com anticorpo secundário *goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase conjugated* (1:30.000) em TBST 1% (m/v) leite desnatado.

A membrana foi lavada novamente por cinco vezes e a imunomarcação observada por quimioluminescência utilizando o substrato de peroxidase *ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare) no equipamento ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare). Os anticorpos anti-DPP8Tc (FIGUEIREDO, 2017), anti-POP Tc80 (SILVA, 2018), anti-X-PDAP Tc (DE ALMEIDA, 2009) e anti-Oligo B (não publicado) foram produzidos em trabalhos anteriores e cedidos para realização dos experimentos descritos.

O processo de remoção dos complexos de anticorpos ligados e reincubação foi realizado da seguinte maneira: A membrana foi incubada com tampão de *Stripping* 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% (m/v) SDS, 100 mM de β -mercaptoetanol por 30 min a 50 °C com ocasional agitação, lavada três vezes com TBS, e prosseguiu-se com os processos de bloqueio e incubação descritos acima.

Imunofluorescências

Para determinar a citolocalização das UBPs de *T. cruzi*, e observar a diferença de expressão da DPP8*Tc* em parasitos selvagens nas formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas, bem como nos parasitos selvagem e mutantes nas formas epimastigotas, os parasitos em questão foram coletados por centrifugação a 1.000 g por 10 min e lavados duas vezes com PBS filtrado, sendo ressuspensos em 200 µL de solução de 1% (v/v) formaldeído em PBS por 30 min para fixação. Os parasitos foram permeabilizados com 0,1% (v/v) Triton X-100 em PBS por 10 min, seguido de incubação com 100 mM de glicina por igual período de tempo. Coletou-se os parasitos por centrifugação, ressuspensando em cerca de 50-200 µL de PBS.

As lâminas foram lavadas previamente 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, observando-se a densidade em microscópio invertido de luz. O bloqueio foi realizado por 5 min com TB – PBS, 0,1% (v/v) Triton X-100, 0,1% (m/v) BSA. Para imunomarcção, os anticorpos primários anti-DPP8*Tc*, anti-UBP1*Tc* e anti-UBP2*Tc* foram depositados nas lâminas e incubados por 1 h a temperatura ambiente ou 16 h a 4 °C, na diluição de 1:100 em TB. As lâminas foram lavadas três vezes com PBS e incubadas por 1 h a temperatura ambiente com anticorpo secundário *goat anti-mouse IgG* Alexa Fluor 488 (Invitrogen) no escuro. As lâminas foram novamente lavadas, e os parasitos incubados com 10 µg/mL DAPI por 5 min. Em seguida as lamínulas foram montadas utilizando uma gota de DAKO *Fluorescence Mounting Medium* (DAKO).

O anticorpo anti-DPP8*Tc* foi produzido em trabalho anterior e cedido para realização dos experimentos descritos (FIGUEIREDO, 2017). As imagens referentes a marcação para DPP8*Tc* foram adquiridas em microscópio de confocal *no Centre de Microscopie de fluorescence et d'IMagerie numérique (CeMIM)*, com apoio financeiro da COFECUB. Essa imagens representam a sobreposição de várias *z-sections* correspondendo ao conteúdo total dos parasitos observados. As imagens de marcação para as UBPs foram obtidas em microscópio de fluorescência invertido Eclipse Ti-E (Nikon).

Metaciclogênese *in vitro* dos parasitos selvagens e clones C8 e F9

Os parasitos selvagens e o clones mutantes C8 e F9, nas suas formas epimastigotas em final de fase exponencial, foram coletados por centrifugação a 1.000 g por 10 minutos e submetidos a estresse, incubando-os em meio TAU (*Triatomine Artificial Urine*) por 2 horas a 28 °C, em densidade celular de 5×10^8 parasitos/mL. Posteriormente, os parasitos foram incubados a 28 °C por 96 h, em meio TAU3AAG (meio TAU suplementado com 10 mM de L-prolina, 50 mM de L-glutamato de sódio, 2 mM de L-aspartato de sódio e 10 mM de glicose) a uma densidade de 5×10^6 parasitos/mL, em garrafas de cultura na horizontal para permitir a aderência dos parasitos. Os tripomastigotas metacíclicos foram obtidos a partir do sobrenadante da cultura, coletados por centrifugação a 3000 g por 10 min, lavados três vezes com PBS filtrado, fixados e permeabilizados de acordo com protocolo de imunofluorescência. O ensaio foi realizado em triplicata, e para quantificação, depositou-se os parasitos sobre lâminas tratadas com solução 0,1% (m/v) poli-L-lisina, seguindo de incubação com 10 µg/mL de DAPI por 5 min.

Foram contados 300 parasitos por réplica em microscópio de fluorescência invertido Eclipse Ti-E (Nikon), identificando os tripomastigotas metacíclicos totalmente diferenciados por meio do formato arredondado do cinetoplasto e sua disposição posterior em relação ao núcleo. Os dados foram apresentados como médias das porcentagens e representados graficamente no programa GraphPad Prism 6.

Quantificação de prolina e metabólitos por RMN (Ressonância Magnética Nuclear) dos parasitos selvagens e clones C8 e F9

Os experimentos de RMN foram realizados em colaboração com a Prof.^a Dra. Aline Lima de Oliveira do Laboratório de Química Metodológica Orgânica Sintética (LaQMOS) do Instituto de Química e sob o acompanhamento e orientação do Dr. Marcos Rodrigo Alborghetti do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas do Instituto de Biologia, ambos da Universidade de Brasília.

Epimastigotas de linhagem selvagem e do clone C8 foram cultivados inicialmente a 5×10^6 parasitos/mL em 180 mL de meio LIT por 9 dias. Foram analisadas amostras



coletando os parasitos por centrifugação a 2.000 g por 2 min, após três, seis e ao final dos nove dias. O meio dos parasitos contendo os metabólitos extracelulares foi coletado e diluído pela metade em água deuterada (D₂O), e os parasitos foram lavados cinco vezes com PBS estéril e ressuspensos em 600 µL de D₂O. O extrato celular foi obtido através de lise por três ciclos de congelamento, em nitrogênio líquido por 30 s, e descongelamento, a 42 °C por 2 min. A fração solúvel foi separada por centrifugação a 20.000 g por 2 min. As amostras foram filtradas em Amicon® Ultra 3K (Merck Milipore) a 10.000 g por 45 min, previamente limpo por cinco etapas de lavagem com água ultrapura para remover o glicerol da membrana. Posteriormente, foram tamponadas com 10 mM de fosfato de sódio e adicionadas de 0,1 mg/mL de DSS (ácido 4,4-dimetil-4silapentano-1-sulfônico) como padrão interno para referência de mudança química (definido como 0 ppm).

As amostras foram transferidas para tubos de RMN de 5 mm (Norell® Standard Series™, Sigma Aldrich), e analisadas em Espectrômetro Ascend™ de 14 T (600 MHz para a frequência do hidrogênio) (Bruker) a temperatura de 298 K. Os espectros foram adquiridos usando uma sequência de pulso de saturação noesygprr-1D (denominação bruker) para suprimir o sinal da água. Adquiriu-se com 256 premediações (ns), usando tempo de aquisição de 4 s e tempo de espera para cada aquisição de 1,5 s (d1). O processamento, identificação e quantificação dos metabólitos dos espectros foram realizados usando o pacote de aplicação Chenomx NMR Suite e a abordagem de *target profiling* (Chenomx), utilizando-se o DSS como referência. Todas as concentrações dos metabólitos, exceto a do DSS foi normalizada pela quantidade de parasitos e pelo fator de diluição, quando esta ocorreu.

Desenho e clonagem do sgRNA para nocaute por CRISPR-Cas9

Como estratégia para tentativa de obtenção de parasitos mutantes nulos para o gene *dpp8tc*, foi utilizada a metodologia de CRISPR-Cas9. Portanto, um sgRNA foi desenhado através de uma ferramenta customizada EuPaGDT (<http://grna.ctegd.uga.edu>), selecionando o melhor sgRNA para guiar o corte pela endonuclease Cas9 no gene *dpp8tc* com base em região conservada para os dois alelos

TcCLB 510183.20 e TcCLB.503637.30 depositados no GeneDB (www.genedb.org). Os critérios utilizados foram o seu *score*, a não existência de *off-targets* e não formação de estruturas secundárias do tipo *hairpin*. Com base na sequência de reconhecimento específica do sgRNA, selecionada com auxílio da ferramenta de bioinformática, foram desenhados um iniciador senso denominado *DPP8TC_576_sgRNA-scaffold-fwd*, contendo a sequência protoespaçadora específica, e um antisenso denominado *sgRNA-scaffold-Commom-rvs* (Tabela 1), para amplificação da parte estrutural ou *backbone* do sgRNA de 82 pb a partir do plasmídeo pUC_sgRNA (Figura 8). Ambos iniciadores possuem sítios de restrição para *Bam*HI para posterior clonagem em plasmídeo pTREX-n/Cas9 (Figura 9A).



Figura 8. Mapa do vetor pUC_sgRNA utilizado para amplificação do sgRNA. Plasmídeo contendo a sequência gênica do *gRNA scaffold* que corresponde a região do crRNA de reconhecimento da Cas9. Obtido do site Addgene.

A amplificação do sgRNA completo ocorreu por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando 25 ng do vetor pUC_sgRNA, 300 nM de cada iniciador, e *Phusion Flash PCR Master Mix* (Thermo Fisher) para reação de 50 μ L com o seguinte programa: desnaturação inicial a 98 °C por 10 segundos, 30 ciclos de desnaturação a 98 °C por 1

segundo, anelamento a 52 °C por 10 segundos e extensão a 72 °C por 3 segundos, com extensão final a 72 °C por 1 min.

O produto de PCR, contendo a sequência de DNA do sgRNA completo, de cerca de 120 pb foi digerida com a enzima de restrição *Bam*HI (Jena Bioscience), assim como o plasmídeo pTREX-n/Cas9 para linearização e posterior clonagem do inserto. O sgRNA foi purificado com kit *QIAquick® Gel Extraction Kit* (Qiagen) e o plasmídeo pTREX-n/Cas9 foi purificado com kit *PureLink™ Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo Kit* (Thermo Fisher). Ambos os resultados foram observados em gel de agarose 0,8% (m/v). O inserto (sgRNA) e 100 ng do vetor pTREX-n/Cas9 foram ligados para clonagem pela ação da enzima T4 DNA ligase (Promega) na razão 5:1 por 16 h a 4 °C (Figura 9B).

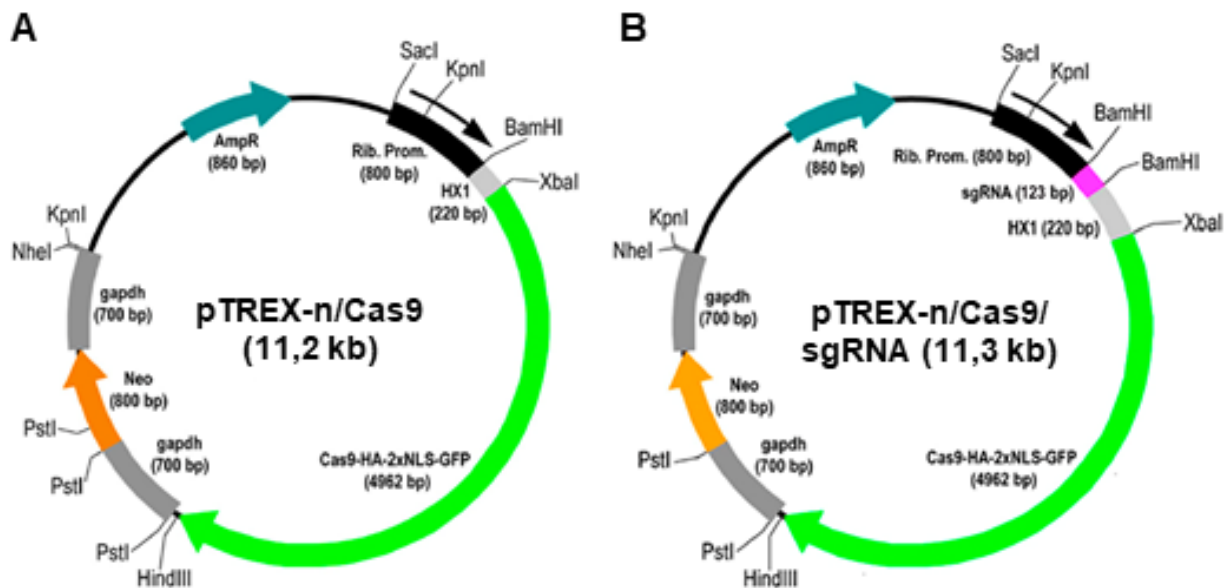


Figura 9. Representação esquemática dos vetores. A, plasmídeo pTREX-n/Cas9 com sítio de restrição para *Bam*HI. B, plasmídeo com gene do sgRNA clonado, formando o vetor pTREX-n/Cas9/sgRNA.

Transformação bacteriana e confirmação de clonagem do sgRNA no pTREX-n/Cas9

O vetor proveniente da ligação, pTREX-n/Cas9/sgRNA, foi transformado em bactérias *E. coli* TOP10 quimicamente tratadas para se tornarem competentes a receber DNA exógeno. Foi utilizado 2 µL de ligação, e realizado choque térmico a 42 °C por 45

segundos seguido de incubação no gelo por 2 min. As células foram cultivadas em 1 mL de meio Luria-Bertani (LB) a 37 °C por 1 h, e plaqueadas em meio LB ágar contendo 100 µg/mL de ampicilina a 37 °C por 16 h. As colônias foram selecionadas e inoculadas em 2 mL de meio LB com 100 µg/mL de ampicilina, e foi realizada uma PCR de colônia para identificação de clones que tiveram o sgRNA inserido na orientação correta no plasmídeo, utilizando os primers *DPP8TC_576_sgRNA-scaffold-fwd* para o sgRNA e *HX1_rvs* (Tabela 1) que amplifica uma região do plasmídeo pTREX-n/Cas9, com produto de tamanho esperado de cerca de 200 pb.

Tabela 1. Iniciadores utilizados para metodologia de CRISPR-Cas9.

INICIADORES	SEQUÊNCIA
DPP8TC_576_sgRNA-scaffold-fwd	5' GATCggatcc <u>GTATTGCAACTGTCGTGGAGCGTTTTAGAG</u> CTAGAAATAGC 3' ^{a, b}
sgRNA-scaffold- Commom-rvs	5' CAGTggatccAAAAAGCACCGACTCGGTG 3' ^a
HX1_rvs	5' TAATTCGCTTTCGTGCGTG 3'
DPP8Tc_ultramer _fwd	5' CTTTGGCGATAGGAAGAGGCCGTTTCTGTCTCCAGC ACCTCCAGTACCCTGAAAAGCCCGGAAGCACAGGGGGA ATGCCGGACGGTCA <i>GAAACATTTTCACGCACGAAA</i> 3' ^c
DPP8Tc_ultramer_rvs	5'ATGTATCGGTGTA <i>ACTGAACAATACATAATTCTCCGTGG</i> CGTAGTGTCTGTGTAGCGACCAA <i>ACTCCTCTTGATAAT</i> GTAATCGGCTGTTCCACATT <i>ACTATTTTCTTTGATGAAA</i> <i>GGG</i> 3' ^d

^a As sequências em letras minúsculas indicam o sítio de restrição de *Bam*HI.

^b A sequência sublinhada indica a região de reconhecimento específica do sgRNA (protoespaçadora).

^c A sequência em negrito e itálico corresponde a sequência de reconhecimento ao gene *hx1*.

^d A sequência em negrito e itálico corresponde a sequência de reconhecimento ao gene *tub*.

As colônias selecionadas foram palitadas e colocadas em 10 µL de água ultrapura, incubando a 90 °C por 10 min. Além das bactérias lisadas, foi utilizado para a reação 500 nM de cada iniciador, 200 µM dNTP, 1,25 U de *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen), 1,5 mM MgCl₂, e tampão 10X para reação de 25 MI. As condições da reação foram desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, desnaturação a 94 °C durante 45 segundos,

anelamento a 55 °C por 30 segundos e extensão na temperatura de 72 °C por 30 segundos, repetindo por 36 ciclos, com extensão final a 72 °C durante 10 min.

O resultado foi analisado em gel de agarose 0,8% (m/v) e a colônia positiva 2 foi pré-inoculada em 5 mL de meio LB com 100 µg/mL de ampicilina a 37 °C por 3 h, e inoculada em 200 mL de meio LB com 100 µg/mL de ampicilina a 37 °C por 16 h. Foi então realizado preparação de DNA plasmidial por meio do kit *PureLink® HiPure Plasmid Midiprep* (Invitrogen).

Amplificação de cassete para reparo por Homologia (HDR) utilizando ultrâmeros

A produção do cassete para guiar um reparo por homologia direta (HDR) foi realizada pela amplificação por PCR a partir do plasmídeo *pgem-hx1-hyg-tub* produzido anteriormente (SILVA, 2018), e com a utilização de iniciadores com sequência de aproximadamente 100 pb correspondentes aos ultrâmeros para o gene da *dpp8tc* e sequências para amplificação do cassete nas regiões do gene *hx1* e *tub*, *DPP8Tc_ultramer_fwd* e *DPP8Tc_ultramer_rvs* respectivamente (Tabela 1). Os ultrâmeros foram desenhados em regiões adjacentes a sequência de reconhecimento do sgRNA e de corte da enzima Cas9, em regiões conservadas para ambos os alelos. A reação foi realizada utilizando a *Phusion Flash High Fidelity PCR Master Mix* (Thermo Fisher) para um volume de 25 µL, 400 nM de cada iniciador e 25 ng de DNA plasmidial. Foram realizadas 10 reações nas condições a seguir: 98 °C por 10 segundos de desnaturação inicial, desnaturação a 98 °C por 1 segundo, anelamento a 57 °C por 15 segundos e extensão a 72 °C por 26 segundos por 30 ciclos, com extensão final a 72 °C por 1 min, gerando um produto *ult-hx1-hyg-tub-ult* de tamanho esperado de cerca de 1695 pb analisado em gel de agarose 0,8% (m/v).

Transfecção com pTREX-n/Cas9/sgRNA e cassete *ult-hx1-hyg-tub-ult*

O cassete *ult-hx1-hyg-tub-ult* obtido por PCR foi purificado com igual volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), vortexando por 1 min para formação de

emulsão e centrifugando a 16.000 *g* por 2 min. A fase aquosa foi cuidadosamente coletada, e precipitada com 2,5 V de etanol absoluto gelado e 1/10 V de Acetato de Sódio 3M (pH 4,8), misturando três vezes por inversão e incubando a -20 °C por 20 min. O cassete foi centrifugado a 16.000 *g* por 30 min, o sedimento correspondente ao DNA foi lavado com 1 mL de etanol 70% (v/v) gelado e centrifugado novamente a 16.000 *g* por 5 min. O DNA foi seco em ambiente estéril e ressuspendido em água ultrapura. Da mesma forma descrita acima, o pTREX-n/Cas9/sgRNA, replicado em bactéria e extraído por preparação plasmidial, foi precipitado.

Para transfecção, o cassete e o pTREX-n/Cas9/sgRNA foram pasteurizados a 65 °C por 30 min. Cultura de epimastigotas selvagens foram lavadas uma vez com PBS estéril e 4 x 10⁷ parasitos/condição foram coletados a 2.000 *g* por 15 min, ressuspendidos em 400 µL de tampão de eletroporação gelado (CITOMIX - 120 mM KCl, 0,15 mM CaCl₂, 10 mM K₂HPO₄, 25 mM HEPES, 2 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, pH 7,6) e transferidos para cubetas de eletroporação de 4 mm de espessura. Foram realizadas duas condições de eletroporação onde os parasitos selvagens da cepa CL-Brener foram transfectados somente com o pTREX-n/Cas9/sgRNA, ou com o pTREX-n/Cas9/sgRNA juntamente com o cassete *ult-hx1-hyg-tub-ult*, tendo sido adicionados 25 µg de cada (não ultrapassando 10% do volume de células). Como controle negativo, parasitos foram eletroporados sem a presença de plasmídeo ou cassete.

