



**Universidade de Brasília**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Biologia Celular**  
**Pós graduação em Biologia Microbiana**  
**Laboratório de Biologia do Gene**

**Dissertação de Mestrado**

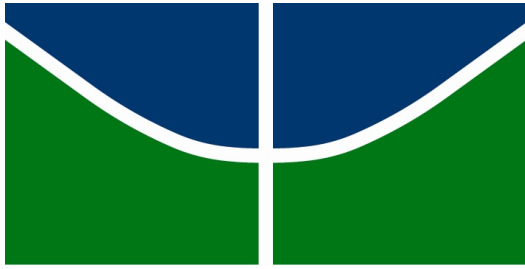
**Estudo da proteína centrina5 de *Trypanosoma cruzi***

**Mariana Mathias Conroy Araujo**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Beatriz Dolabela de Lima**

**Brasília**

**2020**



**Universidade de Brasília**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Biologia Celular**  
**Pós graduação em Biologia Microbiana**  
**Laboratório de Biologia do Gene**

**Dissertação de Mestrado**

**Estudo da proteína centrina5 de *Trypanosoma cruzi***

**Mariana Mathias Conroy Araujo**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Beatriz Dolabela de Lima**

**Dissertação de mestrado apresentada ao  
programa de Pós Graduação em Biologia  
Microbiana da Universidade de Brasília**

**Brasília**

**2020**

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Beatriz Dolabela de Lima pela orientação. A senhora sempre teve muita paciência comigo, me ensinou imensamente e me inspira todos os momentos a ser uma cientista melhor. Obrigada pela dedicação, pela disponibilidade e por acreditar nas minhas ideias malucas. Obrigada de verdade.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Izabela Marques Dourado Bastos que se mostrou disponível quando precisei e me ajudou com orientações e durante todo o mestrado e até antes de começar. Obrigada pelo tempo compartilhado.

À todos os integrantes do Labiogene. Agnelo, a melhor pessoa! que me ensinou as coisas mais básicas e pelo bom humor que emana felicidade e bondade. Bianca, minha irmãzinha, a pessoa mais dedicada que eu já conheci. Quero ser igual você quando eu crescer. Juliana, Fabiana, Agenor que sempre me ajudaram quando eu precisei. Amigos orientandos da Prof<sup>a</sup>. Cecília Favalli que sofreram comigo esse perrengue chamado mestrado.

Aos integrantes do LIPH, que sempre estiveram ali mesmo que fosse para desestressar ou me ajudar com experimentos. Em especial Clênia dos Santos Azevedo, que me ajudou muito com todos os experimentos do CRISPR/Cas9 e dedicou tantas horas corridas dos dias malucos para me ensinar e estar comigo durante todo o processo. Agradeço também Amanda Rocha que, nos 45 do segundo tempo, dedicou algumas horas da sua vida nos meus momentos finais, obrigada pelas dicas e por toda ajuda.

À minha família. Sem vocês com certeza não teria chegado tão longe. Obrigada por me apoiarem nas minhas vontades e acreditarem em mim. À Eneyd Jannuzzi Mathias que sempre me incentivou e esteve ao meu lado desde que eu me entendo por gente. Emanuela Mathias Conroy e Hugo de Carvalho Araujo que me deram a vida e amor. Margareth de Barbosa Carvalho que nunca desacreditou da minha capacidade. Gabriel Martins Araujo que é simplesmente o irmão mais maravilhoso do mundo, sempre será meu bebê.

Aos meus amigos que sempre estiveram do meu lado. Nunca deixaram de acreditar em mim e me incentivaram a ser uma pessoa melhor e confiante. Minhas amigas do Ensino Médio: Carolina Coelho, Clara Luna, Gabriela Araujo, Jamile Calil, Marcela Oliveira, não acredito que estamos juntas há 10 anos!! Marcela Campos, minha metadinha; Henrique Rivero, moção maravilhoso e toda sua família; Eduardo Carvalho. Todos meus amigos da Bio, cês sabem quem vocês são e eu amo muito vocês. Meus amados do UF10V que nunca deixaram de me apoiar e ouviram todos meus desabafos sem me julgar. Todos os amigos que eu não citei e que moram no meu coração, vocês são muito especiais pra mim e foram a família que eu escolhi.

Finalmente à Universidade de Brasília que me acolheu desde a graduação e me moldou como um ser humano melhor e consciente. À CAPES pelo apoio financeiro durante todo o período do mestrado.

“Science has taught me that everything is more complicated than we first assume, and that being able to derive happiness from discovery is a recipe for a beautiful life.”

**Hope Jahren - Lab Girl**

## RESUMO

O *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da Doença de Chagas, zoonose endêmica das Américas do Sul e Central. É um parasito da ordem Kinetoplastidea, família Trypanosomatidae caracterizado pelo DNA mitocondrial cinetoplasto (kDNA). Atualmente estima-se que 8 milhões de pessoas estão infectadas com *T. cruzi* no mundo das quais 4,6 milhões no Brasil. As proteínas Centrininas foram descritas inicialmente como componentes dos centros organizadores de microtúbulos em eucariotos. São proteínas da família *EF-Hand* composto por dois pares de hélice-alça-hélice, motivo de ligação ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Ao se ligar ao  $\text{Ca}^{2+}$ , essas proteínas mudam de conformação conferindo mobilidade ao sistema. Em cinetoplastídeos foram descritas cinco centrinas (CEN1 - CEN5) que se relacionam com a duplicação de organelas e citocinese, sendo que a CEN5 foi identificada apenas nesse grupo de organismos e ainda é muito pouco estudada. A centrina5 em *T. cruzi* possui a expressão de mRNA relativamente alta em todas as principais fases de vida. Esse trabalho teve como objetivo o estudo da proteína centrina5 de *T. cruzi*. A partir da sequência de aminoácidos predita para essa proteína, realizamos análises *in silico*. O estudo das famílias proteicas da TcCEN5 previu dois domínios *EF-hand*, responsáveis pela ligação ao  $\text{Ca}^{2+}$ . A modelagem tridimensional da proteína previu uma estrutura com a pontuação de GMQE igual a 0,64. Os estudos filogenéticos relacionaram a TcCEN1 e TcCEN3 à TcCEN5; assim possivelmente, essas proteínas possuem funções análogas. Para o estudo da função, silenciamento gênico foi realizado através do sistema CRISPR/Cas9. Para tal, parasitos modificados de *T. cruzi*, que expressam a Cas9, foram utilizados em conjunto a RNAs guia (sgRNA) com o objetivo de induzir mutação gênica no gene *TcCEN5* introduzindo códons de parada precoce. Os sgRNAs desenvolvidos e utilizados nesse trabalho foram eficientes para gerar o silenciamento gênico, entretanto, não houve detecção de mudança na morfologia do parasito. Estudos posteriores são necessários a fim de estabelecer uma função para essa proteína dentro da fisiologia do *T. cruzi*.

Palavras-Chave: *Trypanosoma cruzi*, centrina, Doença de Chagas, CRISPR-Cas9

## ABSTRACT

*Trypanosoma cruzi* is the etiologic agent of Chagas' disease, an endemic zoonosis in South and Central America. It is a parasite of the order Kinetoplastidea, family Trypanosomatidae, characterized by the mitochondrial kinetoplast DNA (kDNA). Currently it is estimated that 8 million people are infected with *T. cruzi* in the world, 4.6 million of these patients, in Brazil. Centrin proteins were initially described as components of microtubule organizing centers in eukaryotes. They are proteins of the EF-Hand family composed of two pairs of helix-loop-helix, reason for binding to  $\text{Ca}^{2+}$ . When binding to  $\text{Ca}^{2+}$ , these proteins change conformation giving mobility to the system. In kinetoplastids, five Centrins (CEN1 - CEN5) have been described. They are related to the duplication of organelles and cytokinesis. CEN5 has been identified only in this group of organisms and is still very poorly studied. Centrin 5 in *T. cruzi* has relatively high mRNA expression in all main life stages. This work aimed to study the *T. cruzi* Centrin 5 protein. From the aminoacid sequence predicted for this protein, we perform in silico analyses. The study of the protein families of TcCEN5 predicted two EF-hand domains, responsible for binding to  $\text{Ca}^{2+}$ . The three-dimensional modeling of the protein predicted a structure with a GMQE score of 0.64. Phylogenetic studies related TcCEN1 and TcCEN3 to TcCEN5; possibly, these proteins have analogous functions. For the study of function, gene silencing was performed using the CRISPR-Cas9 system. For this purpose, modified *T. cruzi* parasites, which express Cas9, were used together with guide RNAs (sgRNA) in order to induce gene mutations in the *TcCEN5* gene by introducing early stop codons. The sgRNAs developed and used in this work were efficient to generate gene silencing, however, there was no detection of variation in the parasite's morphology. Further studies are needed in order to establish a function for this protein within the physiology of *T. cruzi*.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, Centrin, Chagas Disease, CRISPR-Cas9

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 HISTÓRICO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 A DOENÇA DE CHAGAS.....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 O <i>Trypanosoma cruzi</i>.....</b>	<b>3</b>
<b>1.4 TRANSMISSÃO.....</b>	<b>5</b>
<b>1.5 EPIDEMIOLOGIA.....</b>	<b>9</b>
<b>1.6 DIAGNÓSTICO.....</b>	<b>11</b>
<b>1.7 TRATAMENTO.....</b>	<b>13</b>
<b>1.8 PREVENÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>1.9 ORGANIZAÇÃO CELULAR DO <i>Trypanosoma cruzi</i> .....</b>	<b>16</b>
<b>1.10 CentrinaS.....</b>	<b>19</b>
<b>1.11 CentrinaS EM TRYPANOSOMATIDAE.....</b>	<b>22</b>
<b>1.12 SILENCIAMENTO DA TcCEN5 COM CRISPR/CAS9.....</b>	<b>23</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>28</b>
<b>3 OBJETIVO.....</b>	<b>30</b>
<b>4 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>31</b>
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
<b>5.1 MATERIAIS .....</b>	<b>33</b>
<b>5.2 MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>6.1 ANÁLISES <i>IN SILICO</i>.....</b>	<b>49</b>
<b>6.2 SILENCIAMENTO GÊNICO.....</b>	<b>59</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>69</b>
<b>8 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>70</b>
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>71</b>



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Países europeus e anos de implementação de políticas de análise de sangue de indivíduos em situação de risco para transfusão.....	11
Tabela 2. Programas governamentais de contenção da doença da Chagas dos países endêmicos da América do Sul e ano de implementação.....	15
Tabela 3. Número de acesso aos bancos de dados das sequências utilizadas para análises <i>in silico</i> das centrinas.....	37
Tabela 4. Parâmetros utilizados para Reação em Cadeia da DNA Polimerase (PCR).....	41
Tabela 5. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação da sequência <i>scaffold</i> de pX330...	44
Tabela 6. Sequências dos cassetes de DNA sintetizadas para indução do reparo por homologia com introdução de códon de parada.....	45
Tabela 7. Oligonucleotídeos utilizados para confirmação da inserção do códon de parada no reparo por homologia.....	46
Tabela 8. Oligonucleotídeos utilizados para a PCR tipo <i>nested</i> .....	47
Tabela 9. Matriz de identidade entre Centrinas de <i>Trypanosoma cruzi</i> e centrina5.....	53
Tabela 10. Sequências escolhidas para a produção do sgRNA pela plataforma EuPaDGT....	59
Tabela 11. Quantificação dos sgRNA após purificação.....	53

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais formas de vida e morfologia do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	4
Figura 2. Ciclo de vida e transmissão vetorial do protozoário <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	6
Figura 3. Distribuição geográfica das principais espécies de triatomíneos nas Américas.....	7
Figura 4. Número estimado de casos de infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> em 2016.....	9
Figura 5. Representação esquemática de secção longitudinal da forma epimastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	17
Figura 6. Representação esquemática do motivo <i>EF-Hand</i> .....	20
Figura 7. Representação esquemática do domínio <i>EF-Hand</i> .....	21
Figura 8. Expressão relativa de mRNA nas três formas de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> em relação a expressão do gene de manutenção GAPDH.....	24
Figura 9. Visão geral do mecanismo de aquisição de sequências e interferência do sistema CRISPR/Cas9.....	26
Figura 10. Diagrama da endonuclease Cas9 com sgRNA pareado à sequência exógena e induzindo a clivagem das duas fitas do DNA.....	27
Figura 11. Mecanismo de ação e indução de reparo por homologia direta (HDR).....	27
Figura 12. Estratégia experimental para a análise <i>in silico</i> de TcCEN5.....	31
Figura 13. Estratégia experimental para análise da função de TcCEN5.....	32
Figura 14. Mapa físico do plasmídeo pX330.....	36
Figura 15. Fluxograma para escolha de sgRNA mais eficiente.....	43
Figura 16. Esquema de amplificação da sequência <i>scaffold</i> inserida no vetor pX330.....	43
Figura 17. Estruturas dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação da sequência <i>scaffold</i> do vetor pX330.....	44
Figura 18. Reação de PCR do tipo <i>Nested</i> .....	47
Figura 19. Modelagem da estrutura quaternária da proteína TcCEN5 pelo programa <i>Swiss-Model</i> .....	50
Figura 20. Alinhamento dos aminoácidos de TcCEN5 e da estrutura tridimensional criada em <i>Swiss-Prot</i> .....	52
Figura 21. Alinhamento múltiplo das centrinas de tripanossomatídeos e ScCDC31.....	54

Figura 22. Árvore filogenética dos tripanossomatídeos e ScCDC31.....	55
Figura 23. Alinhamento múltiplo das centrinas de tripanossomatídeos, ScCDC31 e <i>Homo sapiens</i> .....	56
Figura 24. Árvore filogenética dos tripanossomatídeos, ScCDC313 e <i>Homo sapiens</i> .....	57
Figura 25. Produto da amplificação do vetor pX330.....	60
Figura 26. Produto de RNA proveniente da transcrição <i>in vitro</i> e após purificação.....	60
Figura 27. Amplificação das sequências mutagenizadas com códon de parada.....	62
Figura 28. Curva de crescimento dos parasitos transfectados com sistema AMAXA 1.....	62
Figura 29. Análises de imunofluorescência dos $1 \times 10^7$ parasitos transfectados.....	63
Figura 30. <i>Nested</i> PCR dos oligonucleotídeos específicos para sgRNA_153.....	64
Figura 31. <i>Nested</i> PCR dos oligonucleotídeos específicos para sgRNA_145_revcom.....	65
Figura 32. Curva de crescimento dos parasitos transfectados com sistema AMAXA 2.....	66
Figura 33. Análises de imunofluorescência dos $5 \times 10^6$ parasitos transfectados.....	67

## ABREVIATURAS

AMCHA - Iniciativa dos Países Amazônicos

CRISPR - Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespçadas

crRNA - CRISPR RNA

DAPI - 4',6'-diamino-2-fenil-indol

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

dNTP - Deoxinucleotídeo Trifosfato

EDTA - Ácido Etileno-Diamino-Tetra-Acético

ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

FAZ - Zona de Adesão Flagelar

GPI - Glicosilfosfatidilinositol

HDR - Reparo Dirigido por Homologia

IAC - Iniciativa do Países Andeanos

IFA - Imunofluorescência Indireta

INCOSUR - Iniciativa do Cone Sul

IPTG - Isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosida

kDNA - DNA mitocondrial de cinetoplastídeos

kDa - kiloDaltons

MMEJ - Junção final mediada por microhomologia

MMPS - Metaloproteinases de Matriz

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

NPC - Complexo de Poro Nuclear

NUC - Domínio Nuclear da Cas9

OMS - Organização Mundial da Saúde

PAM - Motivo Adjacente ao Protoespaçador

pb - Pares de Base

PBS - Tampão Salina Fosfato

PCR - Reação em Cadeia da DNA Polimerase

pH - Potencial Hidrogeniônico

PFR - Estrutura Paraflagelar

REC - Domínio de Reconhecimento da Cas9

RNA - Ácido Ribonucleico

RNAi - RNA interferente

sgRNA - RNA guia

SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SCC - Proteínas de Coesão das Cromátides Irmãs

TA - Temperatura Ambiente

tracrRNA - RNA transativador

X-Gal - 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo

TIMPs - Inibidoras Teciduais de Metaloproteinases



## 1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana é uma zoonose causada pelo parasito intracelular *Trypanosoma cruzi* e transmitida, principalmente, por insetos hematófagos, conhecidos popularmente como barbeiros. Essa doença é endêmica das Américas Central e do Sul e, devido à migração humana, se espalhou por diversos países da América do Norte, Europa e Oceania (COURA e VINAS, 2014). Além disso, a doença de Chagas também faz parte das 18 doenças tropicais negligenciadas (OMS, 2017). A falta de desenvolvimento de novas técnicas e medicamentos contra Chagas ocorre principalmente pela falta de financiamento pelas empresas farmacêuticas e de biotecnologia e pela escassez de incentivo governamental (PEDRIQUE, 2013). Entre 2007 e 2012, foram destinados apenas 4,7% de financiamento para doenças causadas por cinetoplastídeos, enquanto para a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) houve 36,5% de suporte financeiro (HORSTICK *et al.*, 2015).

### 1.1 HISTÓRICO

A evidência mais antiga encontrada para a infecção com *T. cruzi* datada há 9000 anos e foi retirada de espécimes mumificados (Chinchorros) da região do deserto do Atacama entre o norte do Chile e o sul do Peru (ALLISON *et al.*, 2003). No Brasil, os indícios mais antigos de infecção em humanos foram encontrados no sítio arqueológico do Abrigo do Malhador no Vale do Peruaçu, em Minas Gerais, que datam entre 4500 e 7000 anos atrás (FERNANDES *et al.*, 2008).

No entanto, a primeira descrição da doença de Chagas e seu agente etiológico foi feita por Carlos Chagas apenas em 1909 durante uma campanha antimalária, no norte de Minas Gerais. Enquanto a estrada de ferro da Central do Brasil era construída, Carlos Chagas encontrou insetos hematófagos da Família Reduviidae nas residências e descreveu a presença de organismos flagelados no intestino deles. Com esses insetos, Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro, infectou primatas, cães, cobaias, coelhos e, em cerca de um mês, observou esses mesmos protozoários no sangue periférico desses animais e verificou que alguns eram mais vulneráveis às ações do parasito. A partir daí, Chagas fez testes nos moradores da região e

também observou a presença dos parasitos em humanos, o que comprovou a relação entre o parasito, inseto e mamíferos (CHAGAS, 1909).