As células foram incubadas no gelo por 10 min, e submetidas a três pulsos utilizando o sistema *Gene Pulser X cell*TM (Bio-Rad) a 1,5 kV e 25 µF, e resistência ao infinito, deixando as cubetas por 1 min no gelo entre os pulsos. As células ficaram se recuperando por 15 min a temperatura ambiente, e então foram transferidas para 5 mL de meio LIT suplementado com 20% (v/v) SFB inativado, sendo incubadas a 28 °C por 24 h. Os parasitos foram selecionados pelo acréscimo de 100 µg/mL de G418 aos que receberam o plasmídeo pTREX-n/Cas9/sgRNA, e 100 µg/mL de higromicina B (InvivoGen) aos que receberam o cassete *ult-hx1-hyg-tub-ult*. A cultura controle negativo recebeu mesma adição de antibiótico, onde sua morte define o marco do final da seleção. Paralelamente, os parasitos foram clonados em placas de 48 poços sobre a pressão antibiótica por igual período de tempo.

Confirmação de integração do cassete por PCR

A avaliação se ocorreu integração genômica do cassete *ult-hx1-hyg-tub-ult* foi feita por PCR utilizando *Phusion Flash PCR Master Mix* (Thermo Fisher) com esquema da correta integração na Figura 10. O DNA genômico de 1 mL de cada cultura foi extraído de acordo com protocolo a seguir. Os parasitos foram coletados por centrifugação a 1000 g por 10 min, lavados duas vezes com PBS. Ressuspendeu-se em 200 μ L de tampão de lise (10 mM Tris pH 8,0, 50 mM NaCl, 50 mM EDTA, 1 % (p/v) SDS) e adicionou-se 20 μ g/mL de RNase A, incubando por 30 min a 60 °C. Em seguida, adicionou-se 100 μ g/mL de Proteinase K por 1h a 56 °C. Foi realizada duas etapas de purificação com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e precipitação com acetato de sódio como descrito anteriormente.

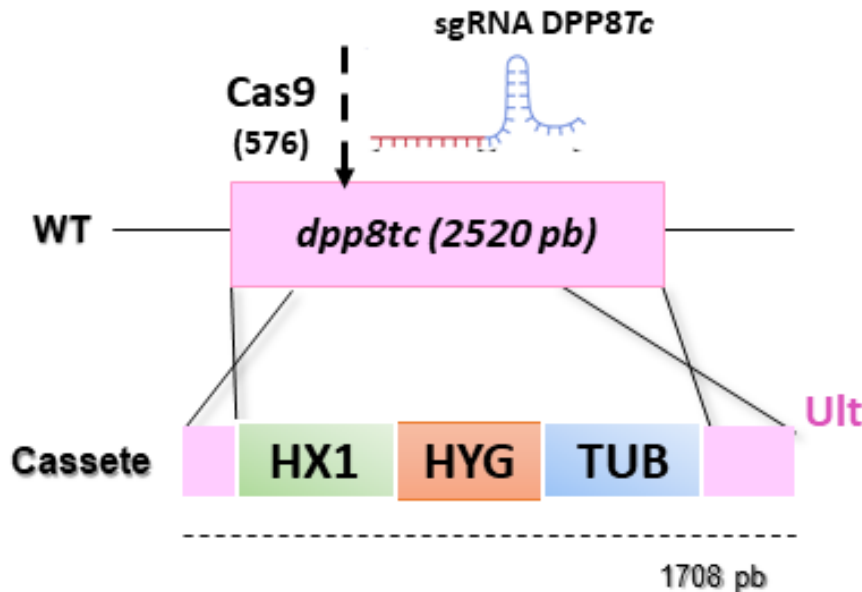


Figura 10. Esquemática da correta integração do cassete no locus gênico da *dpp8tc*. A seta tracejada indica o local de corte pela Cas9 na posição 576, três nucleotídeos antes do PAM. O cassete de 1708 pb está representado com as regiões em rosa correspondendo aos braços de homologia gerados por meio da amplificação com ultrâmeros (Ult). HX1, sequência intergênicas. HYG, gene de resistência ao antibiótico higromicina, *hygromicina fosfotransferase*. TUB, gene da β tubulina de *T. brucei*.

Cerca de 100 ng de DNA genômico foi utilizado em reações de 25 μ L com 500 nM de cada iniciador com diferentes combinações (Tabela 2 e Figura 11). Foi testada igual condição utilizada antes para essa enzima, com modificação de 56 °C por 5 segundos de

anelamento, e tempo de extensão de 40 segundos. Também foi utilizada uma condição modificada com tempo de desnaturação inicial de 1 min, desnaturação de 30 segundos, anelamento a 58 °C por 15 segundos, extensão por 1 min e extensão final por 2 min.

Tabela 2. Iniciadores para Confirmação de Integração de Cassete.

INICIADORES*	SEQUÊNCIA
DPP8Tc255_fwd	5' GTCCAAGGAGGAGGAATTAC 3'
DPP8Tc1393_rvs	5' CCGCATTGCCATGAATACC 3'
HX1_fwd_NheI	5' gctagcGAAACATTTTCACGCACGAAA 3' ^a
Tub_rvs_EcoRV_ClaI	5' atcgat gatatcACTATTTTCTTTGATGAAAGGG 3' ^b
Hyg_HindIII_fwd	5' aagcttATGAAAAGCCTGAACTCACCG 3' ^c
Hyg_XhoI_rvs	5' ctcgagCTATTCCTTTGCCCTCGGAC 3' ^d

^a A sequência em letra minúscula indica o sítio de restrição para *NheI*.

^b A sequência em letra minúscula e negrito indica o sítio de restrição para *ClaI*.

^c A sequência em letra minúscula indica o sítio de restrição para *HindIII*.

^d A sequência em letra minúscula indica o sítio de restrição para *XhoI*.

* Cores representam sequência nos esquemas de amplificação (Figura 11).

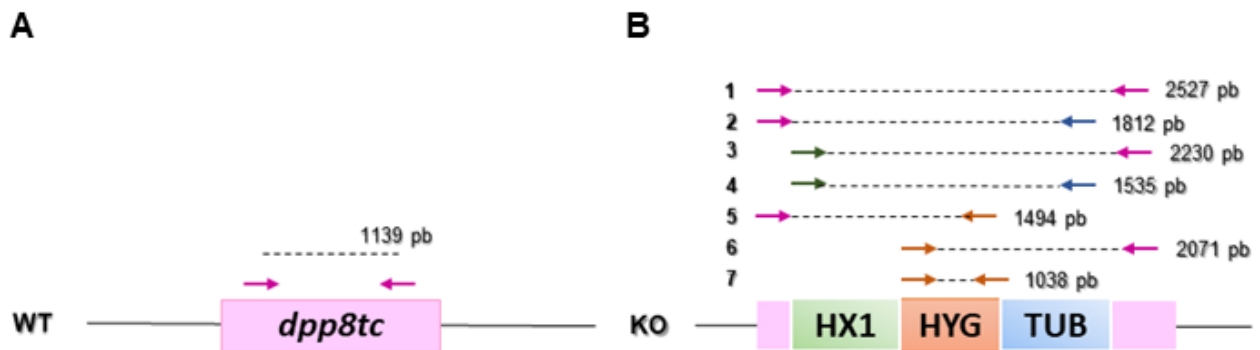


Figura 11. Representação esquemática das regiões de amplificações dos iniciadores desenhados. **A**, representação dos tamanhos amplificados com os iniciadores para o gene *dpp8tc* no alelo selvagem. **B**, representação dos tamanhos amplificados com os iniciadores descritos na tabela 2, caso ocorra integração do cassete no locus de *dpp8tc*.

Expressão da rUBP1 Tc e rUBP2 Tc e purificação

As sequências das *ubp1tc* e *ubp2tc* foram sintetizadas e clonadas no vetor pET100DT (Invitrogen) por empresa particular, e os vetores foram transformados em *E.*

coli BL21 (DE3). As bactérias transformadas foram crescidas em meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina até atingir densidade óptica de 0,6 a 600 nm. As culturas foram então induzidas a expressar as proteínas com adição de 0,5 mM de IPTG (isopropil-1-β-D-galactopiranosídeo) a 37 °C por 4 h, sob constante agitação. As bactérias foram centrifugadas a 3.000 g por 20 min e a lise bacteriana foi realizada com reagente Bug Buster® (Novagen) sob agitação por 10 min. Foram realizadas tentativas de purificação a partir da fração solúvel, porém as proteínas estavam concentradas na fração insolúvel, portanto foi realizado procedimento de purificação a partir de corpos de inclusão. Após lise, centrifugou-se a 3.000 g por 20 min a 4 °C, e o sedimento celular foi ressuscitado novamente em Bug Buster® (Novagen). Foi adicionado 200 µg/mL de Lisozima, vortexado, incubado por 5 min a temperatura ambiente e acrescentou-se 6 V de Bug Buster diluído 1:10. A suspensão foi centrifugada a 16.000 g por 15 min a 4 °C e os corpos de inclusão foram lavados por três vezes com Bug Buster (1:10). Por fim, o sedimento foi ressuscitado em *binding buffer* (0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 5 mM imidazol, pH 7,9) com adição de 6 M de uréia (agente desnaturante).

Os extratos foram passados em coluna níquel-agarose His•Bind® *Purification Kit* (Sigma) previamente equilibrado com *binding buffer* contendo uréia. Foram realizadas lavagens com tampão contendo agente desnaturante e concentrações crescentes de imidazol (5 a 20 mM) e as proteínas foram eluídas entre 30 a 50 mM. O resultado da purificação foi analisado em gel SDS-PAGE 15 ou 17% (v/v) acrilamida/bis-acrilamida.

Produção de anticorpos policlonais anti-UBP1 Tc e anti-UBP2 Tc

Quatro camundongos da linhagem BALB/c foram utilizados para produção de anticorpos policlonais. Antes da primeira imunização, foi coletado o sangue por meio de punção ocular e o soro pré-imune foi diluído pela metade em glicerol e estocado a -20 °C. Foram realizados quatro ciclos de imunizações realizadas via intraperitoneal com intervalo de 15 dias entre eles. Para cada imunização foram utilizados 5 µg de proteína recombinante/cada camundongo, formando uma emulsão com adjuvante (1:1). A primeira imunização contou com adjuvante completo de Freund, as duas seguintes com adjuvante incompleto, e a última contou somente com as proteínas diluídas em PBS. O

sangue de cada camundongo foi coletado após sete dias da última imunização, incubado a 37 °C por 1 h, o soro imune foi separado por centrifugação, diluído pela metade em glicerol e também estocado a -20 °C.

Gráficos e análises de dados

Para representação gráfica e análise estatística dos dados, foi utilizado o software GraphPad Prism versão 6.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California EUA, www.graphpad.com). Para determinar se houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, foram realizadas análises de variância (“One-way ANOVA”), seguidas por teste a *post hoc* de Tukey ($P < 0,05$). Os dados são mostrados em valores de média \pm desvio padrão, e os asteriscos identificam os grupos que não apresentaram diferenças significativas entre eles, com nível de significância informados em suas legendas. Os dados de quantificação para microscopia de fluorescência foram analisados quanto a sua normalidade por teste de Shapiro-Wilk, e os asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos por teste T.

Informações de densitometria, quando apresentadas, foram obtidos por meio do programa ImageJ (NIH), com normalização a partir da densidade de proteínas totais por marcação controle (contra tubulina – anti-TAT), e em unidade de abundância relativa ao parasito selvagem (*wild type* - WT). A quantificação de unidades de fluorescência arbitrária das imagens de imunofluorescência também foram realizadas por meio do programa FIJI

Aspectos éticos

Os ensaios realizados com utilização de animais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Brasília (CEUA/UnB), por meio do projeto nº 27764/2016.



RESULTADOS

RESULTADOS

Análise da metaciclo gênese *in vitro* dos mutantes para DPP8Tc

Resultados obtidos em trabalho anterior evidenciam que, o simples nocaute da dipeptidil peptidase 8 de *Trypanosoma cruzi* surpreendentemente levou a um aumento da capacidade infectiva do protozoário na forma tripomastigota (FIGUEIREDO, 2017). Esse dado seria contrário ao que se poderia esperar caso fosse essencial para esse processo de invasão das células do hospedeiro humano. Ademais, sua caracterização bioquímica demonstrou uma temperatura ótima a 28 °C, temperatura existente no hospedeiro invertebrado, e uma drástica diminuição da atividade enzimática a 37 °C, temperatura do hospedeiro mamífero. Observa-se então, uma maior atuação e possível importância dessa protease nas formas de vida que habitam o inseto barbeiro.

Ainda, tendo em vista que a enzima de interesse é uma serino protease que cliva dipeptídeos pós prolina, ela pode ter uma atuação em conjunto com outra enzima para geração de prolina livre no meio. Uma aminopeptidase poderia estar clivando os dipeptídeos liberados pela DPP8Tc, gerando prolina livre. Sabe-se que, conforme BARISÓN et al. (2017), aminoácidos livres como aspartato, glutamato e principalmente prolina são importantes durante o processo de diferenciação de formas epimastigotas para formas tripomastigotas metacíclicas, que ocorre no intestino posterior do vetor. Então, foi almejado avaliar essa capacidade de diferenciação dos parasitos simples nocaute para o gene *dpp8tc*, obtidos anteriormente (FIGUEIREDO, 2017), em comparação aos selvagens (*wild type* – WT) pelo processo de metaciclo gênese, visando definir se essa proteína possui atuação importante para essa diferenciação.

As porcentagens de tripomastigotas metacíclicas obtidas foram de 35,83% para WT, 32,07% para o clone C8 e 11,11% para o clone F9, apresentando diferença estatística significativa entre o clone F9 e os demais avaliados (Figura 12A). Observa-se na Figura 12B uma capacidade de metaciclo gênese reduzida em mais de 70% no clone mutante simples F9, em relação aos parasitos WT e ao clone C8, corroborando para o possível papel dessa proteína durante esse processo de diferenciação.

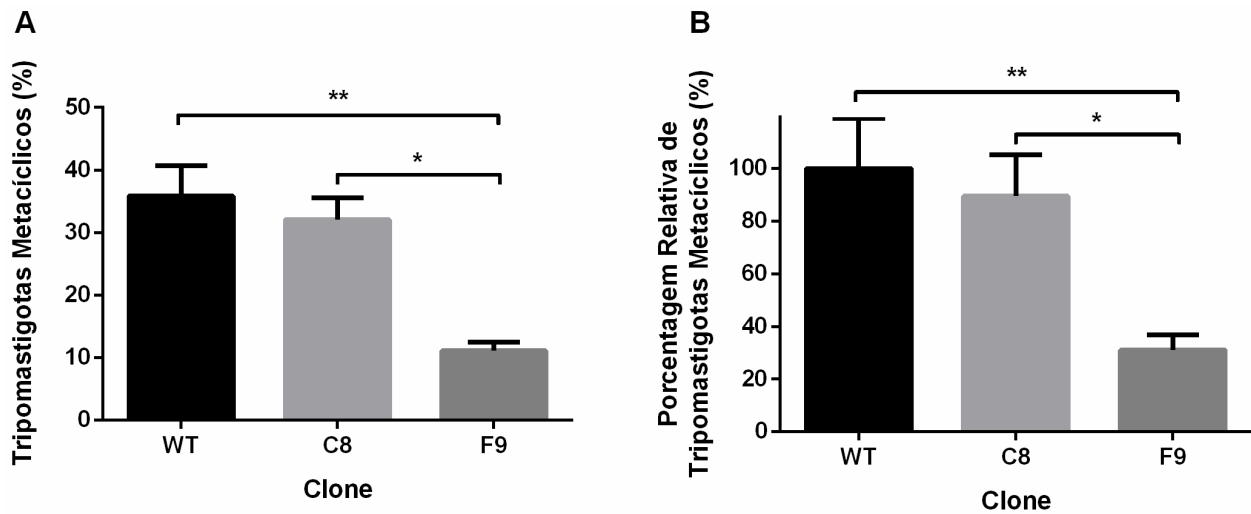


Figura 12. Avaliação da diferenciação por metaciclogênese em parasitos deficientes em *dpp8tc*. **A**, Porcentagem de tripomastigotas metacíclicos obtidos para cada linhagem. **B**, Porcentagem de tripomastigotas metacíclicos relativa, considerando o WT como 100%. O efeito da deleção de um dos alelos do gene da *dpp8tc* (C8 e F9) foi observado por ensaio de metaciclogênese *in vitro*, conforme descrito na metodologia, seguido de marcação fluorescente de DNA com DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol) para contagem das formas tripomastigotas metacíclicas totalmente diferenciadas, sendo contados 300 parasitos por réplica. Os resultados são apresentados como média das porcentagens \pm desvio padrão de experimentos em triplicata. Asteriscos indicam diferença significativa entre grupos por teste *a post hoc* de Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Metabolômica comparativa do clone C8 deficiente em DPP8Tc

Ponderando a taxa de metaciclogênese do clone C8 similar ao observado nos parasitos selvagens, ainda que este clone tenha seu simples nocaute confirmado por *Southern blot*, experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram propostos. A escolha dos parasitos C8 ocorreu por este aparentar uma maior adaptação para contrapor o nocaute do gene *dpp8tc*. O intuito foi quantificar as concentrações de prolina intra e extracelulares, para entender se uma maior captação desse aminoácido pode estar permitindo que este clone supere a deficiência da protease estudada. Como citado anteriormente, a DPP8Tc tem a capacidade de clivar dipeptídeos pós prolina e pode ser importante, juntamente com outra protease, para liberação desse aminoácido, sabendo-se que a presença de prolina no meio é importante para promoção da metaciclogênese. O ensaio foi realizado, então, em um intervalo de três, seis e nove dias, que corresponde aproximadamente as fases *lag*, *log* e início da fase estacionária de crescimento do *T. cruzi* (Figura 13).

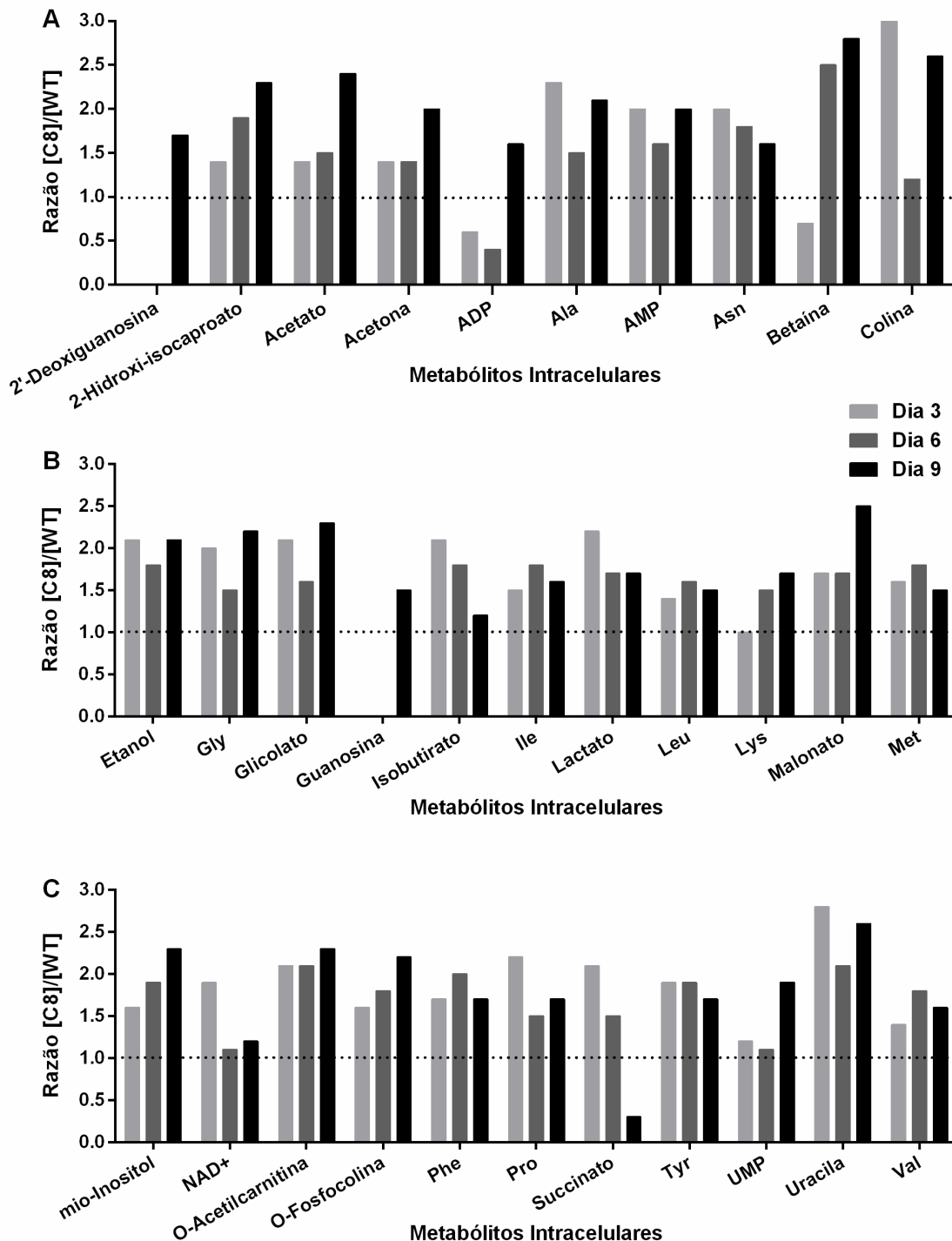


Figura 13. Metabólitos intracelulares quantificados por RMN em parasitos WT e clone C8. Gráficos A, B, e C, mostram os metabólitos em função da razão entre as concentrações obtidas em C8 em relação as observadas no WT. Os dados foram obtidos após incubação dos protozoários durante três dias (cinza claro), seis dias (cinza), e nove dias (preto).