## 1.2 A DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas é contraída quando o homem é infectado com o parasita *Trypanosoma cruzi*. Possui duas fases clínicas: aguda e crônica. A fase aguda, normalmente é assintomática. Nesse período, há uma alta parasitemia e pode durar entre um e dois meses. Apesar disso, se não tratados, cerca de 2-8% dos pacientes podem vir a óbito durante esse período (PEREIRA *et al.*, 2009; CHATELAIN, 2015). Em alguns casos, o paciente pode desenvolver alguns sintomas inespecíficos como febre, edema, adenomegalia, hepatoesplenomegalia, miocardite ou meningoencefalite (PEREIRA *et al.*, 2009). Como a infecção pode progredir para uma doença crônica e portanto, persistente, é fundamental que o diagnóstico seja feito rapidamente após a infecção (FILARDY *et al.*, 2018).

A fase crônica pode se manifestar num período de 10 até 30 anos após a infecção inicial. Cerca de 60% dos pacientes não desenvolvem manifestações sintomáticas da doença, apresentando a chamada forma indeterminada. A mesma é caracterizada pela presença de anticorpos anti-*T. cruzi*, porém sem manifestação sintomática nos órgãos (CHATELAIN, 2015). Aproximadamente 40% dos pacientes infectados desenvolvem uma das três formas clínicas: cardíaca, digestiva e cardiodigestiva (CHATELAIN, 2015). O desenvolvimento da doença está ligado principalmente à linhagem do parasito, forma de transmissão, se o paciente já sofre com alguma doença infecciosa e padrão imunológico do paciente (CARDOSO *et al.*, 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). A principal causa de morte desses pacientes envolve insuficiência cardíaca (70%), o restante pode vir a óbito de forma súbita (CHATELAIN, 2015). Como na fase crônica há baixa parasitemia, a detecção da infecção torna-se mais difícil (PEREIRA *et al.*, 2009).

A progressão da forma cardíaca é a mais severa das condições clínicas. A resposta imune à infecção causa danos a células e tecidos causando manifestações clínicas (DA SILVA COSTA *et al.*, 2019). Na fase aguda há liberação de citocinas e quimiocinas que induzem respostas pró-inflamatórias (CARDOSO *et al.*, 2006; DA SILVA COSTA *et al.*, 2019). A fase crônica caracteriza-se pela remodelação tecidual causada pelo parasito (DA SILVA COSTA *et*



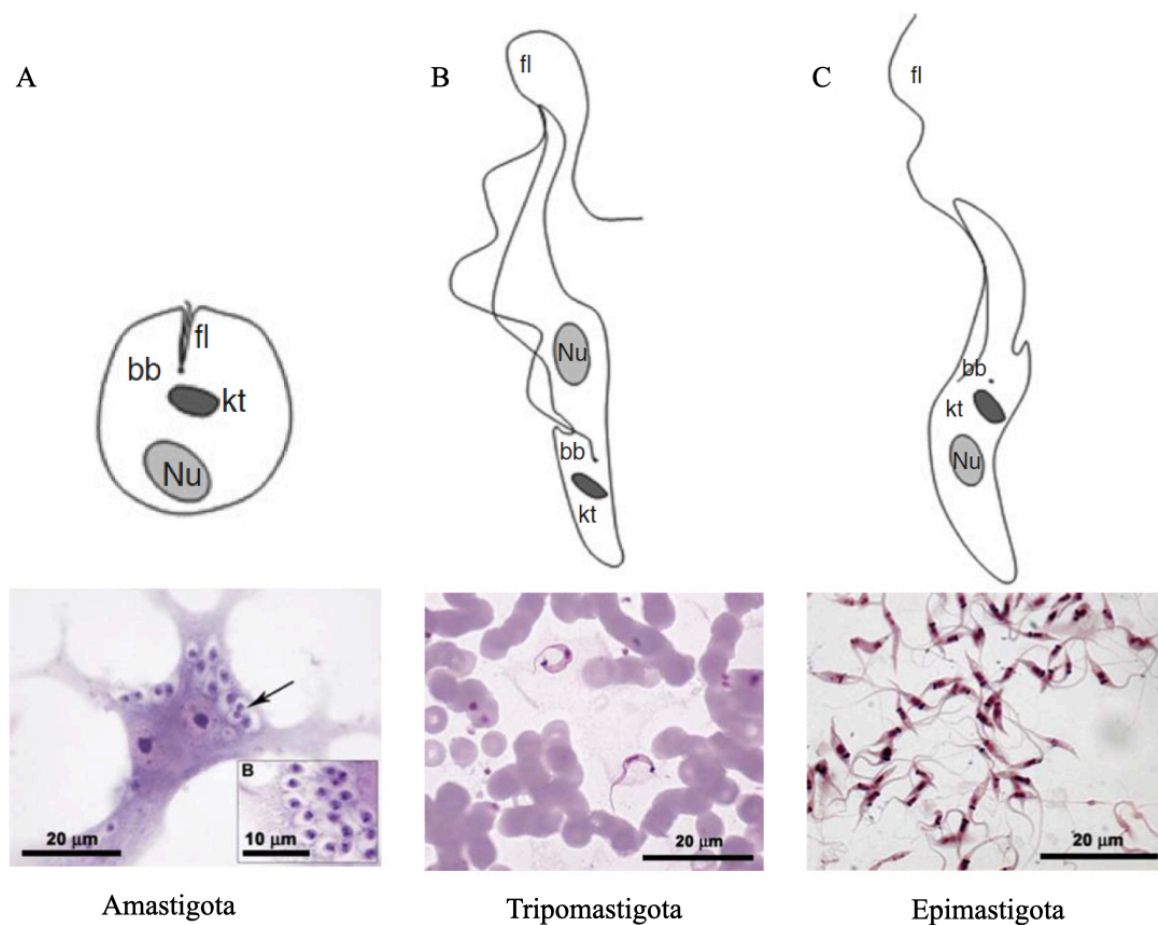
*al.*, 2019). Metaloproteinases de Matriz (MMPs) e Inibidoras Teciduais de Metaloproteinases (TIMPs) são responsáveis pela resposta pró-inflamatória com a deposição de colágeno na matriz extracelular. Durante a infecção, a expressão dessas enzimas é alterada (DA SILVA COSTA *et al.*, 2019). MMPs são responsáveis por degradar a matriz extracelular e são reguladas pelas TIMPs. No decorrer da infecção, com a ativação das TIMPs, ocorre inibição das MMPs, causando acúmulo de matriz extracelular e, portanto, remodelagem do tecido (DA SILVA COSTA *et al.*, 2019). Os principais sintomas da forma cardíaca são: arritmia, insuficiência cardíaca e tromboembolismo (RASSI *et al.*, 2010).

A forma digestiva da doença de Chagas é a segunda mais frequente em pacientes crônicos (ENEZ e HENRIQUEZ, 2019). Os sintomas relacionam-se às denervação entéricas e hipertrofia de órgãos gastrointestinais desde glândulas salivares, esôfago, estômago, intestino, vesícula biliar (MATSUDA *et al.*, 2009). As alterações do funcionamento desses órgãos causam distúrbios alimentares, má absorção de nutrientes e constipação intestinal (RASSI *et al.*, 2010 e ENEZ e HENRIQUEZ, 2019).

A forma cardiodigestiva é descrita pela combinação dos sintomas cardíacos e digestivos (RASSI *et al.*, 2010). Os sintomas cardíacos normalmente se manifestam primeiro em relação ao megaesôfago e/ou megacólon (RASSI JR *et al.*, 2012). A progressão da doença para a forma cardiodigestiva tem relação com a resposta imunológica do paciente. DA SILVA COSTA *et al.* (2019) descreveu que, na progressão cardiodigestiva, a produção de citocinas é feita pelos eosinófilos.

### **1.3 O *Trypanosoma cruzi***

O *Trypanosoma cruzi* é um parasito unicelular da Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae. É caracterizado pela presença do flagelo e do kDNA, uma rede de DNA extranuclear que corresponde ao material genético da mitocôndria do parasito (LEVINE *et al.*, 1980). Os parasitos são digênicos, com um hospedeiro vertebrado e um invertebrado. Durante seu ciclo de vida passa por mudanças morfológicas e fisiológicas no qual apresenta três principais formas de vida: amastigota, epimastigota e tripomastigota. As formas são morfológicamente distintas e definidas a partir da localização do cinetoplasto em relação ao núcleo e da origem do flagelo (Figura 1) (DE LANA E MACHADO, 2010).



**Figura 1. Principais formas de vida e morfologia do *Trypanosoma cruzi*.** (A) Forma amastigota é arredondada, com 2- 2,5µm, flagelo interno. (B) Tripomastigota possui forma alongada com 20-30 µm, cinetoplasto posterior e flagelo que emerge por baixo da membrana citoplasmática. (C) Epimastigota com formato fusiforme, com 20 - 30 µm, cinetoplasto em região posterior e livre. Nu, núcleo; bb, corpo basal; kt, cinetoplasto; fl, flagelo (CARVALHO, 2017; ALBA SOTO e GONZÁLEZ CAPPÁ, 2019; adaptado).

Amastigota, forma intracelular do parasito; é diferenciada no citoplasma da célula hospedeira a partir de tripomastigotas e se multiplica por divisão binária. Possui forma ovalada com grande núcleo, cinetoplasto e flagelo recluso no bolso flagelar (ALBA SOTO e GONZÁLEZ CAPPÁ, 2019). Após diversos ciclos de multiplicação, amastigotas se diferenciam em tripomastigotas, as células infectadas se rompem liberando mais parasitos. (ALBA SOTO e GONZÁLEZ CAPPÁ, 2019).

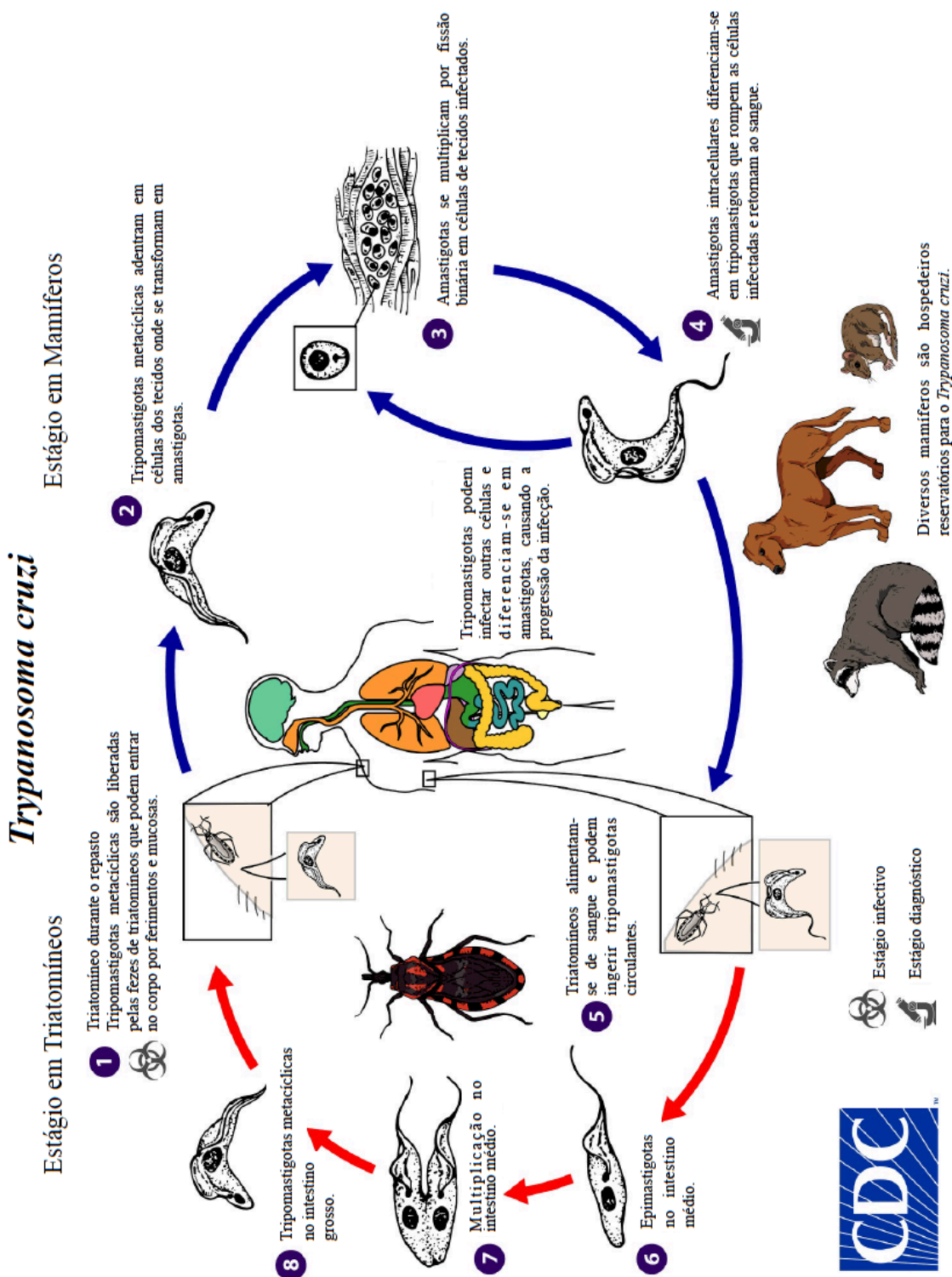
Epimastigota é a forma de vida não infectiva para mamíferos. É encontrada no intestino médio do inseto vetor e se multiplica por divisão binária. Possui um aspecto fusiforme e cinetoplasto é localizado entre o núcleo e o flagelo que emerge livremente (ALBA SOTO e GONZÁLEZ CAPPÁ, 2019). Tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas no intestino de triatomíneos devido as características particulares desse

ambiente, incluindo temperatura, proteínas e tipos celulares (ALBA SOTO e GONZÁLEZ CAPPÀ, 2019).

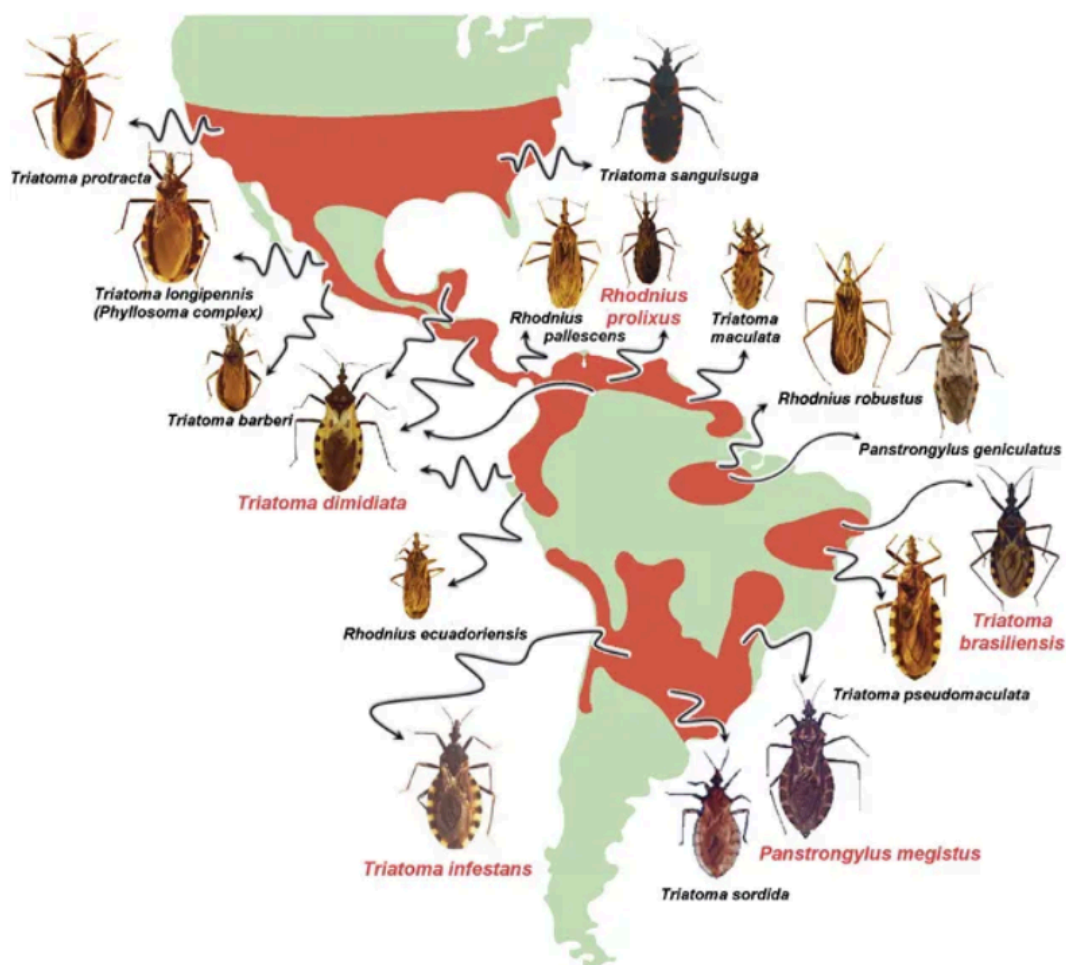
A forma tripomastigota é alongada, possui cinetoplasto anterior ao núcleo, o flagelo emerge de perto do cinetoplasto por baixo da membrana citoplasmática com forma de membrana ondulante; essa forma é encontrada no inseto e em mamíferos. A forma tripomastigota metacíclica é resultado da metaciclogênese do parasito no intestino de triatomíneos; é a forma infectiva liberada nas excretas do inseto. A forma tripomastigota sanguínea é a circulante no sangue dos mamíferos, diferenciada a partir da forma amastigota intracelular nas células de mamíferos (ALBA SOTO e GONZÁLEZ CAPPÀ, 2019). Essa forma de vida é considerada infectiva, pois pode entrar em diversos tipos celulares. A entrada do parasito em células é feita por via de receptores que ainda não foram totalmente caracterizados. Uma vez dentro das células, a mudança de ambiente, como mudança de pH, presença de moléculas do meio intracelular e cascata de fosforilação/ desfosforilação induz a mudança morfológica das tripomastigotas para amastigotas (ALBA SOTO e GONZÁLEZ CAPPÀ, 2019).

#### 1.4 TRANSMISSÃO

A forma clássica de transmissão (Figura 2) do *T. cruzi* ocorre vetorialmente por insetos, conhecidos popularmente por “barbeiros”, dos Gêneros *Rhodnius*, *Panstrongylus* e *Triatoma* (Ordem: Hemiptera, Família: Reduviidae, Subfamília: Triatominae), que possuem uma distribuição endêmica nas Américas (Figura 3). A Subfamília Triatominae é caracterizada pelo hábito hematófago, e provavelmente todas espécies são capazes de transmitir o *T. cruzi* (SCHOFIELD e GALVÃO, 2009). Os barbeiros contaminam-se com parasitos durante o repasto, ao ingerir sangue contaminado com *T. cruzi* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). No intestino médio dos triatomíneos, os parasitos se diferenciam na forma replicativa (epimastigota) e, quando atingem a porção final do intestino, novamente se diferenciam na forma infectiva para vertebrados (tripomastigotas metacíclicas). Durante a alimentação dos insetos, há liberação de tripomastigotas metacíclicas pelos excrementos (CLAYTON, 2010). O *T. cruzi* pode entrar no corpo de mamíferos em lesões causadas pela picada do inseto e também pelas mucosas (JANSEN *et al.* 2017).