Foram identificados e quantificados cerca de 30 metabólitos, cuja concentração foi obtida por célula e foi calculada uma razão entre a concentração presente nos parasitos

C8 e a obtida nos parasitos WT. Valores dessa razão entre 0 e 1 indicam uma maior concentração no intracelular do WT (abaixo da linha pontilhada), enquanto que razões maiores que 1 (acima da linha pontilhada) indicam maior quantidade de metabólitos no clone C8 (Figura 13).

Pode-se observar pelos dados intracelulares que muitos metabólitos estão mais presentes no clone C8 e que, ao longo do tempo de incubação dos protozoários, houve uma diminuição no número de metabólitos em maior concentração no WT e um aumento do número de metabólitos mais presentes no C8. Isso pode indicar uma diferente resposta metabólica frente a diminuição da disponibilidade de nutrientes do início da fase estacionária.

Com enfoque no aminoácido prolina e em análise preliminar dos dados intracelulares (tracejado), este se encontrou mais abundante sempre no clone C8, em relação ao WT. Ao longo do tempo, pode-se perceber leve aumento da quantidade de prolina intracelular do WT, o que não ocorre no clone C8. E ao nono dia, em virtude do consumo do aminoácido, e em consonância com uma diminuição no consumo de glicose extracelular, há uma queda na concentração de prolina intracelular. Avaliando as concentrações, a diminuição foi 1,5 vezes mais proeminente no parasito C8 em relação ao WT, indicando um maior consumo de prolina nessa fase tardia do seu crescimento (Figura 14A). Corroborando esse fato, a quantidade de prolina extracelular é diminuída para ambos os parasitos, descartando a hipótese de a diminuição intracelular ser causada por uma liberação desse aminoácido para o meio de cultura.

Os dados extracelulares de glicose e succinato são indícios de que as quantificações realizadas, apesar de preliminares, estão de acordo com o conhecimento existente acerca do metabolismo de *T. cruzi* (Figura 14B e C). Nota-se um maior consumo de glicose ao dia 6, correspondente com a fase de crescimento exponencial do protozoário, que ocorre concomitante a grande liberação de succinato, que é o principal produto final do metabolismo de glicose em tripanossomatídeos (MAUGERI; CANNATA; CAZZULO, 2011). Ainda, observa-se por meio do consumo de glicose e liberação de succinato, um maior metabolismo de glicose no clone C8 em relação ao WT, que se normaliza ao final do dia nove.

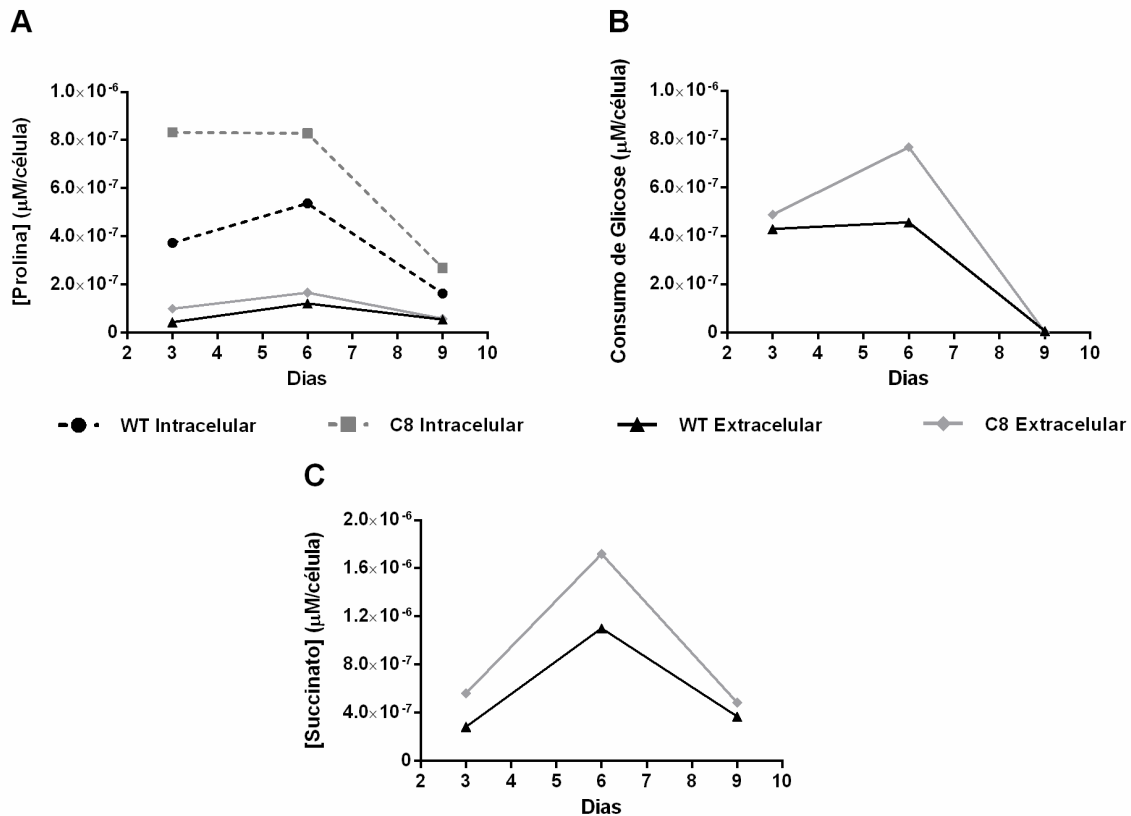


Figura 14. Análise de metabólitos por RMN em parasitos selvagens e clone C8, deficiente em *dpp8tc*. **A**, concentração de prolina intracelular (linha tracejada) e extracelular (linha sólida) nos parasitos WT (preto) e C8 (cinza). **B**, consumo de Glicose obtido dos dados extracelulares pela diferença entre o meio controle e o meio dos protozoários. **C**, concentração de succinato liberado obtida dos dados extracelulares. A concentração de metabólitos por célula foi obtida por metodologia de Ressonância Magnética Nuclear com identificação e quantificação química por meio dos espectros obtidos.

Imunocitocalização da *DPP8Tc* em formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*

Como forma complementar aos resultados obtidos, a expressão e localização celular da proteína foi observada por microscopia de fluorescência e comparada entre as formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas do protozoário. Já havia sido observado que a *DPP8Tc* se apresenta distribuída ao longo do conteúdo citoplasmático nas formas epimastigotas com maior concentração na região do cinetoplasto. Nas tripomastigotas metacíclicas a sua distribuição permanece inalterada, porém com uma expressão 40% menor em relação a forma epimastigota (Figura 15). As formas epimastigotas dos parasitos simples nocautes em relação aos selvagens também foram

avaliadas, sendo possível perceber uma expressão 26% menor da proteína no clone F9 em relação ao WT (Figura 16).

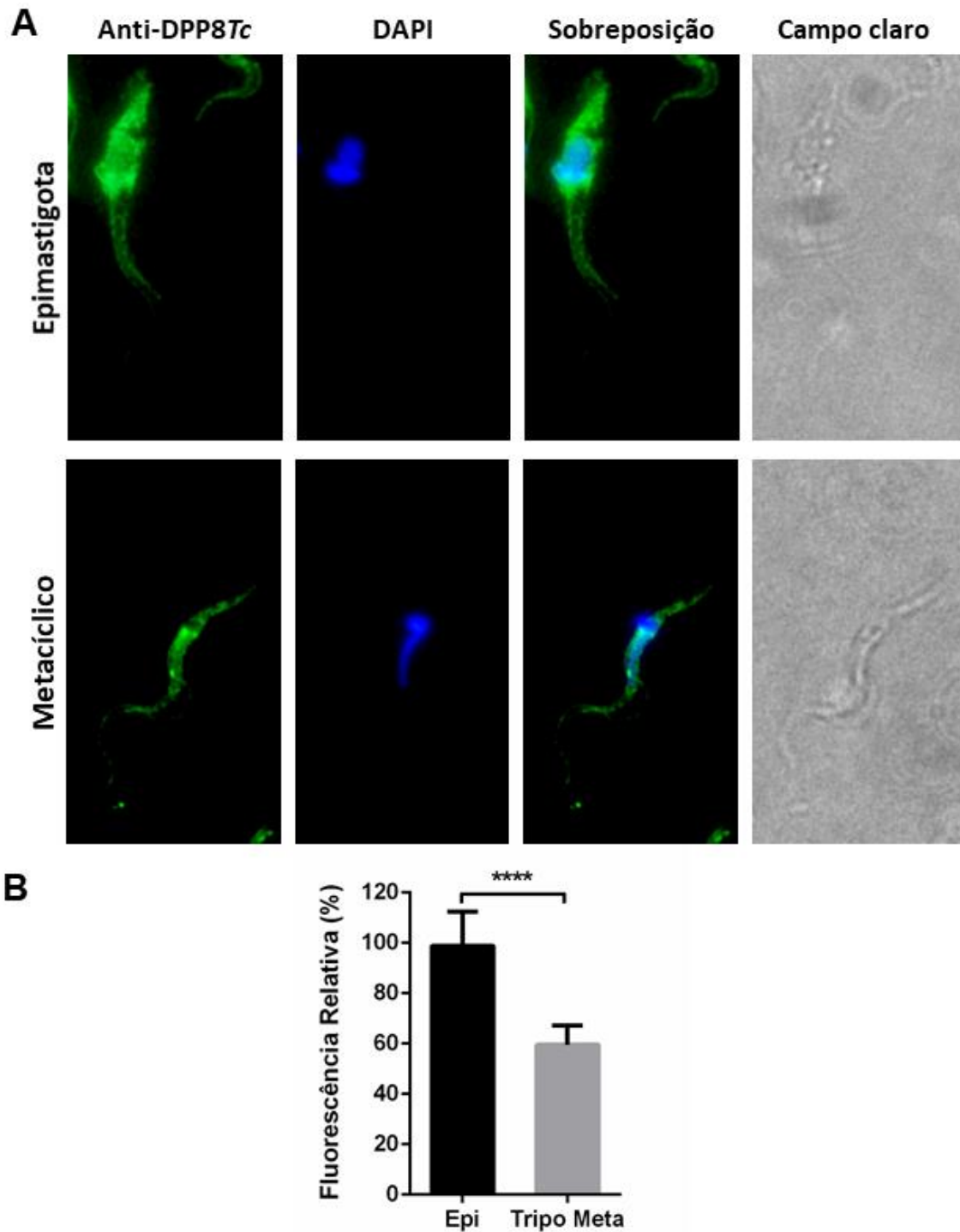


Figura 15. Microscopia de fluorescência de parasitos WT nas formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas. A, A imunofluorescência foi realizada com soro imune para a rDPP8Tc (1:100) e anticorpo secundário goat anti-mouse IgG conjugado com Alexa Fluor 488 (1:2000). O cinetoplasto e o núcleo foram marcados com DAPI (azul). Imagens obtidas de um mesmo campo, em

microscópio confocal, representando a sobreposição de várias *z-sections* e correspondendo ao conteúdo total dos parasitos observados. **B**, Quantificação da fluorescência em unidades arbitrárias foi realizada no programa FIJI (ImageJ), sendo apresentada como porcentagem da média de fluorescência \pm desvio padrão. Os dados foram analisados quanto a sua normalidade por teste de Shapiro-Wilk, e os asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos por teste T (**** $p < 0,0001$). Epi, epimastigota; Tripo Meta, tripomastigota metacíclico.

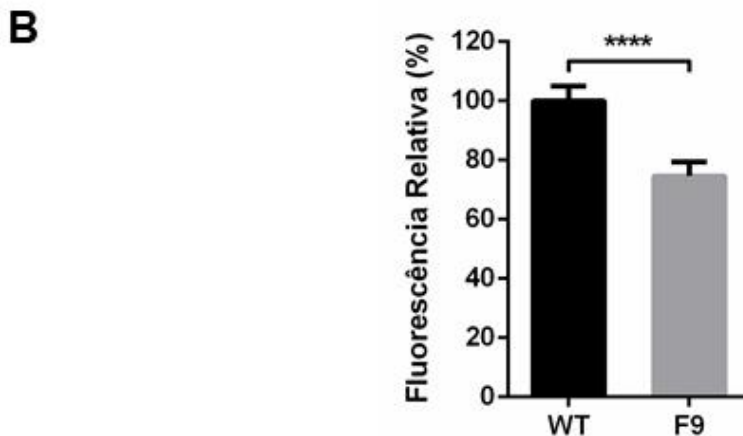
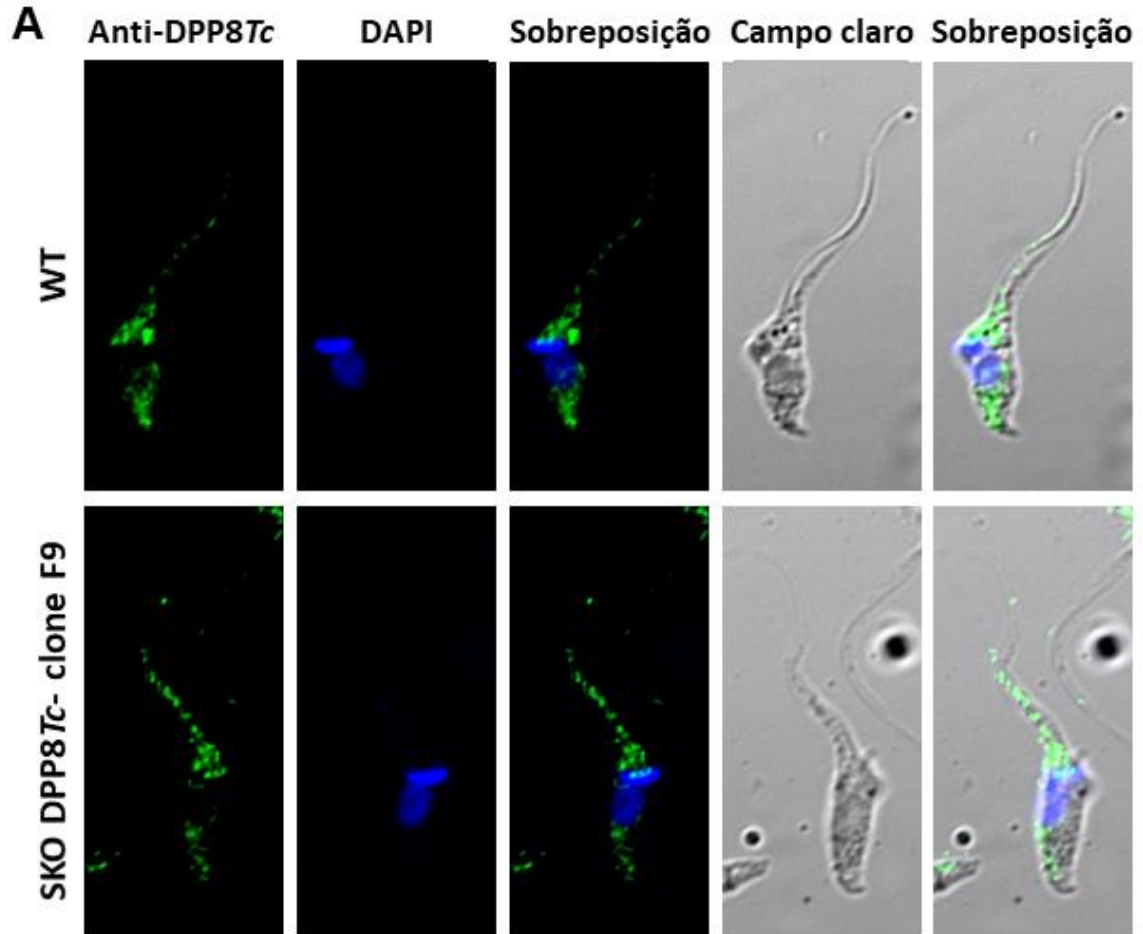


Figura 16. Microscopia de fluorescência de parasitos WT e F9 nas formas epimastigotas. A, A imunofluorescência foi realizada com soro imune para a rDPP8Tc (1:100) e anticorpo secundário goat anti-

mouse IgG conjugado com Alexa Fluor 488 (1:2000). O cinetoplasto e o núcleo foram marcados com DAPI (azul). Imagens obtidas de um mesmo campo, em microscópio confocal, representando a sobreposição de várias *z-sections* e correspondendo ao conteúdo total dos parasitos observados. **B**, Quantificação da fluorescência em unidades arbitrárias foi realizada no programa FIJI (ImageJ), sendo apresentada como porcentagem da média de fluorescência \pm desvio padrão. Os dados foram analisados quanto a sua normalidade por teste de Shapiro-Wilk, e os asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos por teste T ($****p < 0,0001$). WT, wild type; SKO F9, simples nocaute clone F9.

Nível de expressão de DPP8*Tc* e outras Prolil Oligopeptidases em parasitos mutantes

Baseado nas diferenças metabólicas observadas e avaliando se ocorreu uma superexpressão de outras serino proteases como forma de compensação para o alelo deletado, um ensaio de imunomarcacão (*Western Blot*) foi realizado. Extratos de parasitos de formas epimastigotas mantidas em cultura axênica, WT e dos clones C8 e F9, foram produzidos e avaliados contra a marcação de anticorpos policlonais cedidos por membros do grupo de pesquisa, e que reconhecem as serino proteases da família S9: Prolil Oligopeptidase (POP*Tc*80) e Oligopeptidase B (OPB*Tc*), além da Dipeptidil peptidase (DPP8*Tc*) (FIGUEIREDO, 2017; SILVA, 2018). Outra serino protease, da família S15, X-Prolil Dipeptidil Amino-peptidase (X-PDAP*Tc*) também foi analisada tendo em vista sua característica catalítica similar a DPP8*Tc* em liberar dipeptídeos Xaa-Pro da porção N-terminal (DE ALMEIDA, 2009).

O resultado da imunomarcacão foi analisada por meio de densitometria, com normalização pelo controle interno para a proteína tubulina, expressa de forma constitutiva, e em função da atividade observada no WT como 1 ou 100% (Figura 17). O nível de expressão da DPP8*Tc* no clone C8 foi levemente diminuído, enquanto que o clone F9 teve uma menor abundância relativa da proteína estudada. Os parasitos C8 e F9 tiveram um aumento de expressão da POP*Tc*80 e OPB*Tc*, sendo o aumento para a Oligopeptidase B mais acentuado no clone F9 e próximo a 85%. Diferente do esperado, e apesar de suas características similares a DPP8*Tc*, a X-PDAP*Tc* não teve modulação significativa da sua expressão.

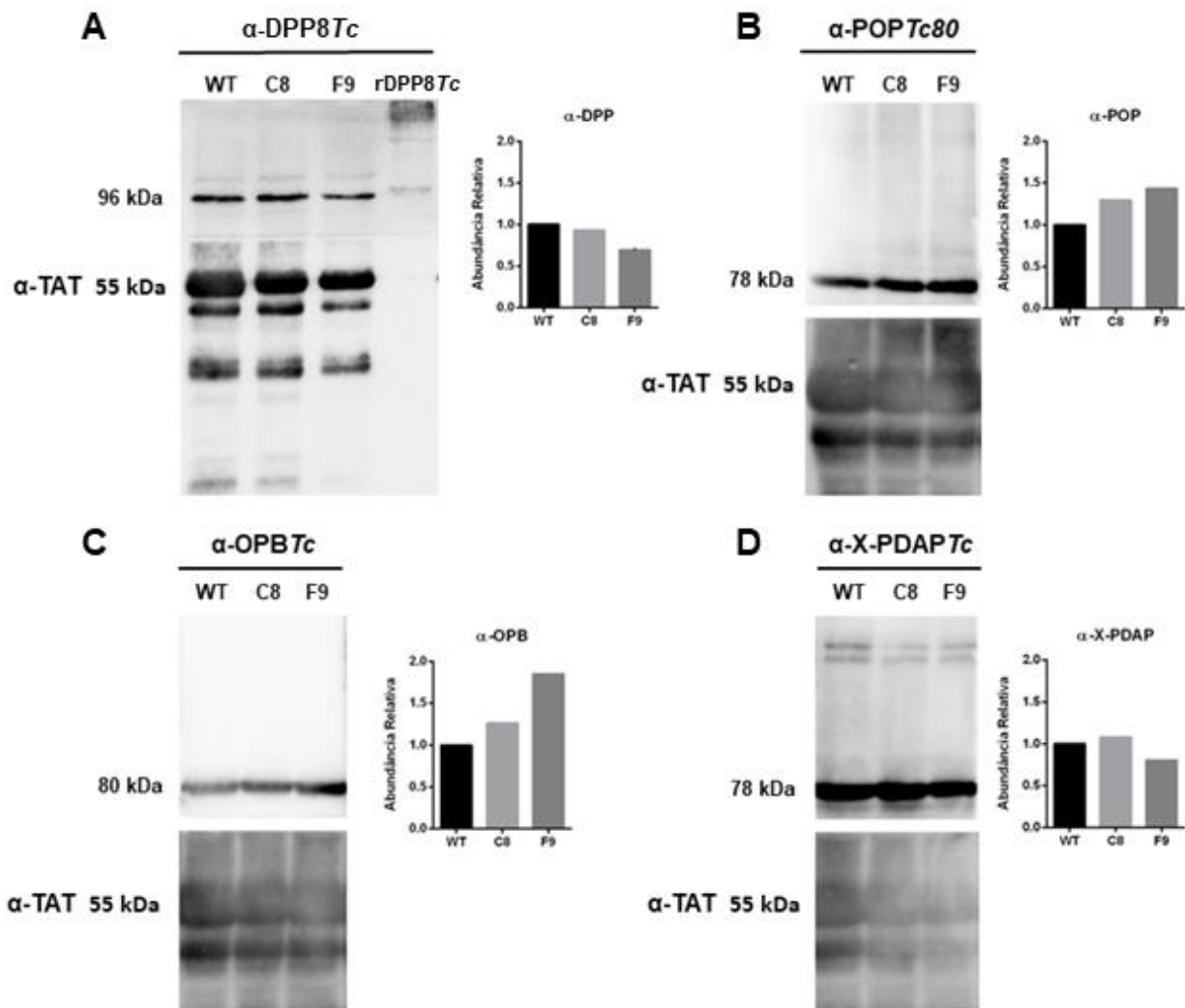


Figura 17. Expressão proteica de diferentes proteases nos parasitos mutantes em comparação com os selvagens por Western Blot. Extratos de parasitos foram preparados conforme a metodologia, e marcados com anticorpos específicos para cada protease. **A**, Imunomarcagem com anti-DPP8Tc (1:100); **B**, anti-POP Tc80 (1:50); **C**, anti-OPB Tc (1:200); **D**, anti-X-PDAP Tc (1:100). Posteriormente, a marcação foi detectada por meio de anticorpo secundária acoplado a peroxidase (1:30.000). Ao lado de cada Blot se encontra a abundância relativa da proteína para cada linhagem, normalizada pelo controle da tubulina e em função do WT. WT, selvagem; C8 e F9, clone simples nocaute para DPP8Tc.

Clonagem do sgRNA e amplificação do cassete

O nocaute gênico é uma ferramenta importante para a caracterização funcional de proteínas, e com base nos resultados obtidos, a obtenção de mutantes nulos para a enzima DPP8Tc é de interesse. Para isso, foi utilizada a metodologia de CRISPR-Cas9 que tem se mostrado uma técnica promissora para estudo de genes em *T. cruzi*, uma vez

que esse não possui a maquinaria de RNAi e a metodologia convencional por recombinação homóloga constitui uma ferramenta laboriosa e de baixa eficiência.

Portanto, a sequência do sgRNA específico para a DPP8Tc de 21 pares de bases (pb) foi selecionada em ferramenta de bioinformática, *Eukaryotic Pathogen CRISPR guide RNA/DNA Design Tool* (EuPaGDT), se localizando na porção inicial do gene com início na posição 576. Essa região é conservada em ambos os alelos da cepa híbrida CL-Brener. Os critérios utilizados foram a ausência de predição de mutações induzidas em sítios não almejados (*off-targets*), assim como a nota (*score*), o conteúdo de GC e se as regiões flanqueadoras seriam boas para reparo por micro-homologia. O sgRNA escolhido foi analisado quanto a produção de estruturas secundárias no programa *RNAfold Web Server* e foram desenhados iniciadores específicos para sua amplificação (indicados na metodologia), onde o iniciador senso contém a região específica do sgRNA e um sítio para a enzima de restrição *Bam*HI, e o iniciador anti-senso contém a sequência para amplificação da região responsável pela estrutura secundária do sgRNA. Como resultado da amplificação por PCR, foi obtido um produto de PCR de 123 pb (Figura 18A).

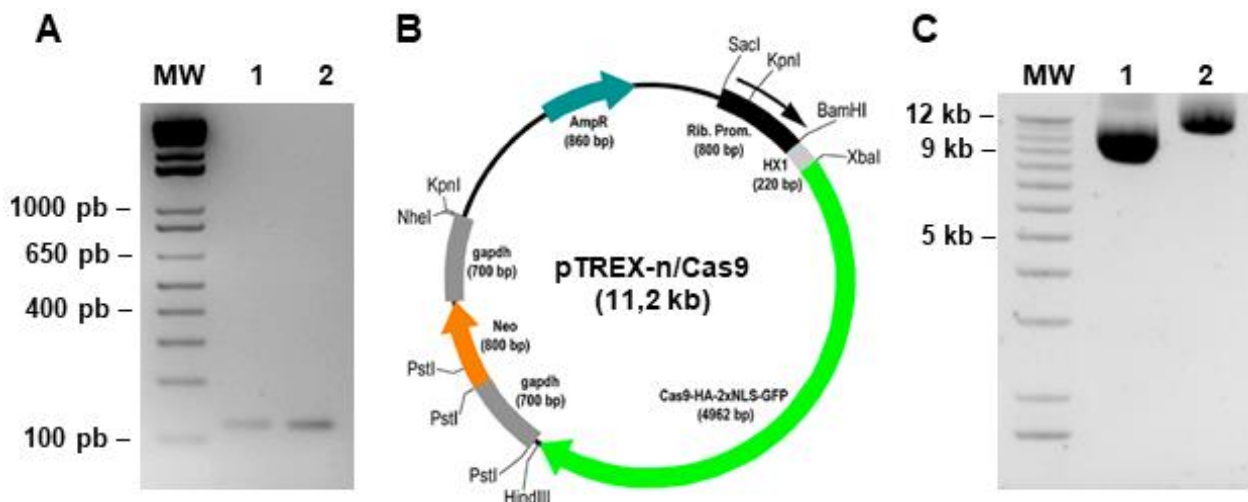


Figura 18. Preparação para clonagem do sgRNA no vetor pTREX-n/Cas9. A, Eletroforese em gel de agarose 2,5% (m/v) com resultado da amplificação por PCR do sgRNADPP8Tc com vetor pUC como template, com tamanho esperado de 123 pb. sgRNA foi purificado com kit *QIAquick® Gel Extraction* (Qiagen) após a reação de PCR. 1 e 2, sgRNA DPP8Tc. B, Representação esquemática do vetor utilizado para clonagem do sgRNA e que contém a sequência codificadora para a endonuclease Cas9. C, Eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) com resultado da digestão do vetor com a enzima *Bam*HI, para linearização. 1, pTREX-n não digerido (controle), 2, pTREX-n digerido. MW, marcador molecular.

O plasmídeo utilizado para clonagem do sgRNA e expressão constitutiva simultânea do sgRNA e da proteína Cas9 foi o pTREX-n/Cas9 (Figura 18B). O vetor foi devidamente digerido (Figura 18C), assim como o sgRNA, ambos foram ligados e o produto foi transformado em bactérias competentes *E. coli* na cepa TOP10, sobre pressão seletiva com 100 µg/mL de ampicilina.

A confirmação da clonagem na orientação correta foi realizada por PCR de colônia (Figura 19A), gerando um fragmento de 188 pb correspondente ao esperado, com iniciador senso utilizado para amplificação do sgRNA, e iniciador anti-senso que se anela na região inicial do gene *hx1* presente no plasmídeo, codificador de uma região intergênicas.

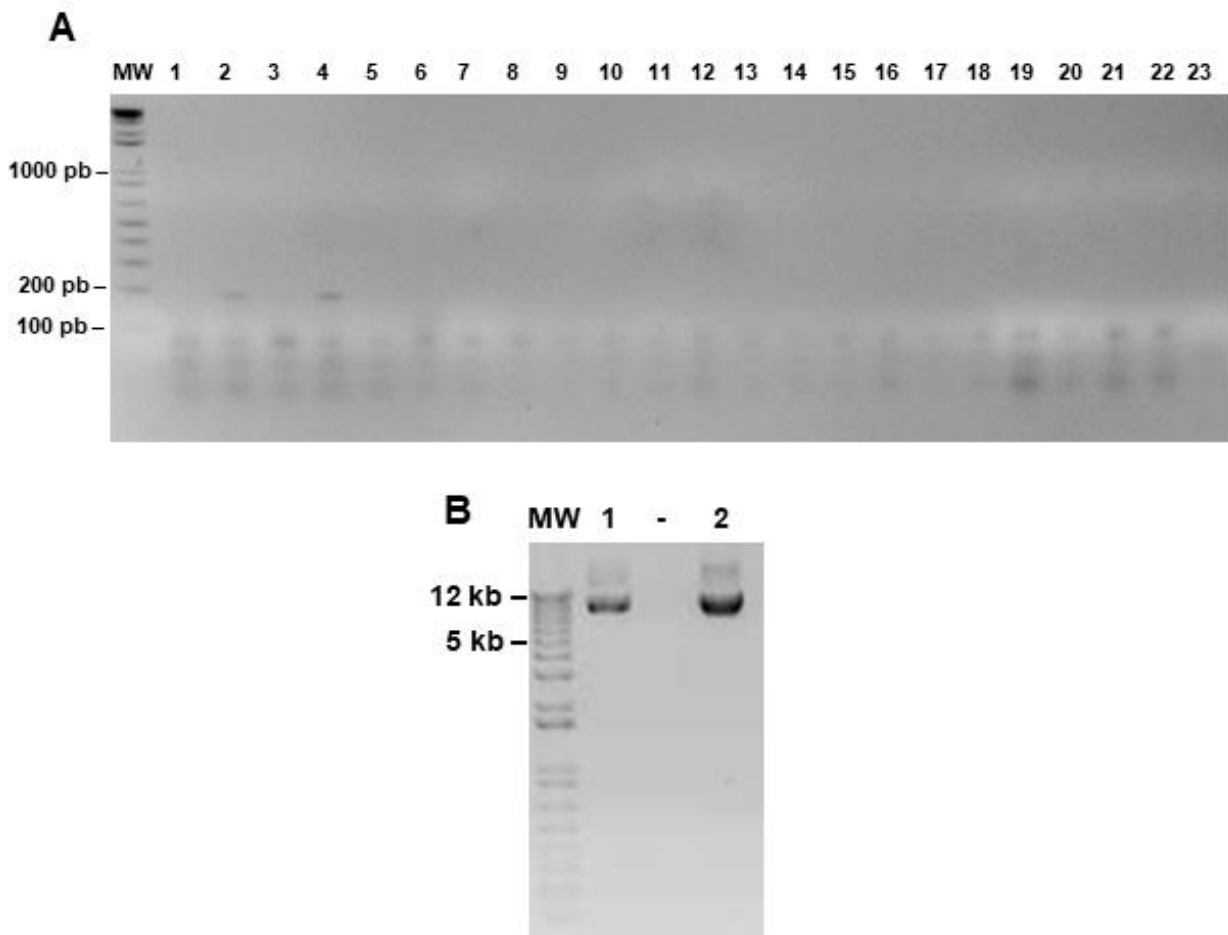


Figura 19. Confirmação da integração correta do vetor e produção do plasmídeo em sistema procaríoto. A, Eletroforese em gel de agarose 2,5% (m/v) com resultado da confirmação de clonagem com colônias 2 e 4 positivas e produto de cerca de 200 pb. 1 a 20, diferentes colônias; 21, controle negativo com ambos os iniciadores e sem DNA; 22, controle negativo somente com iniciador senso; 23, controle negativo com iniciador anti-senso. **B,** Eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) com plasmídeo pTREX-n/Cas9/sgRNA de aproximadamente 11,3 kb, produzido em bactéria e obtido por preparação plasmidial. 1,

plasmídeo obtido da colônia positiva número dois, 2; plasmídeo obtido da colônia número 4. –, poços vazios.

Foram obtidas apenas duas colônias positivas para clonagem do sgRNA na orientação correta, uma vez que o inserto foi clonado entre dois sítios de restrição iguais, para enzima *Bam*HI (Figura 19A). O plasmídeo final foi produzido em sistema bacteriano e purificado por midipreparação plasmidial, possuindo um tamanho de aproximadamente 11,3 kb (kilobases) (Figura 19B).

Para induzir um reparo por homologia (*Homology Directed Repair*) foram desenhados ultrâmeros, iniciadores fita simples de cerca de 100 pb utilizados como braços de homologia para recombinação, com regiões que se anelam nas sequências de *hx1* e *tub* do cassete *hx1-hyg-tub*, produzido em trabalho anterior do grupo (SILVA, 2018). O cassete foi amplificado a partir do vetor *pgem-hx1-hyg-tub* por reação de PCR, utilizando enzima de alta fidelidade *Phusion Flash* (Thermo Fisher), com um tamanho final de 1708 pb (Figura 20).

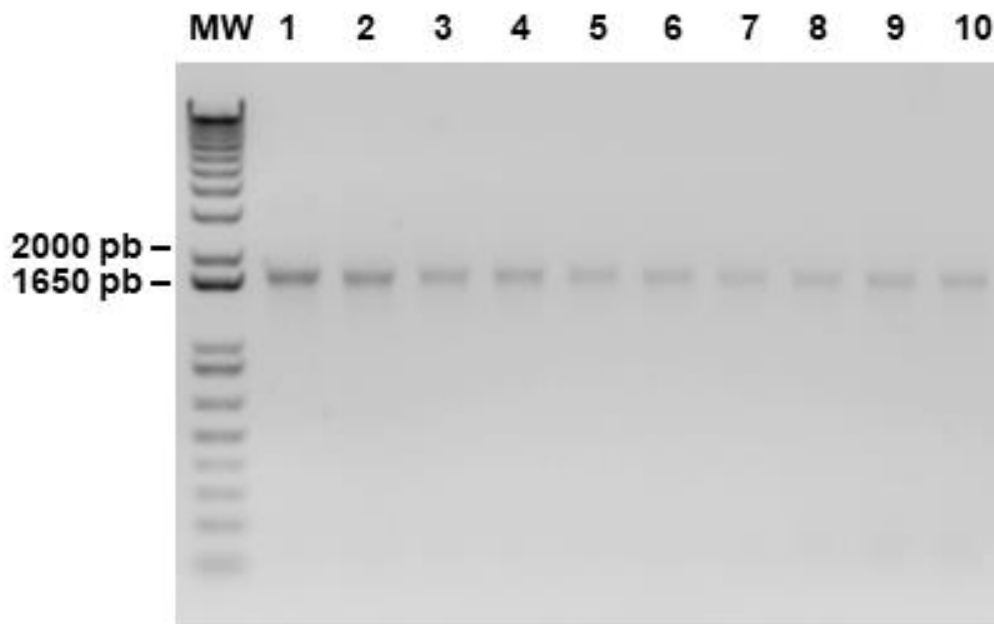


Figura 20. Amplificação do Cassete de Homologia. Eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) com resultado da amplificação de ultrâmeros. Estes foram desenhados para gerar braços de homologia para reparo por HDR dentro do gene da *dpp8tc*, foram utilizados para amplificar o cassete *hx1-hyg-tub*. 1 a 10 – várias reações de amplificação.

Nocautê gênico da *DPP8Tc* e confirmação por PCR

Inicialmente, os ultrâmeros foram desenhados para região interna do gene da *dpp8tc* com intuito de utilizar os parasitos simples nocautes para deletar o alelo restante para o gene. Contudo, uma vez que sua marca de seleção para o alelo nocauteado era neomicina, a mesma presente no plasmídeo que codifica a Cas9, a seleção dos parasitos que receberam o vetor não poderia ser verificada. Então, a linhagem selvagem da cepa CL-Brener foi utilizada para transfecção em duas condições: a primeira condição recebeu somente o plasmídeo contendo o gene para expressão da endonuclease Cas9 e o sgRNA específico para a *DPP8Tc*, enquanto que a segunda foi transfectada com o plasmídeo pTREX-n/Cas9/sgRNA e o cassete *ult-hx1-hyg-tub-ult*. Estudos ressaltam a eficiência do sistema de CRISPR-Cas9 em *T. cruzi*, com alta taxa de duplas mutações em torno de 60 a 70%, indicando que a utilização do sistema para gerar um duplo nocautê a partir de cultura selvagem, sem a necessidade de dois turnos de transfecção e deleção, é possível (PENG et al., 2014).

Um dia após a transfecção, os parasitos foram analisados em citômetro de fluxo para detecção e contagem de células expressando GFP (*green fluorescent protein*), proteína fusionada ao gene da Cas9 no vetor pTREX-n/Cas9/sgRNA, sendo observada fluorescência somente em cerca de 1% dos parasitos transfectados num total de 10.000 eventos. As culturas transfectadas foram clonadas em placa de 48 poços e a seleção ocorreu com utilização dos antibióticos G418 e higromicina (para a cultura transfectada com o cassete), nas concentrações de 100 µg/mL.

Com cerca de três semanas de seleção, os parasitos transfectados com plasmídeo apresentavam alta densidade celular enquanto que seu controle (cultura selvagem sobre pressão seletiva por meio do antibiótico G418) não apresentava parasitos viáveis. A cultura que recebeu o cassete apresentava poucos parasitos vivos. Para avaliar se o nocautê gênico ocorreu, o DNA dos parasitos transfectados (cultura mista não clonada) foi extraído e submetido a PCR. A cultura transfectada com cassete foi avaliada quanto a correta integração representada na Figura 10 (metodologia).

Primeiramente, foi realizado a PCR com iniciadores de confirmação desenhados dentro do gene da *DPP8Tc* e fora da região de integração do cassete. O tamanho

esperado para amplificação no parasito selvagem é de 1139 pb, caso o cassete fosse integrado nos parasitos transfectados com ele, de 2527 pb. Foi observado que ambas as culturas, transfectada somente com pTREX-n/Cas9/sgRNA ou transfectada também com cassete, tiveram um produto com tamanho próximo a 1139 pb (Figura 21). Entretanto, com a possibilidade de a amplificação estar ocorrendo preferencialmente nos *amplicons* de menores tamanhos, uma vez que a cultura transfectada com cassete não estava estabelecida e ainda existiam muitos parasitos mortos, foi realizada nova PCR com combinações de iniciadores na região do gene *dpp8tc* e na região do cassete.