**Figura 2. Ciclo de vida e transmissão vetorial do protozoário *Trypanosoma cruzi*.** (1) Insetos triatomíneos são hematófagos e ao se alimentar liberam formas tripomastigotas pelas fezes. Esses parasitos entram no corpo humano por ferimentos ou mucosas. (2) Ao entrar em células, o *T. cruzi* diferencia-se em amastigotas. (3) As amastigotas se multiplicam dentro de células por fissão binária. (4) Ao se multiplicar dentro das células as amastigotas podem se diferenciar novamente em tripomastigotas e romper a célula liberando mais parasitos no sangue. (5) Ao se alimentar, triatomíneos podem ingerir tripomastigotas circulantes. (6) No intestino médio do triatomíneo, os parasitos passam por outra diferenciação para a forma epimastigota. (7) Epimastigotas se multiplicam por fissão binária no intestino médio. (8) No intestino grosso de triatomíneos o parasito passa pela metacicloogênese na qual retorna ao estágio de tripomastigota metacíclica (CDC, 2019; adaptado).



**Figura 3. Distribuição geográfica das principais espécies de triatomíneos nas Américas.** Nomes de espécies em vermelho representam as mais importantes como vetor de transmissão do *T. cruzi* (GOURBIÈRE *et al.*, 2012).

A transmissão vetorial depende das condições de moradia e distribuição do hospedeiro invertebrado (DIAS *et al.*, 2008). Por isso, a sua maior incidência é comum em regiões rurais e mais arborizadas em que haja proximidade dos triatomíneos e humanos (CARLOS PINTO DIAS *et al.*, 2015). Conseqüentemente, a população mais atingida trata-se de indivíduos com menor poder aquisitivo, em condições de moradia marginalizada e afastada de centros urbanos (PAHO, 2016; SOUZA, 2016). A transmissão é continuada dependendo do estado de infecção do homem ou espécies reservativa. Ou seja, a quantidade de parasitos circulantes no sangue, a cepa do parasito e as condições imunológicas do hospedeiro vertebrado. Destaca-se que, em 2006, a Organização Pan-Americana de Saúde certificou o Brasil com a interrupção da transmissão vetorial pela espécie *Triatoma infestans* (FERREIRA e SILVA, 2006). Mesmo assim, outras espécies de triatomíneos ainda são encontradas em todas as regiões brasileiras

(RIBEIRO JR *et al.*, 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019), incluindo *T. infestans* (BRANDÃO *et al.*, 2015).

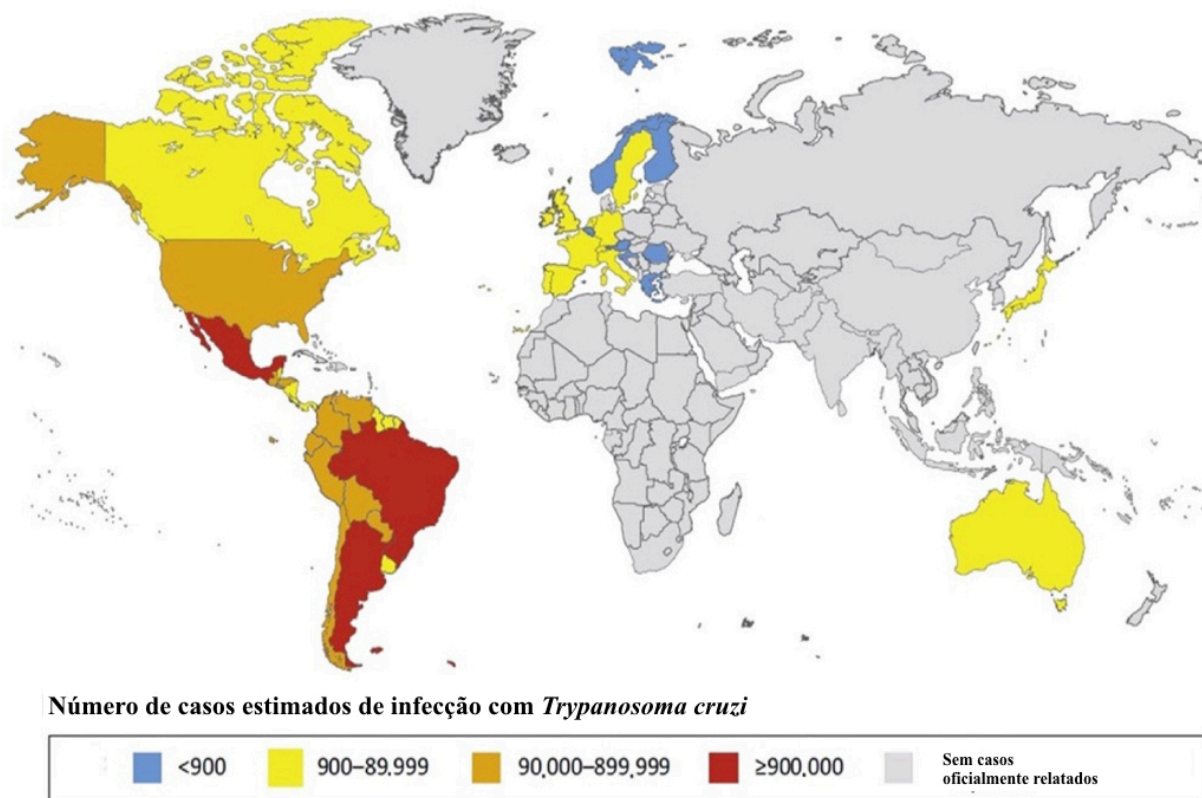
A transmissão oral ocorre quando há ingestão do parasito em triatomíneos e/ou suas excreções (VALENTE *et al.*, 2009, SOUZA-LIMA, 2013). Os principais alimentos contaminados são açaí (*Euterpe oleracea*) e cana de açúcar (*Saccharum spp.*) (DIAS *et al.*, 2008). Desde 1960 são descritos diferentes casos de transmissão oral (DIAS *et al.*, 2008; NÓBREGA *et al.*, 2009, ALARCÓN DE NOYA *et al.*, 2010). A transmissão oral causa surtos de infecção aguda em áreas domiciliadas (ALARCÓN DE NOYA *et al.*, 2010, RASSI JR *et al.*, 2012). Dentre as formas de transmissão, essa também é a mais complexa para ser confirmada (ALARCÓN DE NOYA *et al.*, 2010). Diferentemente das outras formas de infecção, a via oral não contém evidências para a construção de um diagnóstico, como sinal de Romaña e possibilidade de análise sorológica de doadores ou mães infectadas (ALARCÓN DE NOYA *et al.*, 2010). Além disso, as manifestações clínicas após a contaminação são mais severas que as de outras formas de transmissão (SÁNCHEZ e RAMÍREZ, 2013). Foi reportado que 87,2% dos pacientes desenvolvem sintomas quando infectados pela via oral (ALARCÓN DE NOYA e NOYA GONZÁLEZ, 2019).

A transmissão de mãe para feto pode ocorrer em qualquer fase da gravidez e em gestações posteriores (SÁNCHEZ e RAMÍREZ, 2013). A transmissão congênita pode causar aborto, nascimento prematuro e lesões fetais no fígado, baço, coração e sistema nervoso central (SÁNCHEZ e RAMÍREZ, 2013). Pacientes infectados congenitamente com *T. cruzi* têm 30% de chance de desenvolver uma das formas crônicas sintomáticas (SÁNCHEZ e RAMÍREZ, 2013).

Outras formas de transmissão do *T. cruzi* são por transfusão sanguínea e transplante de órgãos (CHATELAIN, 2015). Esse tipo de transmissão aumentou principalmente após a segunda metade do século XX, em países não endêmicos (DIAS, 2013). Nos casos de infecção por produtos sanguíneos e órgãos, normalmente o paciente não apresenta nenhum sintoma agudo. Quando estes são presentes, são em pacientes imunossuprimidos, que apresentam problemas neurológicos, como meningite e encefalite, e insuficiência cardíaca (MOREAES-SOUZA e FERREIRA-SILVA, 2011).

## 1.5 EPIDEMIOLOGIA

Cerca de 6 a 7 milhões de pessoas estão infectadas com o *T. cruzi* no mundo (Figura 4) (OMS, 2020). Anualmente, 10 mil pessoas falecem em decorrência das complicações da doença, principalmente por progressão das disfunções cardíacas (KIRCHHOFF *et al.*, 2018).



**Figura 4.** Número estimado de casos de infecção por *Trypanosoma cruzi* em 2016. (SANTOS *et al.*, 2020; adaptado).

Estima-se que no Brasil existam 4,6 milhões de pessoas infectadas com o *T. cruzi* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019; MARTINS-MELO *et al.*, 2014). Em 2018, 6,6% dos casos registrados não tiveram a forma de transmissão definida (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). A negligência do sistema público em relação a doença de Chagas contribui para que muitos desses casos não sejam diagnosticados, e conseqüentemente não sejam adequadamente tratados.