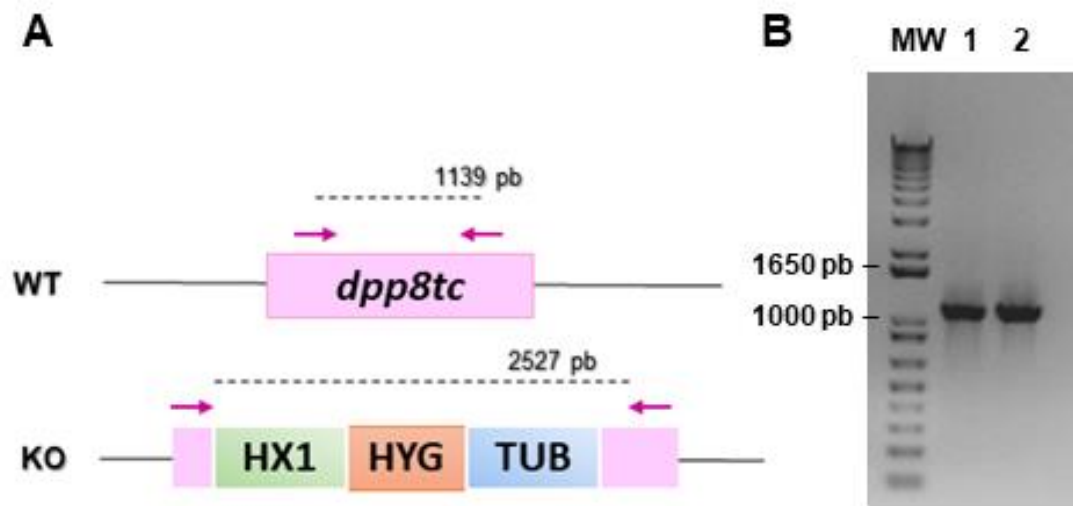


Figura 21. Resultado da PCR de confirmação de nocaute gênico. **A**, Representação esquemática dos tamanhos gerados caso tenha ocorrido a integração do cassete (KO) ou no alelo sem deleção (WT). **B**, Eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) com resultado da PCR de confirmação. MW, marcador molecular, 1, DNA genômico dos parasitos transfectados somente com pTREX-n/Cas9/ sgRNA; 2, DNA genômico dos parasitos transfectados com plasmídeo e cassete.

Nessa segunda avaliação (Figura 22), somente o DNA dos parasitos transfectados com cassete foi testado. Não ocorreu amplificação com combinação de iniciadores senso para *dpp8tc* e anti-senso para o cassete, e foram obtidas três bandas em baixa concentração quando utilizados os iniciadores senso para o cassete e anti-senso para *dpp8tc*, com tamanhos por volta de 1600 pb, 2500 pb e 2700 pb. Com iniciadores senso e anti-senso para o cassete, ocorreu amplificação no tamanho esperado de 1535 pb.

Outra tentativa de avaliar a integração do cassete foi realizada com iniciadores para *dpp8tc*, em conjunto com iniciadores para o gene que confere resistência ao antibiótico higromicina (*hyg*), higromicina fosfotransferase (Figura 23). O cassete foi

amplificado em reação com os iniciadores pra *hyg*, no tamanho esperado de 1038 pb, e o controle positivo contendo DNA do parasito selvagem foi amplificado com tamanho de 1139 pb com iniciadores para *dpp8tc*, entretanto, as combinações de primers *dpp8tc* e *hyg* não obtiveram nenhuma amplificação.

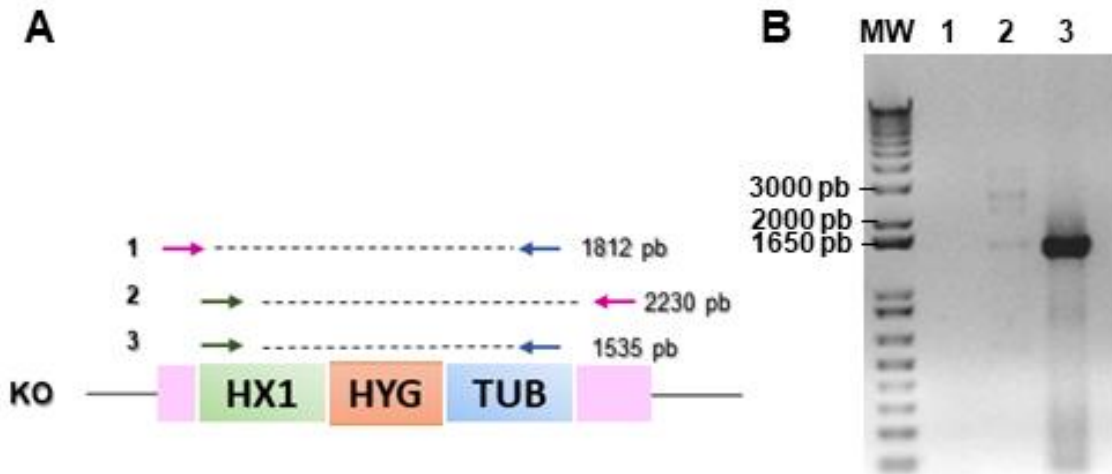


Figura 22. Resultado da segunda PCR de confirmação de nocaute gênico. A, Representação esquemática dos tamanhos gerados caso tenha ocorrido a integração do cassete (KO). B, Eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) com resultado da PCR utilizando somente o DNA genômico dos parasitos transfectados com plasmídeo e cassete. MW, marcador molecular; 1, amplificação com iniciadores da primeira combinação mostrado na parte A; 2, amplificação com iniciadores da segunda combinação; 3, amplificação com iniciadores da terceira combinação.

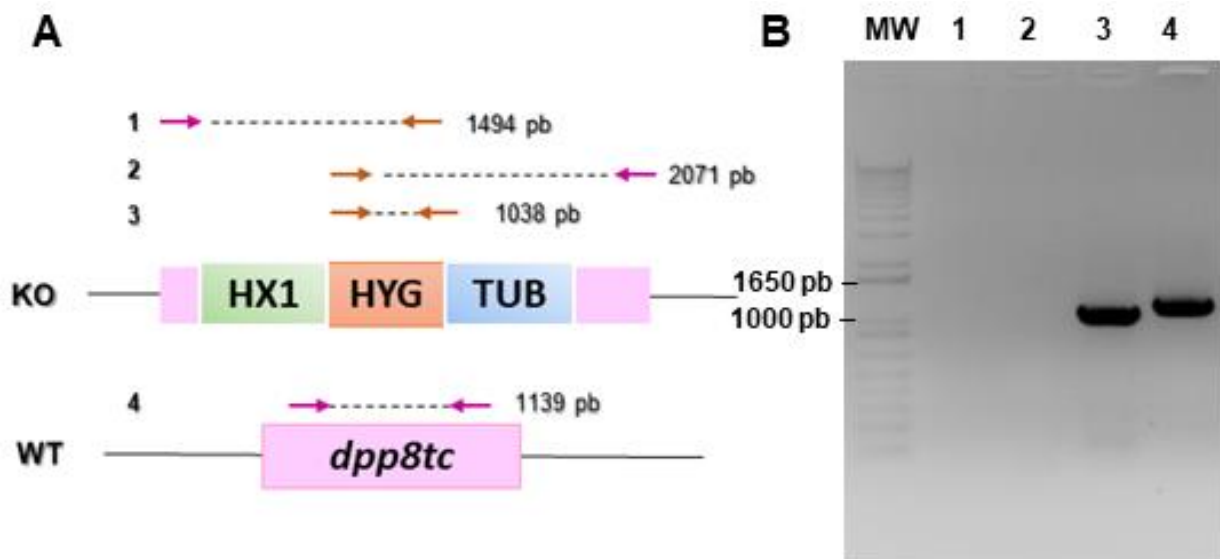


Figura 23. Resultado da terceira PCR de confirmação de nocaute gênico. A, Representação esquemática dos tamanhos gerados caso tenha ocorrido a integração do cassete (KO) e do produto gerado pela amplificação do DNA dos parasitos selvagens como controle positivo na quarta combinação de iniciadores. B, Eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) com resultado da PCR utilizando DNA genômico dos parasitos transfectados com plasmídeo e cassete (1 a 3) e DNA genômico do parasito selvagem (4).

MW, marcador molecular; 1, amplificação com iniciadores da primeira combinação mostrado na parte A; 2, amplificação com iniciadores da segunda combinação; 3, amplificação com iniciadores da terceira combinação; 4, amplificação com iniciadores da quarta combinação.

Portanto, os resultados foram inconclusivos, não podendo ser possível confirmar a integração do cassete e devem ser repetidos com uma cultura estabelecida. Como a avaliação do nocaute nos parasitos transfectados somente com plasmídeo é dificultada pois o reparo por micro-homologia pode gerar deleções de apenas alguns nucleotídeos, sua avaliação será pautada pela imunomarcação.

Avaliação da expressão de DPP8Tc nos parasitos transfectados

Em experimentos paralelos aos ensaios de PCR, os parasitos transfectados foram avaliados por imunodeteção com anticorpos específicos para a proteína cujo gene foi almejado. Caso o reparo por micro-homologia na cultura transfectada somente com plasmídeo, poderiam ser geradas proteínas truncadas de tamanhos diferentes, e portanto, a membrana não foi cortada para realização do controle com marcação para a proteína endógena, tubulina. A membrana foi então incubada com anticorpo específico para a DPP8Tc e posteriormente a revelação, sofreu o processo de remoção (*stripping*) dos anticorpos ligados.

Pode-se observar que o nível de expressão no parasito selvagem foi maior do que o observado para os parasitos nocauteados, indicando a possibilidade de a cultura mista possuir parasitos nocauteados (Figura 24). Contudo, ainda que a quantidade de extrato observada na cultura WT por meio de coloração da membrana com reagente Ponceau S fosse muito menor do que a quantidade observada para os parasitos transfectados, a marcação com anticorpo contra tubulina após *stripping* da membrana apresentou mais proteína no WT.

Este resultado precisa ser repetido tendo em vista sua inconsistência e possíveis problemas que o processo de *stripping* pode acarretar. Os protozoários também foram observados por microscopia de fluorescência para imunomarcação da DPP8Tc, mas não foi vista diferença na expressão da proteína.

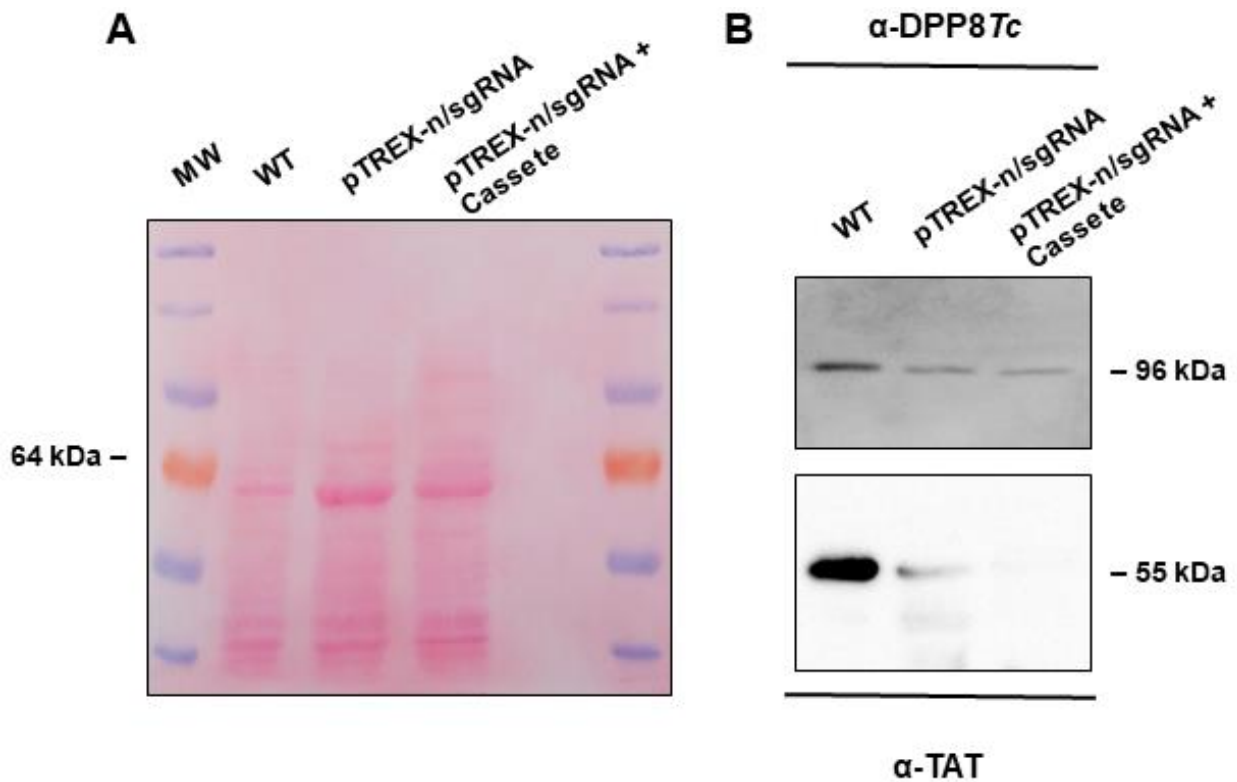


Figura 24. Western Blot de extratos dos parasitos transfectados para avaliar se houve nocaute gênico. A. Coloração da membrana com Ponceau S após a transferência das proteínas. **B.** Imunomarcagem da DPP8Tc (parte superior), e detecção da proteína constitutiva Tubulina, após processo de *stripping*.

Expressão e purificação das UBPs 1 e 2 de *T. cruzi*

Em projeto paralelo e com outro foco de interesse, os genes das proteínas ligadoras de RNA 1 e 2 de *T. cruzi* foram sintetizados e clonados em vetor pET100DT por empresa particular, e a expressão foi realizada em sistema procarioto conforme metodologia. As proteínas rUBP1Tc e rUBP2Tc expressas possuiriam peso molecular de aproximadamente 30 e 23 kDa, respectivamente. Inicialmente, tentou-se purificar as proteínas da fração solúvel do extrato proteico, porém sem sucesso para UBPs 1 e 2 de *T. cruzi* e baixo rendimento para UBPs 1 e 2 de *T. cruzi* (Figura 25). Devido a características da sequência de aminoácidos dessas proteínas, foram testadas as condições não fervida e fervida para preparo das amostras e análise em SDS-PAGE, verificando se a proteína poderia estar formando um agregado insolúvel quando fervida e por isso não estaria entrando corretamente pela malha do gel, não sendo observada diferença nas frações purificadas.

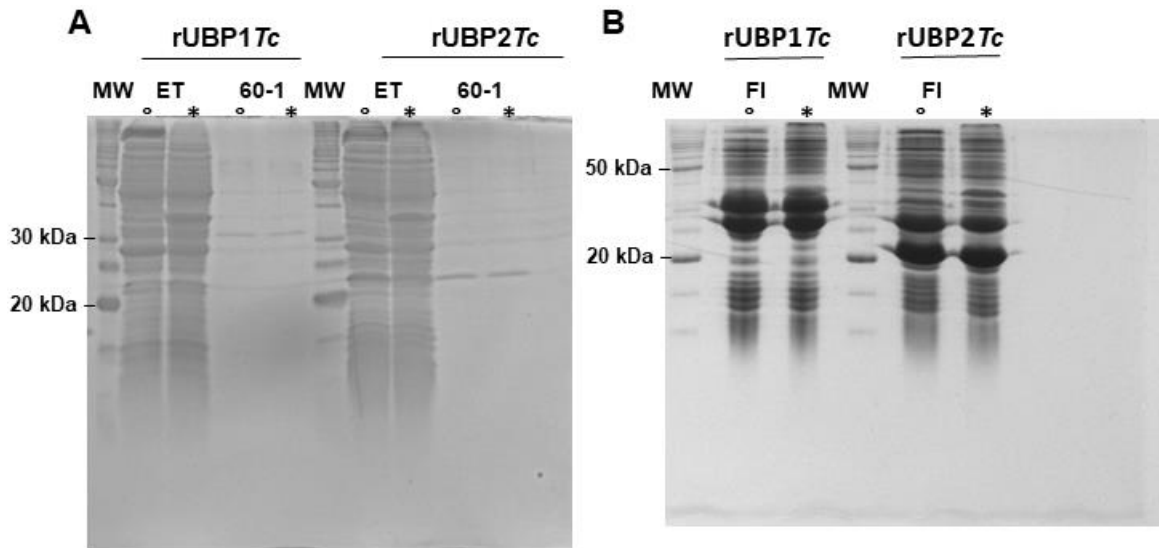


Figura 25. SDS-PAGE da purificação das UBPs a partir da fração solúvel. **A**, Amostras referentes ao extrato total (ET) e as frações solúveis purificadas com 60 mM de imidazol (60). **B**, Amostras referentes as frações insolúveis (FI) não utilizadas para purificação. Em ambos os ensaios foram utilizados SDS-PAGE 15% (v/v), e as amostras foram submetidas a duas condições diferentes. Tamanhos esperados de aproximadamente 30 kDa para rUBP1Tc e 23 kDa para rUBP2Tc. °, Amostra não fervida; * Amostra fervida por 5 min; MW – marcador molecular.

Foi então testado protocolo de purificação para obtenção da proteína em fração insolúvel. Ambas as proteínas foram eluídas em coluna de Níquel por competição ao composto Imidazol em concentrações de 30 a 50 mM (Figura 26). As proteínas foram submetidas a imunodeteção em membrana de nitrocelulose, sendo devidamente reconhecidas com anti-His, por causa da adição de seis caldas de histidina, oriundas do vetor de expressão (Figura 27).

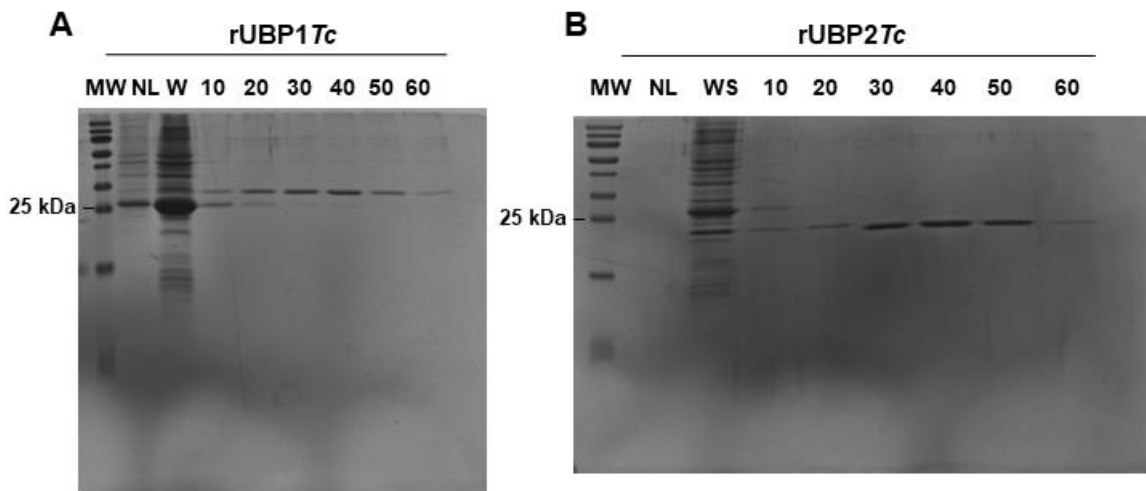


Figura 26. SDS-PAGE da purificação das rUBPs a partir de corpos de inclusão. **A**, Amostras referentes a purificação da rUBP1Tc. **B**, Amostras referentes purificação da rUBP2Tc. SDS-PAGE 17% (v/v).

Tamanhos esperados de aproximadamente 30 kDa para rUBP1 *Tc* e 23 kDa para rUBP2 *Tc*. MW – marcador molecular; NL, não ligado; W, lavagem; 10 a 60, eluições com concentrações crescentes de imidazol (mM).

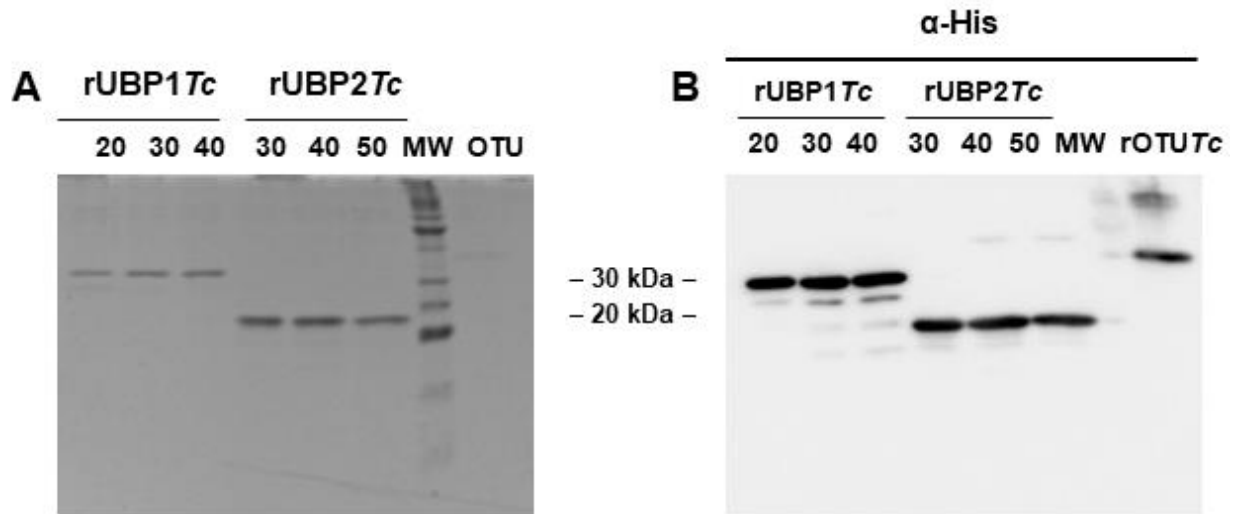


Figura 27. Imunodeteção das proteínas recombinantes produzidas. A, gel de SDS-PAGE espelho das amostras de proteína recombinante das eluições com imidazol. Controle positivo foi realizado com a proteína recombinante para a Otubaina de *T. cruzi* por seu baixo peso molecular de aproximadamente 30 kDa. B, *Western Blot* com anticorpo primário anti-His (1:2000) das rUBPs. Tamanhos esperados de aproximadamente 30 kDa para rUBP1 *Tc* e 23 kDa para rUBP2 *Tc*. MW, marcador molecular.

Produção de anticorpos e imunomarcção contra as UBPs1 *Tc* e UBPs2 *Tc*

Como ferramenta importante para estudos posteriores para essas RBPs, as proteínas recombinantes produzidas foram utilizadas para produção de anticorpos policlonais em camundongos. Os anticorpos produzidos foram testados contra as proteínas recombinantes e extratos de parasitos selvagens. Neste primeiro ensaio, as amostras foram fervidas anterior a submissão a eletroforese em SDS-PAGE, e as membranas foram cortadas na altura de 64 kDa para controle com anti-DPP8*Tc* (Figura 28, parte superior da membrana). É observado que dois soros para a UBPs1*Tc* reconheceram a proteína recombinante, ao passo que somente o soro 1 para UBPs2*Tc* realizou a marcação. Quanto a reconhecimento na amostra do extrato, percebe-se uma marcação muito acima do tamanho esperado, e que para a UBPs1 *Tc* se sobrepõe a região do corte de 64 kDa, dificultando a análise.

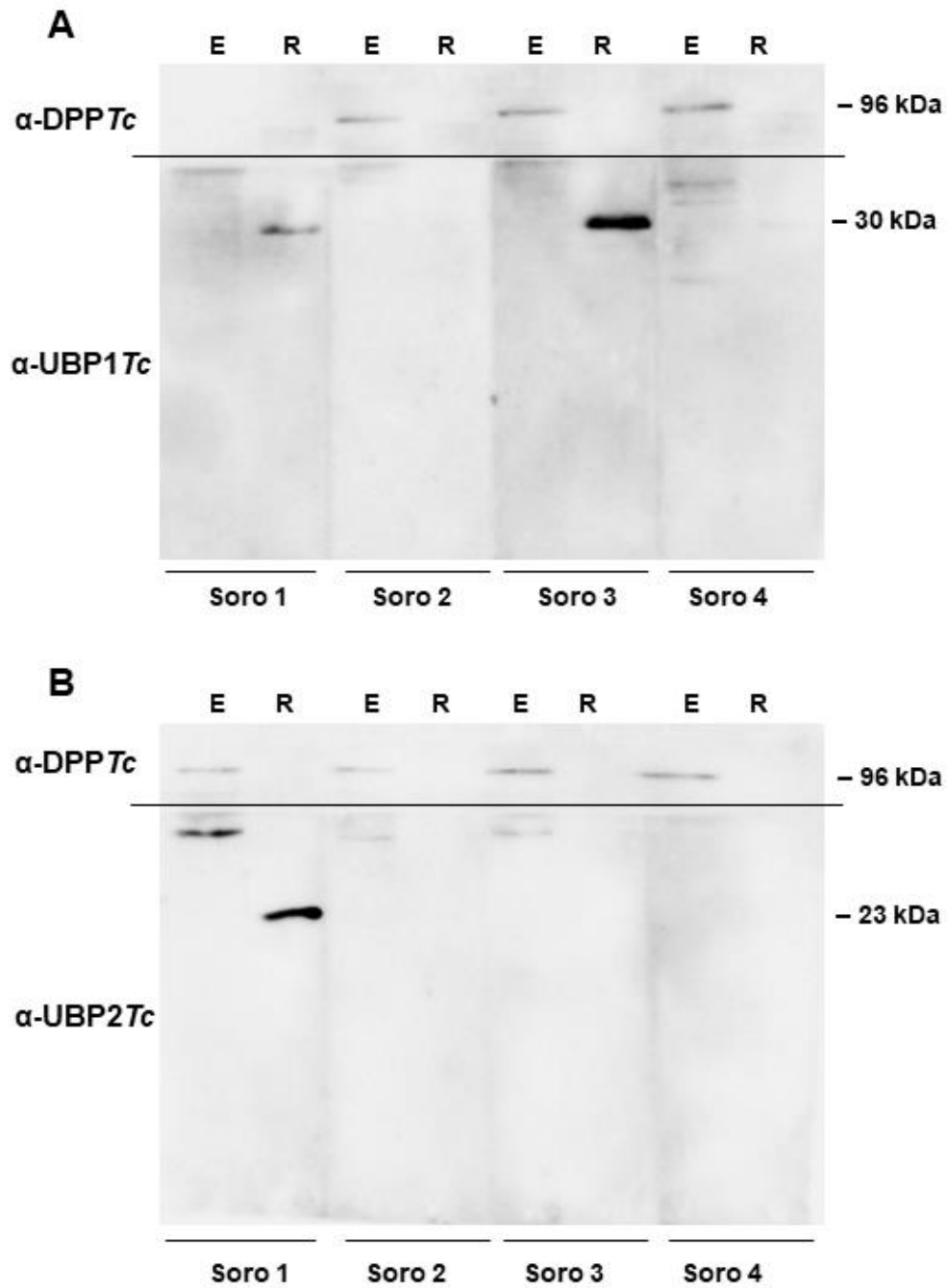


Figura 28. Imunoblot com anticorpos policlonais produzidos em camundongos. A, Western Blot com soros e proteína recombinante referentes a UBP17c. B, Western Blot com soros obtidos a partir da UBP27c. Como controle a quantidade dos extratos de *T. cruzi* (E), foi realizada marcação com anticorpos para DPP87c (parte superior das membranas). A incubação com os soros produzidos se deu na parte inferior das membranas. R, proteína recombinante.

Em repetição ao experimento acima, os soros 3 para *UBP1Tc* e soro 1 para *UBP2Tc* foram escolhidos e testados novamente contra extrato de parasitos e contra ambas as proteínas recombinantes, como forma de avaliar a marcação cruzada desses anticorpos, mas, sem realizar o corte da membrana (Figura 29A).

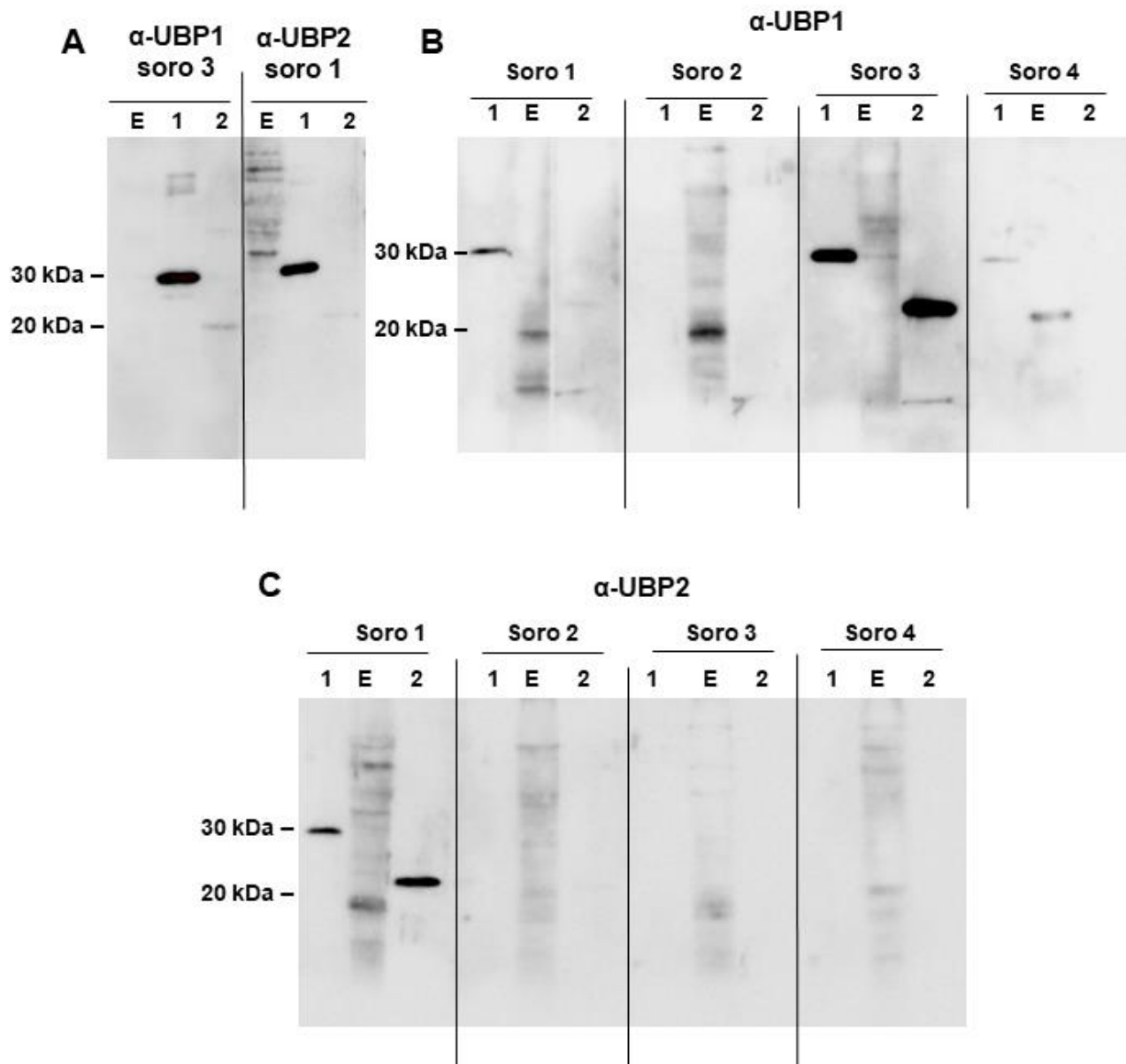


Figura 29. Western Blot dos soros produzidos em camundongos. A, Soro 3 (*UBP1Tc*) e soro 1 (*UBP2Tc*) incubados sem corte da membrana na horizontal. B, Soros para *UBP1Tc*, e C soros para a *UBP2Tc*. Todos os anticorpos foram testados contra a *rUBP1Tc* (1), o extrato de *T. cruzi* (E) e a *rUBP2Tc* (2).

É visto que o soro da *UBP1 Tc* marcou a própria *rUBP1 Tc* e fracamente a *rUBP2 Tc*, sendo observada fraca marcação no extrato em região superior da membrana. Já o soro da *UBP2 Tc* que anteriormente marcou a proteína recombinante, desta vez marcou a *rUBP1 Tc* em detrimento da *rUBP2 Tc*, e a fraca marcação em várias posições do extrato também foi percebido.

Considerando os problemas evidenciados acima, todos os soros foram novamente testados contra o extrato e as *rUBP1 Tc* e *rUBP2 Tc*, com modificação no preparo das amostras, aquecendo-as a 70 °C por 5 min, e incubando-as separadamente nos soros correspondentes (Figura 29B e 29C). Observa-se que o extrato, então, apresentou marcações em tamanhos esperados para a *UBP2 Tc* (com pequena redução de tamanho em relação a recombinante uma vez que esta última possui adição de caudas provenientes do vetor de clonagem, para detecção), quando testado com ambos os soros. Os soros 1 e 2 para *UBP1 Tc* reconheceram especificamente a *rUBP1 Tc* e não tiveram marcação cruzada quando testados com a *rUBP2 Tc*, porém a marcação no extrato proteico possui tamanho equivalente a *UBP2 Tc*. O soro 1 para *UBP2 Tc* foi o único que reconheceu as proteínas recombinantes, reconhecendo a *rUBP1 Tc*.

Imunofluorescência das UBPs 1 e 2 de *T. cruzi*

Os soros produzidos em camundongos foram capazes de marcar essas RBPs em ensaio de imunofluorescência indireta, permitindo sua citolocalização nas formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas do protozoário (Figura 30 e 31). As UBPs se apresentaram distribuídas ao longo do citoplasma dos parasitos, sem co-localização aparente com o núcleo.

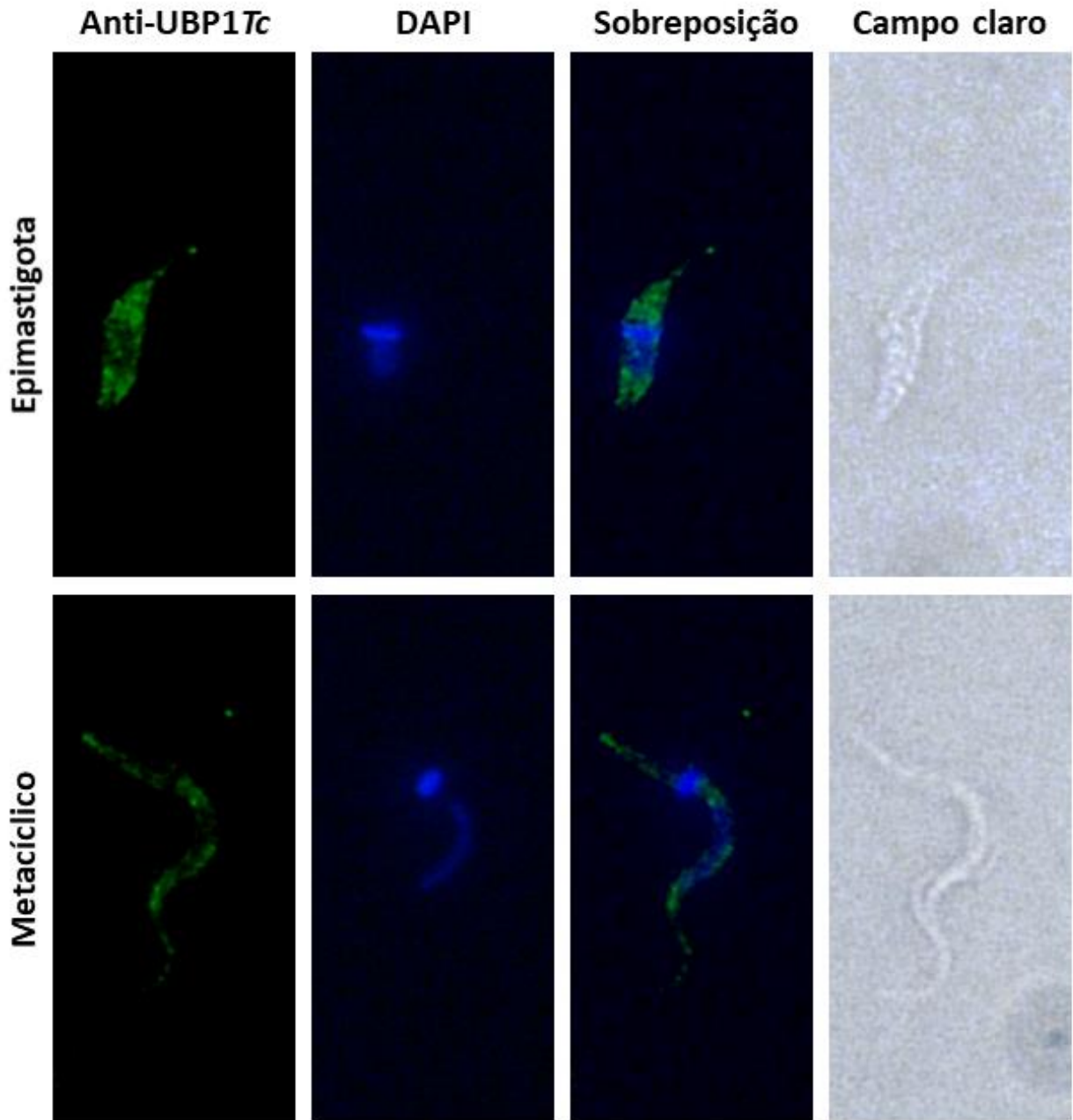


Figura 30. Microscopia de fluorescência de parasitos com marcação para UBP1Tc nas formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas. Imunofluorescência foi realizada com soro imune para a rUBP1Tc (1:100) e anticorpo secundário goat anti-mouse IgG conjugado com Alexa Fluor 488 (1:2000). O cinetoplasto e o núcleo foram marcados com DAPI (azul). Imagens obtidas de um único campo em microscópio de fluorescência invertido Eclipse T-E (Nikon).

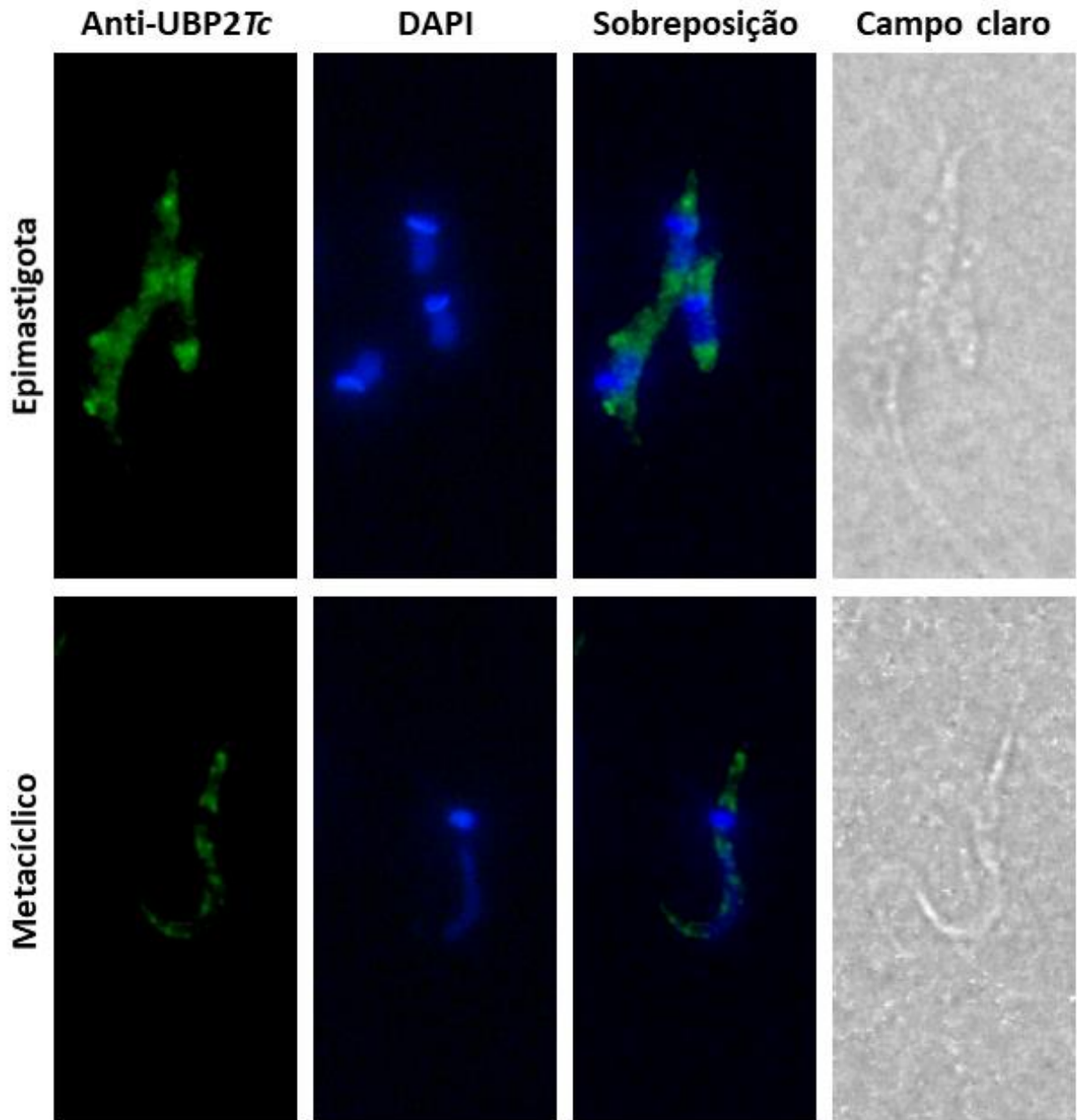


Figura 31. Microscopia de fluorescência de parasitos com marcação para UB2Tc nas formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas. Imunofluorescência foi realizada com soro imune para a rUBP2Tc (1:100) e anticorpo secundário goat anti-mouse IgG conjugado com Alexa Fluor 488 (1:2000). O cinetoplasto e o núcleo foram marcados com DAPI (azul). Imagens obtidas de um único campo em microscópio de fluorescência invertido Eclipse T-E (Nikon).



DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário que se distingue entre eucariotos e organismos mamíferos por suas diversas adaptações morfológicas, celulares e bioquímicas, apresentando diversos estágios de vida e habitando diferentes hospedeiros (DE SOUZA, 1984). Dentro desse contexto, diversos mecanismos e moléculas se destacam por seu papel nos processos envolvidos no estabelecimento da infecção, diferenciação, metabolismo e evasão da resposta imune (DE MEESTER et al., 1999; DURINX et al., 2000; ZHANG et al., 2013). Entre as proteínas de *T. cruzi*, a dipeptidil peptidase 8 é uma protease pouco estudada e sem função biológica elucidada, porém, vários estudos realizados sobre suas enzimas homólogas em outros organismos indicam sua importante participação na patogênese de doenças e processos metabólicos (DEU et al., 2010; GE; FENG; JI, 2009; YAO et al., 2011).

Ademais, outra classe de proteínas se mostra importante para o melhor entendimento da biologia do parasito flagelado. Proteínas ligadoras de RNA têm sido estudadas em *T. cruzi*, sendo apontadas como responsáveis pelo extensivo processo de regulação gênica do organismo (ARAÚJO; TEIXEIRA, 2011; CASSOLA; FRASCH, 2009; D'ORSO; FRASCH, 2002). Uma vez que sua organização genômica e biologia molecular impossibilita a regulação a nível de início da transcrição, constitui um importante foco de estudo para o entendimento das modulações que ocorrem ao longo dos diversos processos ainda não totalmente elucidados do organismo.

Portanto, o presente trabalho se deu em duas frentes de pesquisa, dando continuidade ao estudo da dipeptidil peptidase 8 de *T. cruzi* por meio da caracterização de mutantes simples, elucidação do seu possível papel em processos de diferenciação e utilização do sistema de edição CRISPR-Cas9. Outro aspecto abordado foi a expressão heteróloga das RBPs, UBP1 e 2 como estudo preliminar e para produção de ferramentas que serão utilizadas posteriormente, visando um maior entendimento dos processos essenciais para o protozoário e as moléculas envolvidas.

A DPP8Tc é alvo de estudo por nosso grupo de pesquisa há muitos anos, e esperava-se que pudesse constituir um alvo molecular para o desenvolvimento de medicamentos. Todavia, dados de uma dissertação de mestrado e uma tese de

doutorado indicam que seu nocaute gênico na verdade aumenta a infectividade do *T. cruzi* em ensaios *in vitro* (FIGUEIRÊDO, 2013; FIGUEIREDO, 2017). Resultados da caracterização bioquímica da enzima, onde esta apresentou temperatura ótima a 28 °C, correspondente a temperatura do hospedeiro invertebrado, e uma drástica diminuição da atividade quando em temperatura de 37 °C observada no hospedeiro mamífero, sugeriram uma maior importância da protease no ciclo desenvolvido dentro do inseto vetor (FIGUEIREDO, 2017).

A análise da metaciclo gênese dos parasitos mutantes simples demonstrou que o nocaute diminuiu a taxa de diferenciação do clone F9. Este fato pode ser devido a atividade catalítica desempenhada pela DPP8*Tc* em clivar dipeptídeos pós prolina, podendo estar relacionada a outra enzima para liberação de prolina no meio. A importância desse aminoácido livre como fonte de carbono para a diferenciação em formas tripomastigotas metacíclicas, quando sob estresse metabólico e baixa disponibilidade de glicose, tem sido descrita há anos, ainda que esse mecanismo de indução não seja totalmente conhecido (BARISÓN et al., 2017; CONTRERAS et al., 1985). Outro fator importante é a atividade descrita em seus homólogos, como a DPPIV, de modulação de peptídeos bioativos, sendo que um estudo recente relata que peptídeos gerados pela serino protease POP*Tb* (Prolil Oligopeptidase de *T. brucei*) age como sinal, aumentando a diferenciação para formas não proliferativas curtas e achatadas (*stumpy*) (ROJAS et al., 2019).

A indução da metaciclo gênese por meio de peptídeos já vem sendo analisada em *T. cruzi*, tendo sido visto que peptídeos derivados de α -D-globina podem promover a diferenciação *in vitro* do protozoário, estimulando sua adenil ciclase. Posteriormente foi visto que os peptídeos sintéticos baseados nessas sequências e os peptídeos naturais foram capazes e efetivos também *in vivo* (FRAIDENRAICH et al., 1993; GARCIA et al., 1995). Portanto, uma hipótese para o nocaute de um alelo da proteína DPP8*Tc* contribuir para a diminuição da taxa de metaciclo gênese do parasito mutante, é a diminuição de algum peptídeo com função moduladora, que seria produzido por clivagem por meio desta enzima.

Os dados de imunofluorescência dos parasitos selvagens nas formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas corroboram com o resultado da

metaciclogênese *in vitro*, uma vez em que é visto uma menor expressão da protease estudada nas formas metacíclicas. Esses fatos são condizentes com estudo de transcriptoma das quatro formas de vida do *T. cruzi* por meio de *microarray*, em que foi observado uma menor quantidade de transcritos para o gene da DPP8Tc presente no alelo esmeraldo-*like* da cepa CL-Brener (TcCLB.503637.30), nas formas tripomastigotas e tripomastigotas metacíclicas em comparação com a forma epimastigota (MINNING et al., 2009). Apesar de menos expressa, a localização celular da proteína nas formas metacíclicas se assemelha ao observado anteriormente nas formas epimastigotas e está de acordo com dados obtidos para a DPP8Tb nas formas procíclicas, com a enzima presente em vesículas distribuídas pelo citoplasma com concentração na região do cinetoplasto e próximo a bolsa flagelar, local de intensa troca de moléculas (FIGUEIREDO, 2017; GIRARD; BASTOS; GRELLIER, 2004).

Avaliando a expressão diferenciada de outras proteases do clã SC, família S9, POP8Tc80 e OPB8Tc, e da família S15, X-PDAP8Tc, ensaios de *Western Blot* foram realizados. Não foi observada diferença evidente na expressão da proteína DPP8Tc em seu clone simples nocaute C8, isso pode ter ocorrido por uma compensação da expressão do alelo nocauteado pelo alelo restante, uma vez que a duplicação do gene em alguma região do genoma de *T. cruzi* teria sido visto por meio do *Southern Blot* utilizado para confirmação dos nocautes. Outra possibilidade é que um *overloading* (alta concentração de extrato aplicado) possa ter impedido a análise da diferença entre as bandas do WT e do C8, uma vez que estas se apresentariam saturadas (BIOSCIENCES, 2015). Ainda assim, dados anteriores de imunofluorescência indicavam uma diminuição de somente 20% da expressão de DPP8Tc (FIGUEIREDO, 2017).

Tal fato levanta a hipótese de o alelo que foi nocauteado ser responsável por uma pequena parcela da expressão da proteína, sendo essa diferença de expressão entre alelos já observada por nosso grupo de pesquisa, em que parasitos simples nocautes para a POP8Tc80 apresentaram uma diminuição de 90% da sua expressão, sendo o outro alelo responsável por produzir os 10% restante (SILVA, 2018). Por sua vez, o clone F9 apresentou uma diminuição no nível de expressão mais acentuada, em cerca de 31%, corroborando com o observado por imagens de microscopia de fluorescência e com o

ensaio de metaciclo gênese em que esse clone, com menor expressão, apresentou diminuição da sua taxa de diferenciação.

A imunomarcagem evidenciou expressão alterada das outras proteases avaliadas. Surpreendentemente, a X-PDAP*Tc*, que possui maiores similaridades com a atividade catalítica da DPP8*Tc* quase não obteve alteração da sua expressão com a falta da enzima estudada, sendo observada uma leve diminuição no clone F9. Entretanto, uma modulação da expressão de POP*Tc*80 e principalmente da OPB*Tc* no clone F9 foi ressaltada, e o aumento da expressão dessas proteínas corroboram para uma modulação entre a expressão de proteínas da família das Prolil Oligopeptidases frente ao nocaute gênico de uma delas, tendo sido observado em estudo de nocaute da POP*Tc*80 um resultado similar (SILVA, 2018).

No nocaute da POP*Tc*80, alguns clones apresentaram também diminuição da expressão de X-PDAP*Tc* e aumento na expressão de OPB*Tc* (SILVA, 2018). Interessantemente, o clone C3, com menor expressão da proteína POP*Tc*80, apresentou a expressão de DPP8*Tc* aumentada, indicando uma possível tentativa de compensação da ausência de alelos de proteínas da família POP pela superexpressão de outras enzimas da mesma família. A POP*Tc*80 é uma serino protease que também cliva pós-prolina, porém até 30 aminoácidos na extremidade C-terminal enquanto a DPP8*Tc* cliva dipeptídeos na porção N-terminal. A implicação das proteases POP*Tc*80 e OPB*Tc* no processo de infecção do *T. cruzi*, e o fato de serem superexpressas nos clones nocautes para DPP8*Tc* podem ajudar a explicar o aumento da infectividade *in vitro* observada, mas, é necessário avaliar se esse aumento de expressão permanece nas forma tripomastigotas metacíclicas do protozoário mutante (BASTOS et al., 2005, 2013; GRELLIER et al., 2001).

Com base nas características do clone C8 de apresentar uma diminuição não pronunciada na expressão de DPP8*Tc*, possuir uma menor modulação da expressão de outras proteases e possuir taxa de metaciclo gênese similar ao observado em parasitos selvagens, os parasitos C8 foram escolhidos para os estudos preliminares de metabolômica por Ressonância Magnética Nuclear. A metabolômica é uma tecnologia que faz parte da ciência das “ômicas” e gera um grande número de dados acerca do

estado metabólica das células, tendo sido utilizada em diversos ramos como descoberta de biomarcadores, estudos de eficácia de drogas, entre outros (MATHEUS et al., 2014).

Contudo, devido ao grande número de amostras, aperfeiçoamento e estabelecimento do seu preparo em nosso grupo, o tempo considerável de processamento e análise dos espectros, foi escolhido realizar o experimento somente com uma réplica (MATHEUS et al., 2014). Considerando o grande número de células necessárias, uma vez que a RMN não ser uma técnica muito sensível, foi utilizada ainda a forma epimastigota do protozoário por ser mais abundante e facilmente obtida em cultura axênica, no entanto, se tem interesse de realizar a técnica nas formas metacíclicas ou durante o processo de diferenciação pois é o principal objeto de estudo.

Frente a grande quantidade de dados obtidos, com quantificação de mais de 30 metabólitos, o foco da análise para este trabalho foi na quantificação do aminoácido prolina, intra e extracelular de forma comparativa entre as linhagens, porém os dados dos outros metabólitos serão minuciosamente analisados posteriormente. Hipotetizou-se que as características apresentadas pelo clone C8 fossem devido a uma maior captação de prolina do meio, em resposta adaptativa ao nocaute da DPP8*Tc*.

Foi observado a maior taxa de consumo de Prolina do C8 em relação ao WT, por meio da diminuição da prolina intracelular, conforme esperado. Além disso, a quantidade de prolina presente no parasito C8 e liberada para o meio extracelular foi maior desde o primeiro ponto medido no dia 3. Isso sugere que o protozoário estava produzindo mais prolina desde de o início do período analisado. Tal fato se sobrepõe a observação de um maior metabolismo de glicose nessa cultura, indicando possível adaptação metabólica como forma de tentar superar a ausência da DPP8*Tc* e pode ser responsável pelas características observadas no clone.

Ademais, é observado um aumento da prolina intracelular ao dia 6 no parasito selvagem, o que não ocorre na cultura mutante. Esse fato pode se dar devido a ação da enzima estudada, se esta auxiliar na geração de prolina livre em conjunto com outra protease, e sua menor expressão na cultura C8 não apresentando esse efeito. Outros estudos mais profundos e análises estatísticas são necessárias para confirmação dos dados obtidos e maior explanação acerca dos fenômenos observados.

A avaliação da função de proteínas é facilitada por meio de manipulações genéticas, e apesar das informações apresentadas neste trabalho, o duplo nocaute para a proteína constitui uma etapa importante para avaliar sua real função e contribuição para processos celulares. Portanto, a metodologia de CRISPR-Cas9 foi utilizada para tentativa de obter os mutantes nulos. O comportamento da cultura transfectada somente com plasmídeo, ainda que a confirmação por PCR seja dificultada por conta do reparo baseado em micro-homologia, desperta possibilidade de ter sido obtida uma cultura nocaute. Seu rápido crescimento impossibilitou a clonagem em placas de 48 poços, uma vez que a cultura se estabeleceu em pouco tempo, não sendo proveniente de uma única célula. A possibilidade de serem parasitos resistentes existe, porém parece pouco provável uma vez que a diferença entre os transfectados selecionados e a cultura controle é significativa. Ainda, não é comum observar a resistência ao antibiótico geneticina, como é visto para o antibiótico higromicina, onde é observada a capacidade do protozoário de copiar o gene de resistência em múltiplos sítios do seu genoma.

Para o parasito transfectado com cassete, os resultados de PCR sugerem que resquírios do cassete presente no meio de cultura podem ter gerado sua amplificação, mas sem a confirmação de integração com combinações de iniciadores fora e dentro do cassete de homologia. Além disso, essa cultura não estava estabelecida ainda, com grande número de parasitos mortos, dificultando sua avaliação. Nos experimentos devem ser realizados uma vez que a cultura for estabelecida.

O experimento de *Western Blot* dos parasitos transfectados, apesar de inicialmente promissor, necessita também de repetição. A coloração da membrana com Ponceau S após a transferência e o resultado da imunodeteção com anti-TAT, posterior a um processo de *stripping*, são contraditórios. Estudos relatam problemas envolvidos no processo de *stripping*, onde os anticorpos podem não ser removidos devidamente, gerando artefatos e introduzindo viés a quantificação por meio da remarcação da membrana (JANES, 2015). Para evitar esse problema, o *stripping* deveria ter sido testado quanto a remoção completa dos anticorpos.

Além disso, o processo de *stripping* pode gerar remoção das proteínas da membrana, e a membrana utilizada (nitrocelulose) não é a mais indicada ao processo como a membrana de PVDF. As condições para remoção, obtidas a partir do protocolo

do kit de imunodeteção por quimioluminescência também constituem um fator para o resultado experimental obtido, uma vez que representa um processo mais agressivo, podendo resultar em maior perda de proteínas da membrana, em comparação a outros observados.

Referente aos resultados obtidos para expressão das RBPs de *T. cruzi*, foi possível obter os anticorpos para cada uma das proteínas, sendo testados e podendo ser utilizados para metodologias de *Western Blot* e imunofluorescência. Essas proteínas são parte de uma família com seis membros, tendo em sua estrutura primária sequências repetitivas de aminoácidos. Diante desse aspecto, as *UBP1Tc* e *UBP2Tc* apresentam grande similaridade entre os demais membros (tabela 3), tendo a maior similaridade entre si (DE GAUDENZI; D'ORSO; FRASCH, 2003). Além disso, esses aminoácidos repetitivos são presentes em várias outras proteínas de *T. cruzi* sendo que a busca por alinhamento local com o programa *BLASTp* (NIH) retornou 16 proteínas do tripanossomatídeo com 30 a 60% de similaridade.

Tabela 3. Porcentagem de similaridade entre os diferentes membros da família RBP *Tc*.

Proteína	<i>UBP1Tc</i>	<i>UBP2Tc</i>	<i>RBP3Tc</i>	<i>RBP4Tc</i>	<i>RBP5Tc</i>	<i>RBP6Tc</i>
<i>UBP1Tc</i>	100,0	71,4	42,9	32,5	39,8	12,4
<i>UBP2Tc</i>		100,0	50,5	48,3	58,4	12,8
<i>RBP3Tc</i>			100,0	47,4	48,3	13,6
<i>RBP4Tc</i>				100,0	53,5	13,2
<i>RBP5Tc</i>					100,0	8,7

Dados obtidos a partir (DE GAUDENZI; D'ORSO; FRASCH, 2003).

Considerando essas informações, é possível que a os anticorpos produzidos em camundongos reconheçam epítomos contendo essas sequências compartilhadas entre os membros da família e outras proteínas de *T. cruzi*, podendo gerar as diferentes marcações observadas contra o extrato do parasito. Além disso, a divergência no tamanho observado no primeiro experimento, a não marcação vista na segunda tentativa pode ser devido a formação de um grumo de proteínas durante o processo de fervura para aplicação em SDS-PAGE. Esse problema foi resolvido aquecendo as proteínas a 70 °C por 5 min.



As imagens de imunofluorescência mostraram uma localização citoplasmática das proteínas, que condiz com os dados presentes na literatura, em que RBPs no citoplasma podem atuar na regulação pela estabilidade do mRNA, sua localização e eficiência de tradução. Já foi constatado anteriormente que a UBP1 *Tc* é uma proteína citosólica em condições normais, e quando sobre estresse pode se concentrar no núcleo dos protozoários (CASSOLA; FRASCH, 2009).



CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Os resultados apresentados ajudam a entender melhor a função da proteína DPP8*Tc* gerando as seguintes contribuições:

- O clone simples nocaute F9 apresentou taxa de metaciclogênese diminuída em relação ao parasito selvagem e clone C8.
- Apesar da taxa metabólica similar ao WT, o clone C8 apresentou diferenças metabólicas, maior produção de prolina intracelular e maior taxa de consumo de prolina ao nono dia, evidenciada por RMN.
- Ocorreu modulação da expressão de proteínas da família das POPs nos parasitos simples nocautes para DPP8*Tc*.
- A DPP8*Tc* é menos expressa nas formas tripomastigotas metacíclicas, o clone F9 apresenta a menor expressão da proteína, e a localização celular é a mesma observada para as formas epimastigotas.
- As construções necessárias para nocaute gênico por CRISPR-Cas9 foram realizadas, porém o nocaute não pode ser confirmado, sendo necessários mais estudos.

Quanto ao estudo das UBPs 1 e 2 de *Trypanosoma cruzi* foi possível:

- Expressar as proteínas recombinantes em sistema procarioto e purificá-las a partir da fração insolúvel.
- Produzir anticorpos policlonais, podendo ser utilizados para imunomarcação em membrana e experimentos de microscopia de fluorescência.



PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

A caracterização das linhagens simples nocautes para o gene da *dpp8tc* permitiu direcionar esforços para o entendimento da sua função com foco nas formas presentes no hospedeiro invertebrado do patógeno. Além disso, importantes ferramentas para estudo das RBPs de *T. cruzi* foram desenvolvidas.