No último Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde (2019), foram confirmados 380 novo casos no ano de 2018. Desses, 86,8% ocorreram pela transmissão oral do *T. cruzi* (ANDRADE *et al.*, 2014). A segunda forma forma mais registrada foi a vetorial

(6,1%) pelo ciclo silvático (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Em 2006, o Brasil certificou a interrupção da transmissão vetorial por *T. infestans*, a principal espécie responsável por essa transmissão (COURA e VINAS, 2014). Mesmo assim, em um relatório epidemiológico, 13 espécies de triatomíneos foram reportadas por toda extensão do país, incluindo o *T. infestans* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). A maior incidência da doença de Chagas foi registrada na região Norte (92,1%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Os casos reportados de transmissão oral foram confirmados no estado do Amazonas: 2004, no município de Tefé, uma paciente com testes confirmados pela ingestão de vinho de açaí (*Euterpe oleracea*) (MEDEIROS *et al.*, 2008); 2008, em Coarí (BARBOSA-FERREIRA *et al.*, 2010); 2010, em Santa Isabel do Rio Negro (SOUZA-LIMA *et al.*, 2013). A transmissão por via congênita também foi reportada pelo boletim epidemiológico do Ministério da Saúde (2019), porém em menor porcentagem dos casos (0,3%).

Diversos países não endêmicos relatam pessoas infectadas por vias de transmissão como transfusões de sangue e via congênita (CASTRO, 2009; SÁNCHEZ e RAMÍREZ, 2013; ANDRADE *et al.*, 2014; STRASEN *et al.*, 2014; ANTINORI *et al.*, 2017). A disseminação da doença nesses países decorre do aumento da migração humana e reemergência da transmissão nos países endêmicos (ANDRADE *et al.*, 2014; MARTINS-MELO *et al.*, 2019). As taxas europeias de transmissão vertical variam entre 2,6% a 13,8% e a soroprevalência é maior entre imigrantes Bolivianas (11,4% a 34,1%) (ANTINORI *et al.*, 2017). Em relação a locais não endêmicos, na Europa há menor taxa de transmissão por transfusões. Isto acontece porque, assim como no Brasil, diversos países adotaram políticas de triagem de produtos sanguíneos para doadores submetidos a condições de risco de contaminação (Tabela 1) (ANTINORI *et al.*, 2017).

Nos Estados Unidos, a estimativa de imigrantes infectados é de 2% (SCHMUNIS e YADON, 2010). No Canadá foram estimados, em 2006, que 3,5% dos imigrantes latinos estavam infectados com o *T. cruzi* (SCHMUNIS e YADON, 2010). Na Europa, a prevalência da doença de Chagas em imigrantes chega a 4,7% (SMITH e MARCOS, 2019). Estimativas de imigrantes infectados com *T. cruzi* na Espanha chegam a 2,3% do total de imigrantes latinos (GASCON *et al.*, 2010). Na Itália, as estimativas chegam a 11% de pessoas infectadas (REPETTO *et al.*, 2015). Países na Oceania também reportam pacientes infectados com *T.*



*cruzi*. Na Austrália, 1,65% dos imigrantes latinos estão infectados e na Nova Zelândia 1,3% dos imigrantes estão contaminados (JACKSON *et al.*, 2014).

**Tabela 1. Países europeus e anos de implementação de políticas de análise de sangue de indivíduos em situação de risco para transfusão.**

<b>País</b>	<b>Ano de implementação</b>
Reino Unido	2005
Espanha	2005
França	2009
Suécia	2009
Suíça	2012
Bélgica	2013

Fonte: REQUENA-MÉNDEZ *et al.*, 2014

## 1.6 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da doença de Chagas é construído a partir dos antecedentes epidemiológicos, manifestações clínicas apresentadas pelo paciente e os testes laboratoriais (OSTERMAYER, *et al.*, 2017). Os profissionais de saúde devem atentar-se às diferentes fases da doença (aguda e crônica) pois os testes diagnósticos são diferentes para detecção da infecção (LUQUETTI e SCHMUNIS, 2017). O diagnóstico completo e correto permite a escolha do tratamento adequado e proporciona informações epidemiológicas importantes para a interrupção da transmissão (LUQUETTI e SCHMUNIS, 2017).

Durante a fase aguda, as metodologias são baseadas, principalmente, em testes parasitológicos que permitem a visualização do parasito a partir de amostras do sangue. Dentre elas, a mais indicada é a visualização em sangue fresco em microscópio, porém a sensibilidade desses testes é proporcional à parasitemia (GOMES, 2017). Outros testes utilizados são baseados na concentração e observação do parasito: Strout (1962), no qual o sangue é coagulado e separado do soro que depois é analisado em microscópio para detecção de parasitos; Microhematócrito, no qual o sangue é retirado por um capilar que é centrifugado para separar as diferentes células do sangue, o parasito é observado na mesma porção dos leucócitos (LUQUETTI e SCHMUNIS, 2017). O teste imunológico, que pode ser feito na

fase aguda, é a detecção de anticorpos IgM anti-*T. cruzi* por imunofluorescência indireta ou aglutinação direta; mesmo assim esse teste não possui tanta sensibilidade quanto o diagnóstico direto pois depende da resposta imunológica do paciente (BRITTO e MOREIRA, 2017). O diagnóstico em recém-nascidos é feito a partir do sangue do cordão umbilical ou venipuntura e analisado por métodos convencionais de diagnóstico (SÁNCHEZ e RAMÍREZ, 2013).

O diagnóstico durante a fase crônica é feito, principalmente, por métodos imunológicos já que há uma parasitemia muito baixa (OMS, 2007). Cerca de 98% dos pacientes infectados possuem os anticorpos específicos (OMS, 2007). Dessa forma, deve-se realizar testes em combinação, um com alta sensibilidade e outro, alta especificidade (OMS, 2007). Os principais testes imunológicos utilizados são ELISA e Imunofluorescência indireta (IFA) (OMS, 2007). A imunofluorescência indireta (IFA) é feita utilizando um anticorpo IgG anti-humano em combinação com um anticorpo conjugado fluorescente, que é observado em microscópio de fluorescência. Apesar de muito sensível, a IFA requer equipamentos caros e técnicos especializados para a execução do teste (LUQUETTI e SCHMUNIS, 2017). O método imunoenzimático ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) utiliza antígenos conjugados a células, que reagem a anticorpos com marcadores fluorescentes, que são analisados em espectrofotômetros, garantindo a objetividade do teste; mesmo assim, técnicos especializados e aparelhos para análise são necessários para realizar o teste (LUQUETTI e SCHMUNIS, 2017).

A detecção por xenodiagnóstico, hemocultura e PCR é utilizada apenas como forma de confirmar testes sorológicos positivos (OMS, 2007). Xenodiagnóstico é feito com a alimentação de triatomíneos a partir de amostras de sangue do paciente. Essa técnica demanda habilidades técnicas, tempo e grande colônia para que possa ser confirmado o diagnóstico (LUQUETTI e SCHMUNIS, 2017). A hemocultura é definida pelo crescimento de cultura do parasito *in vitro* a partir de amostra sanguínea. As limitações desse teste envolvem os materiais, que devem ser estéreis, tempo, pois as culturas devem crescer em 30 dias e habilidades dos profissionais do laboratório (CHIARI *et al.*, 1989; LUQUETTI e SCHMUNIS, 2017). O método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem como objetivo amplificar sequências específicas do parasito, como sequências do DNA do cinetoplasto (kDNA). O diagnóstico com essa ferramenta é normalmente o mais preciso; a

parasitemia, no entanto, é um fator a ser considerado caso o teste seja negativo (BRITTO e MOREIRA, 2017).

## 1.7 TRATAMENTO

Como a doença de Chagas acomete principalmente pessoas em países pobres e pouco desenvolvidos, ela encontra-se na lista de doenças negligenciadas pela OMS. Dessa forma, há pouco investimento para a descoberta de novas drogas (PEDRIQUE, 2013). Isso pode ser comprovado pela disponibilidade de tratamento existente (CHAO *et al.*, 2020). As únicas duas drogas aprovadas para o tratamento da doença de Chagas são Benznidazol e Nirfutimox, que foram descobertas nas décadas de 1960 e 1970, respectivamente. São medicamentos que possuem maior eficiência antiparasitária na fase aguda da doença (PÉREZ-SILANES *et al.*, 2016). As taxas de cura em pacientes em fase aguda são de 65% a 80%; em recém-nascidos infectados pela via congênita, a taxa de cura pode chegar a 100% (MOLINA *et al.*, 2015). Durante a fase crônica, a taxa em adultos varia de 15% a 35% e em crianças, 60% (MOLINA *et al.*, 2015).

O Benznidazol é a principal escolha medicamentosa contra a doença de Chagas e o Nirfutimox é utilizado como tratamento alternativo. Apesar da relativa eficiência, esses medicamentos são bastante tóxicos para o paciente, dados os efeitos colaterais como acometimento do sistema nervoso central e periférico, alterações no funcionamento da medula óssea, intolerância gastrointestinal e irritação da pele (DIAS, 2013).

Em gestantes, o tratamento deve ser interrompido, pois ainda não se sabe os efeitos adversos da terapia; porém, com a suspeita, pode-se diagnosticar recém-nascidos que, se tratados, podem ser curados da infecção (SÁNCHEZ e RAMÍREZ, 2013).