Quanto a DPP8Tc, é necessário avaliar:

- Processo de metaciclogênese frente a inibidores específicos, como forma de corroborar os resultados obtidos.
- Ensaio de RMN com réplicas biológicas e durante o processo de diferenciação do protozoário para formas tripomastigotas metacíclicas.
- Obtenção de nocaute nulo para o gene *dpp8tc*.
- Análise proteômica e peptidômica de parasitos duplo nocaute e simple nocaute.
- Complementação do nocaute para confirmação da contribuição da proteína no processo de metaciclogênese e influência na sua infectividade *in vitro*.
- Avaliar a infectividade *in vivo* dos parasitos nocautes.

No que tange o estudo de RBPs, como as UBP1Tc e UBP2Tc:

- Avaliar os processos de modulação essenciais durante a fase inicial da infecção por interactoma dinâmico com a técnica OOPS.
- Determinar os produtos de interação RBPs-RNA, por meio de técnicas de proteômica e sequenciamento (RNA-seq).
- Validar os dados obtidos por meio de metodologia tradicional, expressão e produzindo anticorpos para outras RBPs identificadas no interactoma.



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, C. A. et al. Cloning , expression and chromosomal localization of a novel human dipeptidyl peptidase (DPP) IV homolog , DPP8. [s. l.], v. 6150, p. 6140–6150, 2000.

ALVES, C. R. et al. Trypanosoma cruzi: Attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of Rhodnius prolixus. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 116, n. 1, p. 44–52, 2007.

ARAÚJO, P. R.; TEIXEIRA, S. M. Regulatory elements involved in the post-transcriptional control of stage-specific gene expression in trypanosoma cruzi - A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 106, n. 3, p. 257–266, 2011.

BACHORIK, J. L. et al. RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. **FEBS Letters**, [s. l.], v. 582, n. 14, p. 1977–1986, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T36-4S21YKM-1/1/5fc67b0becddb7e821fa994aa275a8c0>>

BARISÓN, M. J. et al. Metabolomic profiling reveals a finely tuned, starvation-induced metabolic switch in Trypanosoma cruzi epimastigotes. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 292, n. 21, p. 8964–8977, 2017.

BARRANGOU, R.; HORVATH, P. A decade of discovery: CRISPR functions and applications. **Nature Microbiology**, [s. l.], v. 2, n. June, p. 1–9, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.92>>

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D. **Families and clans of serine peptidases**, 1995.

BASTOS, I. M. et al. Molecular, functional and structural properties of the prolyl oligopeptidase of Trypanosoma cruzi (POP Tc80), which is required for parasite entry into mammalian cells. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 388, n. 1, p. 29–38, 2005.

BASTOS, I. M. D. et al. Parasite Prolyl Oligopeptidases and the Challenge of Designing Chemotherapeutics for Chagas Disease, Leishmaniasis and African Trypanosomiasis. **Current Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 999, n. 999, p. 21–25, 2013.

BAYER-SANTOS, E.; MARINI, M. M.; DA SILVEIRA, J. F. Non-coding RNAs in host-pathogen interactions: Subversion of mammalian cell functions by protozoan parasites. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 8, n. MAR, p. 1–8, 2017.

BEAUVAIS, A. et al. Dipeptidyl-peptidase IV secreted by Aspergillus fumigatus, a fungus pathogenic to humans. **Infection and immunity**, United States, v. 65, n. 8, p. 3042–3047, 1997.

BERN, C. Antitrypanosomal Therapy for Chronic Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 364, n. 26, p. 2527–2534, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1056/NEJMct1014204>>

BERN, C. Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 373, n. 5, p. 456–466, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1056/NEJMra1410150>>

BIOSCIENCES, L. Western Blot Normalization: Challenges and Considerations for Quantitative Analysis. **LI-COR Biosciences**, [s. l.], 2015. Disponível em: <https://www.licor.com/documents/fwf274p9k35hwym6p2keq397p4edho5o?utm_source=field&utm_medium=choosenormflyer&utm_content=normreview&utm_campaign=sarc>

BITAR, M. et al. The spliced leader trans-splicing mechanism in different



organisms: molecular details and possible biological roles. **Frontiers in Genetics**, [s. l.], v. 4, n. October, p. 1–14, 2013.

BORGES, B. C. et al. Mechanisms of Infectivity and Evasion Derived from Microvesicles Cargo Produced by *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 6, n. November, p. 1–7, 2016.

BRENER, Z. *Trypanosoma cruzi*: [s. l.], 1997.

BRINEGAR, A. E.; COOPER, T. A. Roles for RNA-binding proteins in development and disease. **Brain Research**, [s. l.], v. 1647, n. 713, p. 1–8, 2016. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L609162106%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2016.02.050>>

BRINGAUD, F.; RIVIÈRE, L.; COUSTOU, V. Energy metabolism of trypanosomatids: Adaptation to available carbon sources. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [s. l.], v. 149, n. 1, p. 1–9, 2006.

BUSCHINI, A. et al. Genotoxicity Reevaluation of Three Commercial Nitroheterocyclic Drugs: Nifurtimox, Benznidazole, and Metronidazole. **Journal of Parasitology Research**, [s. l.], v. 2009, p. 1–11, 2009.

CASSOLA, A.; FRASCH, A. C. An RNA recognition motif mediates the nucleocytoplasmic transport of a trypanosome RNA-binding protein. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 284, n. 50, p. 35015–35028, 2009.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase 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.

CLAYTON, C. The Regulation of Trypanosome Gene Expression by RNA-Binding Proteins. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 9, n. 11, p. e1003680, 2013.

CLAYTON, C. E. Gene expression in Kinetoplastids. **Current Opinion in Microbiology**, [s. l.], v. 32, p. 46–51, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2016.04.018>>

CONTRERAS, V. et al. The study of trypanosomatid morphogenesis provides useful information about differentiation in unicellular eukaryotes because distinct morphological types alternate during the life cycle. The transformation of epimastigotes into metacyclic trypanomastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [s. l.], v. 16, p. 315–327, 1985.

COURA, J. R. The main scenarios of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 110, n. 3, p. 277–282, 2015.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. [s. l.], v. 45, n. 3, p. 286–296, 2012. Disponível em: <<http://atkins.se/projekt/miljo/sege-park/>>

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, [s. l.], v. 465, p. S6, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nature09221>>

D'ORSO, I.; FRASCH, A. C. C. TcUBP-1, an mRNA destabilizing factor from trypanosomes, homodimerizes and interacts with novel AU-rich element- and poly(A)-binding proteins forming a ribonucleoprotein complex. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 277, n. 52, p. 50520–50528, 2002.

DE ALMEIDA, H. et al. Identification of novel *Trypanosoma cruzi* prolyl oligopeptidase inhibitors by structure-based virtual screening. **Journal of Computer-**

Aided Molecular Design, [s. l.], v. 30, n. 12, p. 1165–1174, 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10822-016-9985-1>>

DE ALMEIDA, K. C. Clonagem e expressão de Oligopeptidase B- símile , X-Prolil dipeptidil aminopeptidase e Glutathion sintetase de *Trypanosoma cruzi* . Clonagem e expressão da Oligopeptidase B- símile , da X-Prolil dipeptidil aminopeptidase e da Glutathion sintetase de Trypa. [s. l.], 2009.

DE ASSIS BURLE-CALDAS, G. et al. Expanding the tool box for genetic manipulation of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [s. l.], v. 203, n. 1–2, p. 25–33, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2015.10.004>>

DE GAUDENZI, J. G. et al. Gene expression regulation in trypanosomatids. **Essays In Biochemistry**, [s. l.], v. 51, p. 31–46, 2011.

DE GAUDENZI, J. G.; D'ORSO, I.; FRASCH, A. C. C. RNA recognition motif-type RNA-binding proteins in *Trypanosoma cruzi* form a family involved in the interaction with specific transcripts in vivo. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 278, n. 21, p. 18884–18894, 2003.

DE MEESTER, I. et al. CD26, let it cut or cut it down. **Immunology Today**, [s. l.], v. 20, n. 8, p. 367–375, 1999. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167569999014863>>

DE SOUZA-LIMA, R. de C. et al. Outbreak of acute Chagas disease associated with oral transmission in the Rio Negro region, Brazilian Amazon. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 46, n. 4, p. 510–514, 2013.

DE SOUZA, W. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. **INTERNATIONAL REVIEW OF CYTOLOGY**, [s. l.], v. 86, n. 1, p. 197–283, 1984.

DEU, E. et al. Functional Studies of Plasmodium falciparum Dipeptidyl Aminopeptidase I Using Small Molecule Inhibitors and Active Site Probes. **Chemistry & Biology**, [s. l.], v. 17, n. 8, p. 808–819, 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074552110002498>>

DIAS, J. C. P. Facing chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 50, n. 3, p. 285–286, 2017.

DJIKENG, A. et al. RNA interference in *Trypanosoma brucei*: cloning of small interfering RNAs provides evidence for retroposon-derived 24-26-nucleotide RNAs. **RNA (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 7, n. 11, p. 1522–30, 2001.

DURINX, C. et al. Molecular characterization of dipeptidyl peptidase activity in serum soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV is responsible for the release of X-Pro dipeptides. **European Journal of Biochemistry**, [s. l.], v. 267, n. 17, p. 5608–5613, 2000.

EL-SAYED, N. M. et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease_supp. **Science**, [s. l.], v. 309, n. 2005, p. 409–416, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/content/309/5733/409.short>>

FIELD, M. C. et al. Anti-trypanosomatid drug discovery: an ongoing challenge and a continuing need. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 217–231, 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrmicro.2016.193>>

FIGUEIRÉDO, D. T. A. Análise funcional preliminar da dipeptidil peptidase 8 e da otubaína de *Trypanosoma cruzi* por meio de nocaute gênico. [s. l.], 2013.

FIGUEIREDO, G. S. F. Caracterização bioquímica e estudo funcional in vitro da dipeptidil peptidase 8 de *Trypanosoma cruzi*. [s. l.], 2017.

FRAIDENRAICH, D. et al. Stimulation of *Trypanosoma cruzi* adenylyl cyclase by an alpha D-globin fragment from *Triatoma hindgut*: effect on differentiation of epimastigote to trypomastigote forms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 90, n. 21, p. 10140–10144, 1993. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8234267>>

FRANCISCO, A. F. et al. Limited Ability of Posaconazole To Cure both Acute and Chronic *Trypanosoma cruzi* Infections Revealed by Highly Sensitive In Vivo Imaging. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 59, n. 8, p. 4653–4661, 2015. Disponível em: <<http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.00520-15>>

GARCIA, E. S. et al. Induction of *Trypanosoma cruzi* Metacyclogenesis in the Gut of the Hematophagous Insect Vector, *Rhodnius prolixus*, by Hemoglobin and Peptides Carrying a-d-globin sequences. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 81, p. 255–261, 1995.

GE, J.; FENG, Æ. Y.; JI, Æ. H. Inactivation of Dipeptidyl Peptidase IV Attenuates the Virulence of *Streptococcus suis* Serotype 2 that Causes Streptococcal Toxic Shock Syndrome. [s. l.], p. 248–255, 2009.

GIRARD, D.; BASTOS, I. M. D.; GRELLIER, P. Identification of a dipeptidyl peptidase from *Trypanosoma brucei*. [s. l.], p. 7–43, 2004.

GLOVER, L.; JUN, J.; HORN, D. Microhomology-mediated deletion and gene conversion in African trypanosomes. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 39, n. 4, p. 1372–1380, 2010.

GRELLIER, P. et al. *Trypanosoma cruzi* Prolyl Oligopeptidase Tc80 Is Involved in Nonphagocytic Mammalian Cell Invasion by Trypomastigotes *. [s. l.], v. 276, n. 50, p. 47078–47086, 2001.

GÜNZL, A. The Pre-mRNA Splicing Machinery of Trypanosomes: Complex or Simplified? **Eukaryotic Cell**, [s. l.], v. 9, n. 8, p. 1159–1170, 2010.

HIGUERA, S. L.; GUHL, F.; RAMÍREZ, J. D. Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (DTUs) through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. **Parasites and Vectors**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 1–6, 2013.

JÄGER, A. V. et al. mRNA maturation by two-step trans-splicing/polyadenylation processing in trypanosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 104, n. 7, p. 2035–2042, 2006.

JANES, K. A. An analysis of critical factors for quantitative immunoblotting. **Science Signaling**, [s. l.], v. 8, n. 371, p. rs2-rs2, 2015. Disponível em: <<http://stke.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/scisignal.2005966>>

KOLEV, N. G.; TSCHUDI, C.; ULLU, E. RNA Interference in Protozoan Parasites: Achievements and Challenges. **Eukaryotic Cell**, [s. l.], v. 10, n. 9, p. 1156–1163, 2011.

KOLEV, N. G.; ULLU, E.; TSCHUDI, C. The emerging role of RNA-binding proteins in the life cycle of *Trypanosoma brucei*. **Cellular Microbiology**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 482–489, 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/cmi.12268>>

LANDER, N. et al. Different Roles of Mitochondrial Calcium Uniporter Complex Subunits in Growth and Infectivity of *Trypanosoma cruzi*. **mBio**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 1–16, 2017.

LANDER, N.; CHIURILLO, M. A.; DOCAMPO, R. Genome Editing by CRISPR/Cas9: A Game Change in the Genetic Manipulation of Protists. **The Journal of eukaryotic microbiology**, [s. l.], v. 63, v. 2016/07/15, n. 5, p. 679–690, 2016. Disponível

em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27315329>>

LEE, B. Y. et al. Global economic burden of Chagas disease: A computational simulation model. **The Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 342–348, 2013. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70002-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70002-1)>

M. L. QUEIROZ, R. et al. **Unbiased dynamic characterization of RNA-protein interactions by OOPS**, bioRxiv, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1101/333336>>

MANNE-GOEHLER, J. et al. Estimating the Burden of Chagas Disease in the United States. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 10, n. 11, p. 1–7, 2016.

MATHEUS, N. et al. An easy, convenient cell and tissue extraction protocol for nuclear magnetic resonance metabolomics. **Phytochemical Analysis**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 342–349, 2014.

MAUGERI, D. A.; CANNATA, J. J. B.; CAZZULO, J.-J. Glucose metabolism in *Trypanosoma cruzi*. **Essays In Biochemistry**, [s. l.], v. 51, p. 15–30, 2011.

MINNING, T. A. et al. The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. **BMC Genomics**, [s. l.], v. 10, 2009.

MOSS, C. X. et al. An Essential Signal Peptide Peptidase Identified in an RNAi Screen of Serine Peptidases of *Trypanosoma brucei*. [s. l.], p. 1–15, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0123241>>

MOTTA, F. N. et al. The *Trypanosoma cruzi* Virulence Factor Oligopeptidase B (OPBTc) Assembles into an Active and Stable Dimer. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. e30431, 2012. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0030431>>

NOÉ, G.; DE GAUDENZI, J. G.; FRASCH, A. C. Functionally related transcripts have common RNA motifs for specific RNA-binding proteins in trypanosomes. **BMC Molecular Biology**, [s. l.], v. 9, p. 1–19, 2008.

OHARA-NEMOTO, Y. et al. Identification and characterization of prokaryotic dipeptidyl-peptidase 5 from *Porphyromonas gingivalis*. **The Journal of biological chemistry**, United States, v. 289, n. 9, p. 5436–5448, 2014.

OTABE, T. et al. CRISPR–Cas9-based photoactivatable transcription systems to induce neuronal differentiation. **Nature Methods**, [s. l.], v. 14, n. 10, p. 963–966, 2017.

PAHO; WHO. CHAGAS DISEASE Key facts. [s. l.], p. 9978, 2017.

PENG, D. et al. CRISPR-Cas9-Mediated Single-Gene and Gene Family Disruption in *Trypanosoma cruzi*. [s. l.], v. 6, n. 1, p. 1–11, 2014.

PITMAN, M. R.; MENZ, R. I.; ABBOTT, C. A. Hydrophilic residues surrounding the S1 and S2 pockets contribute to dimerisation and catalysis in human dipeptidyl peptidase 8 (DP8). **Biological Chemistry**, [s. l.], v. 391, n. 8, 2010. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/view/j/bchm.2010.391.issue-8/bc.2010.111/bc.2010.111.xml>>

POLGAR, L. The prolyl oligopeptidase family. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 59, n. 2, p. 349–362, 2002. Disponível em: <<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed5&NEWS=N&AN=2002076523>>

POOLE, L. B.; KARPLUS, P. A.; CLAIBORNE, A. Protein sulfenic acids in redox signaling. **Annual review of pharmacology and toxicology**, United States, v. 44, p. 325–347, 2004.

RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A.; RASSI, A. Chronic chagas cardiomyopathy: A review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment



following the BENznidazole evaluation for interrupting trypanosomiasis (BENEFIT) trial. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 112, n. 3, p. 224–235, 2017.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, [s. l.], v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)>

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. **Families of serine peptidases**. [s.l: s.n.]. v. 244

RE, A. et al. RNA–Protein Interactions: An Overview. In: [s.l: s.n.]. p. 491–521.

ROJAS, F. et al. Oligopeptide Signaling through TbGPR89 Drives Trypanosome Quorum Sensing. **Cell**, [s. l.], v. 176, n. 1–2, p. 306–317.e16, 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867418313977>>

ROMANO, P. S. et al. Molecular and Cellular Mechanisms Involved in the Trypanosoma cruzi/Host Cell Interplay. [s. l.], v. 64, n. 5, p. 387–396, 2012.

SANDER, J. D.; JOUNG, J. K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 32, n. 4, p. 347–350, 2014.

SANTOS, S. J.; TAKAHASHI, C. S.; NATARAJAN, A. T. Cytogenetic effects of the antichagasic benznidazole on human cells in vitro. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, [s. l.], v. 320, n. 4, p. 305–314, 1994.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral transmission of chagas disease. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 54, n. 6, p. 845–852, 2012.

SILVA, C. L. Estudo funcional da prolil oligopeptidase de Trypanosoma cruzi e Leishmania infantum: nocaute gênico, inibição enzimática e processos infectivos. [s. l.], 2018.

SORIANO-ARANDES, A. et al. Control and management of congenital Chagas disease in Europe and other non-endemic countries: current policies and practices. **Tropical Medicine & International Health**, [s. l.], v. 21, n. 5, p. 590–596, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/tmi.12687>>

STANAWAY, J. D.; ROTH, G. The Burden of Chagas Disease Estimates and Challenges. **Global Heart**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 139–144, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.gheart.2015.06.001>>

TURK, B.; TURK, D.; TURK, V. Protease signalling: The cutting edge. **EMBO Journal**, [s. l.], v. 31, n. 7, p. 1630–1643, 2012.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The Life Cycle Of Trypanosoma Cruzi. [s. l.], v. 31, p. 472–481, 2001.

VAZQUEZ, M. P. The Genetics and Genomics of Trypanosoma cruzi. **International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 1–11, 2007. Disponível em: <[http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/0706/IJBPS_1\(1\)/IJBPS_1\(1\)1-11o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/0706/IJBPS_1(1)/IJBPS_1(1)1-11o.pdf)>

VIEIRA, C. B. et al. Triatomines: Trypanosomatids, Bacteria, and Viruses Potential Vectors? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 8, n. November, p. 1–12, 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2018.00405/full>>

WANG, Y. et al. A “suicide” CRISPR-Cas9 system to promote gene deletion and restoration by electroporation in Cryptococcus neoformans. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, p. 1–13, 2016.



WHO. **Chagas disease (American Trypanosomiasis)**. 2019. Disponível em: <[https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))>.

WIPPEL, H. H. et al. The Nuclear RNA-binding Protein RBSR1 Interactome in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, [s. l.], 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jeu.12666>>

WRAY, G. A. et al. The evolution of transcriptional regulation in eukaryotes. **Molecular Biology and Evolution**, [s. l.], v. 20, n. 9, p. 1377–1419, 2003.

YAO, T.-W. et al. A novel role of dipeptidyl peptidase 9 in epidermal growth factor signaling. **Molecular cancer research : MCR**, United States, v. 9, n. 7, p. 948–959, 2011.

ZHANG, C.; WANG, J.; QUAN, R. Development and application of CRISPR/Cas9 technologies in genomic editing. **Human Molecular Genetics**, [s. l.], v. 27, n. R2, p. R79–R88, 2018. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddy120>>

ZHANG, H. et al. Advances in Understanding the Expression and Function of Dipeptidyl Peptidase 8 and 9. **Molecular Cancer Research**, [s. l.], v. 11, n. 12, p. 1487–1496, 2013.

ZIGMAM, B.; ZILTON, A.; MANOEL, B.-N. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2. ed. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.