Outros fármacos estão sendo testados contra a infecção do *T. cruzi*, como o antifúngico Posaconazol, pertencente à classe dos triazóis, que impede a via do ergosterol em microorganismos, necessária para a multiplicação do parasito durante a infecção (MOLINA *et al.*, 2015). Ergosterol é um esterol constituinte da membrana de fungos e protozoários, responsável por modular a fluidez, integridade e permeabilidade da membrana do parasito (SANTOS *et al.*, 2020). Em modelos murinos, as taxas de cura foram 90% na fase aguda e 60% na fase crônica, ou seja, maiores índices que os tratamentos anteriores (MOLINA *et al.*,

2015). Apesar do sucesso nesses modelos, essas taxas não foram reproduzidas em testes clínicos com humanos (MOLINA *et al.*, 2015). Mesmo assim, estudos com terapias combinatórias de Posaconazol e Benznidazol em murinos obtiveram respostas positivas, pois reduziram a carga parasitária e houve diminuição nas lesões teciduais em comparação com terapias únicas (ECHEVERRÍA *et al.*, 2020).

Após 60 anos do desenvolvimento de medicamentos contra Chagas, ainda temos apenas os dois mesmos medicamentos disponíveis para o tratamento da doença (CHAO *et al.*, 2020). Além de antiquado, o tratamento existente é não possui taxas de cura significativas, contém efeitos adversos nocivos para os pacientes (SANTOS *et al.*, 2020). Pacientes mais suscetíveis, como idosos e gestantes, encontram-se desamparados pelo tratamento disponível (VIOTTI *et al.*, 2009). Dessa forma, torna-se significativo o estudo profundo do parasito com o objetivo de desenvolvimento de novos fármacos no contexto da doença de Chagas (CHAO *et al.*, 2020).

## 1.8 PREVENÇÃO

Além da terapia com fármacos, a prevenção da transmissão também é uma medida que também deve ser considerada para o tratamento da doença. De acordo com a OMS (2017), a transmissão do *T. cruzi* deve ser prevenida com medidas de controle relacionadas aos hospedeiros. Para isso, as estratégias de prevenção devem considerar as diversas formas de transmissão do parasito, ecologia e distribuição de triatomíneos, possibilidade de contaminação por transfusões sanguíneas e transplante de órgãos e a transmissão congênita (ALBAJAR-VINAS *et al.*, 2011).

No tocante ao hospedeiro invertebrado, as medidas de controle incluem: eliminação dos triatomíneos com inseticidas; melhoria nas condições de moradia; instalação de telas mosquiteiras e incentivo a campanhas de prevenção e instrução (OMS, 2017; PAHO, 2016). Desde 1991, países endêmicos para Chagas criaram diversos programas (Tabela 2) para eliminação dos vetores e controle da doença de Chagas (COURA *et al.*, 2014). Contudo, por falta de vigilância e fiscalização, esses programas governamentais têm falhado em conter efetivamente o número de novas infecções (ANDRADE *et al.*, 2014). Além disso, o número de espécies de triatomíneos capazes de transmitir o *T. cruzi* passa de 140, o que torna o

controle complicado e a reemergência da transmissão um risco constante (SCHOFIELD e GALVÃO, 2009; COURA *et al.*, 2014; PINAZO e GASCON, 2015).

**Tabela 2. Programas governamentais de contenção da doença da Chagas dos países endêmicos da América do Sul e ano de implementação.**

Nome do programa	Países participantes	Ano de implementação	Objetivos
Iniciativa Cone Sul (INCOSUR)	Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai, Uruguai	1991	Eliminar <i>T. infestans</i> e outros triatomíneos, regularizar os bancos de sangue
Iniciativa dos Países Andeanos (IAC)	Colômbia, Equador, Peru, Venezuela	1997	Eliminar os vetores
Iniciativa dos Países Amazônicos (AMCHA)	Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana, Guiana Francesa, Peru, Suriname e Venezuela	2002	Analisar os riscos da doença, identificar requisitos para monitoramento e prevenção da doença de Chagas

Fonte: COURA *et al.*, 2014

Em relação a hospedeiros vertebrados, as medidas de controle abrangem o ciclo silvático e os hospedeiros humanos. Como já foram reportados mamíferos e aves que podem ser reservatórios do *T. cruzi*, a prevenção da transmissão do parasito deve englobar o tratamento das redes de saneamento básico e promover saúde pública veterinária (OMS, 2010).

Em humanos, as medidas de controle envolvem principalmente a diversificação e melhoramento das formas de diagnóstico, com testes mais sensíveis à infecção e capacitação profissional para realizá-los (OMS, 2013). A migração humana de zonas rurais para centros urbanos também é um fator a ser considerado na prevenção da transmissão. Após a segunda metade do século XX, com globalização, urbanização e migração de pessoas, o risco de expansão da doença de Chagas aumentou, principalmente pelas vias transfusional e congênita (DIAS, 2013; PINAZO e GASCON, 2015). No Brasil, é compulsória a notificação da infecção da doença de Chagas para doadores de órgãos ou derivados de sangue e transplante de órgãos (RAMOS *et al.*, 2018).

Em países não endêmicos, a principal forma de controle da transmissão acontece pela fiscalização de bancos de transfusão de sangue, transplante de órgãos e triagem em recém-

nascidos (REQUENA-MÉNDEZ *et al.*, 2014). Apenas alguns países da União Europeia demandam testes laboratoriais específicos para o *T. cruzi* para imigrantes de países endêmicos (BASILE *et al.*, 2011; REQUENA-MÉNDEZ *et al.*, 2014). O primeiro país a implementar testes para prevenção da transmissão foi o Reino Unido, em 1999, enquanto a Espanha e a França só começaram essa prática em 2005 e 2009, respectivamente. O último país a testar materiais para transfusão foi a Suíça, em 2013 (REQUENA-MÉNDEZ *et al.*, 2014). Mesmo assim, o *T. cruzi* continua sendo disseminado, já que portadores não são identificados porque os testes laboratoriais não são universalizados e padronizados (REQUENA-MÉNDEZ *et al.*, 2017).

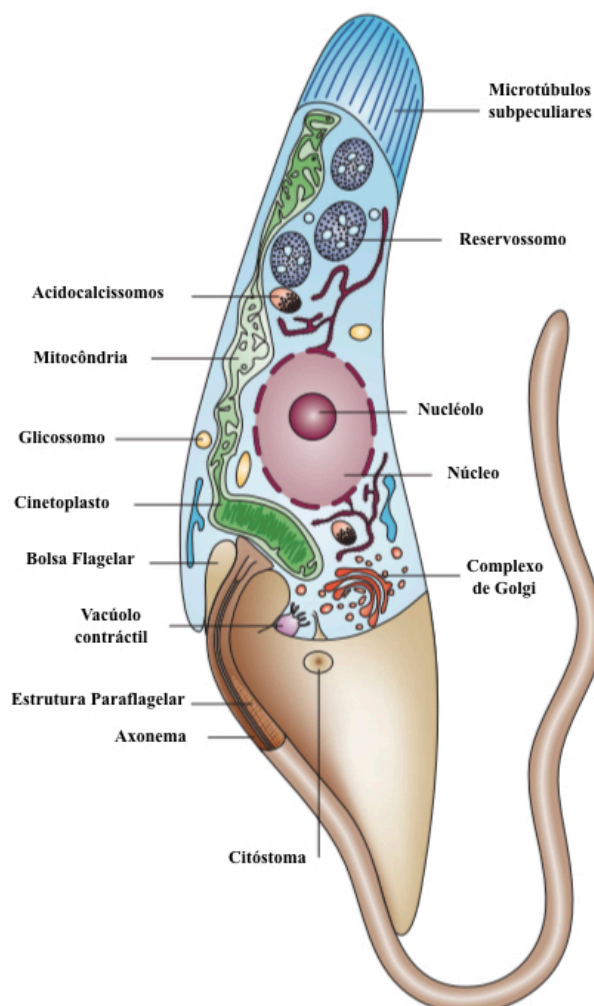
Os sistemas de doação de sangue e transfusão de órgão devem construir bases de triagem desses materiais para garantir a segurança de todos os usuários (OMS, 2007). Em 2013, a OMS divulgou um guia de avaliação da aptidão de doadores de sangue que incentiva a padronização das práticas de centros de banco de sangue e derivados. O manual tem como objetivo dar segurança a pacientes e técnicos. Além disso, incentiva o aperfeiçoamento estrutural, científico e educacional principalmente na capacitação profissional e na educação dos usuários e doadores de sangue.

O controle da transmissão via oral deve limitar o contato do *T. cruzi* com alimentos. Isso é feito ao criar barreiras entre o alimento e animais contaminados com *T. cruzi* em casa, com o uso de telas, inseticidas e guardando os alimentos, para que triatomíneos e seus excrementos não contaminem os alimentos. Outra medida de profilaxia tem relação com a indústria e distribuidores dos produtos que podem ser contaminados; para prevenir isso, esses alimentos devem ser pasteurizados (ALARCÓN DE NOYA e GONZÁLEZ, 2019).

### **1.9 ORGANIZAÇÃO CELULAR DO *Trypanosoma cruzi***

Por se tratar de um organismo eucarioto, o *T. cruzi* possui um núcleo definido, organelas compartimentalizadas (Figura 5), citoesqueleto, metabolismo e regulação genética complexos (KOUMANDOU *et al.*, 2013). A membrana externa é formada por bicamada lipídica na qual as principais proteínas de membrana são ancoradas, principalmente por glicosilfosfatidilinositol (GPI) (ALBA SOTO e GONZÁLEZ CAPPA, 2019). As organelas cinetoplasto, glicosomos, acidocalcissomos são presentes na Ordem Kinetoplastidea e

servem como a principal forma de classificação e diferenciação dentro desse grupo (KOUMANDOU *et al.*, 2013).



**Figura 5.** Representação esquemática de seção longitudinal da forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi*. (DOCAMPO *et al.*, 2005; adaptada).

O Núcleo é um compartimento definido por bicamada lipídica (SOUZA, 2002), responsável por manter o material genético separado do citoplasma e coordenar a expressão gênica (KOUMANDOU *et al.*, 2013). Em toda sua extensão, a membrana nuclear possui poros (*Nuclear Pore Complexes* - NPCs), que mantêm uma comunicação com o meio extranuclear pela passagem de substratos, proteínas e RNAs (SOUZA *et al.*, 2017; KOUMANDOU *et al.*, 2013). Nas diferentes formas de vida do parasito, o núcleo se molda em diferentes conformações. Em tripomastigotas, o núcleo se torna alongado e com heterocromatina não condensada (CALDERANO *et al.*, 2017). Em formas replicativas e

durante esse processo, a membrana nuclear permanece intacta e arredondada. Essa conformação é possível devido à organização intranuclear mantida por microtúbulos e pela dispersão da cromatina para a periferia do núcleo (SOUZA *et al.*, 2017; CALDERANO *et al.*, 2017).

Os cinetoplastídeos foram classificados pela formação e organização da mitocôndria. A mitocôndria do *Trypanosoma cruzi* é a principal organela de geração energética, e sintetiza metabólitos essenciais para o funcionamento celular (CALDERANO *et al.*, 2017). O material genético da mitocôndria, chamado de cinetoplasto (kDNA), é formado por uma concatenação de maxicírculos e minicírculos de DNA que ficam posicionados conforme as diferentes formas de vida do parasito (SOUZA *et al.*, 2017).

O citoesqueleto mantém a forma do parasito, confere mobilidade e movimentação celular. É uma estrutura composta por microtúbulos, filamentos espessos, filamentos intermediários e microfilamentos (SOUZA e VIDAL, 2017). Desses componentes, os principais são os microtúbulos, formados pelas proteínas actina e tubulina que compõem a camada subpeculiar abaixo da membrana plasmática, responsável por manter o formato do parasito e conferir resistência a danos mecânicos (SOUZA e VIDAL, 2017; ALBA SOTO e GONZÁLEZ CAPPÀ, 2019). Os microtúbulos também compõem o complexo citósoma-citofaringe, um canal de ligação dos corpos basais até a bolsa flagelar e uma estrutura tubular pelo citoplasma (SOUZA *et al.*, 2017). Os filamentos espessos e intermediários ainda não foram completamente descritos, porém também possuem função estrutural (SOUZA, 2002). Os microfilamentos são formados principalmente por actina e são relacionados intimamente com a forma, movimento e transporte de moléculas do parasito (SOUZA, 2002).

O flagelo emerge da bolsa flagelar que é uma invaginação da membrana plasmática e não é mantida pelo citoesqueleto. Na bolsa flagelar, há uma estrutura bilobular que se associa ao aparato de Golgi e possui diversas proteínas constituintes, em especial a centrina2 (SOUZA *et al.*, 2017). O flagelo é formado por nove pares de microtúbulos periféricos e um par central associado ao corpúsculo basal, que é composto por nove trincas de microtúbulos (SOTO e CAPPÀ, 2019). Conforme o estágio de vida do parasito, o flagelo emerge de diferentes localizações (SOUZA, 2002). A principal função do flagelo é motilidade celular e reconhecimento sensorial do meio (CALDERANO *et al.*, 2017). Além disso, é coberto por uma membrana e liga-se ao citoplasma pela zona FAZ (*Flagellar Attachment Zone*) e ao



corpúsculo basal que é ligado ao citoplasma e ao cinetoplasto. O corpúsculo basal possui uma função semelhante ao centríolo, do qual partem os centros organizadores do fuso mitótico, que formam os microtúbulos do flagelo e fazem a separação dos cromossomos durante a citocinese (CALDERANO et al., 2017). A parte axial, ou externa, do flagelo possui estrutura paraflagelar (PFR) que é responsável pela motilidade. O flagelo é anexado ao corpo do parasito, é necessário para sua sobrevivência e atua na evasão imunológica pelo parasito (CALDERANO et al., 2017).

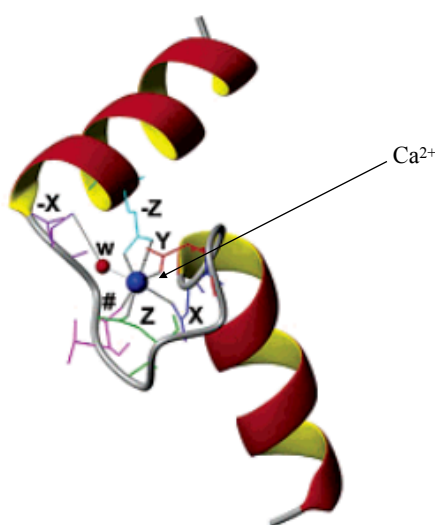
O *Trypanosoma cruzi* também possui pequenas organelas formadas por uma única bicamada lipídica, os glicossomos e acidocalcissomos. Os glicossomos são organelas esféricas distribuídas pelo corpo do parasito; são responsáveis por concentrar e compartimentalizar enzimas da via glicolítica (CALDERANO et al., 2017; ALBA SOTO e GONZÁLEZ CAPPÁ, 2019). Essa organela engloba enzimas de processos metabólicos celulares como glicólise, salvamento de purinas, oxidação de ácidos graxos, biossíntese de pirimidinas, isoprenol e esteróis (SOUZA et al., 2017). Os acidocalcissomos são grânulos eletrondensos e ácidos que estocam cálcio, fósforo, potássio, sódio, zinco, mantém o pH celular e osmorregulação já que o parasito muda de morfologia e ambiente durante o ciclo de vida (SOUZA et al., 2017; SOUZA e VIDAL, 2017). Os acidocalcissomos são úteis durante condições de estresse osmótico ou nutricional e são relacionadas à virulência do parasito. O  $\text{Ca}^{2+}$  dos acidocalcissomos participa de processos como invasão do hospedeiro pelos parasitos e metaciclogênese, corroborando, assim, para a importância do  $\text{Ca}^{2+}$  no ciclo do *T. cruzi* (CALDERANO et al., 2017).

O retículo endoplasmático, assim como em outros eucariotos, funciona como maquinaria de dobramento de proteínas e modificações co/pós transcricionais (CALDERANO et al., 2017). O complexo de Golgi é responsável pela produção de organelas secretoras, as quais liberam componentes pelo compartimento flagelar e aparato lisossomal (CALDERANO et al., 2017). O complexo de Golgi do *T. cruzi* participa do processo de glicosilação de glicoconjugados (CALDERANO et al., 2017; SOUZA e VIDAL, 2017).

## 1.10 CentrinaS

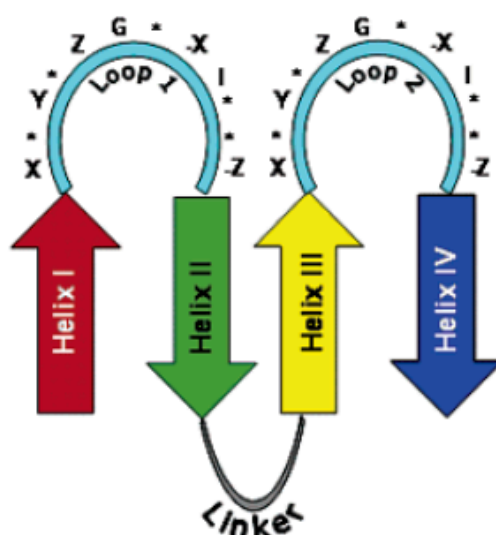
As proteínas centrinas, ou calcitracinas (MADEDDU, 1996), pertencem a superfamília das Calmodulinas, de proteínas ligantes a  $\text{Ca}^{2+}$  (ZHANG e HE, 2012). São proteínas encontradas ubiquamente em eucariotos com cerca de 80-90% de identidade entre vertebrados e 50-70% entre vertebrados e eucariotos inferiores. A identidade e distribuição das Centrinas nos eucariotos evidenciam a indispensabilidade dessas proteínas para o funcionamento celular como um todo (SHIEBEL E BORNENS, 1995). Além disso, elas possuem uma grande diversidade principalmente nas regiões N-terminal e C-terminal que promovem variação quanto às propriedades biofísicas e bioquímicas e diferem nas localizações celulares e funções (SCHIEBEL E BORNENS, 1995; ZHANG e HE, 2012).

Na subfamília das Centrinas encontram-se Calmodulina, Troponina C e Parvabulmina, todas com quatro motivos Hélice-alça-hélice (Figura 6), possivelmente ligantes a Cálcio (SCHIEBEL E BORNENS, 1995). O domínio *EF-Hand*, caracterizado por ligação a metais, possui estrutura básica de dois motivos EF (hélice-alça-hélice). O domínio *EF-Hand* possui afinidade pelo  $\text{Ca}^{2+}$  entre as hélices e uma sequência flexível de ligação entre os motivos (Figura 7) (BABINI *et al.*, 2005). As Centrinas foram descritas em fibras contrácteis dos corpos basais de *Chlamydomonas reinhardtii*, essas proteínas mudam de conformação física ao se ligarem ao  $\text{Ca}^{2+}$ , dessa forma, foram relacionadas à divisão dessas células (SALISBURY, 1995).



**Figura 6. Representação esquemática do motivo *EF-Hand*.** Constituído de hélice-alça-hélice, o local de ligação ao  $\text{Ca}^{2+}$  entre as hélices. (-)X, Y, (-)Z e # são as ligações ao  $\text{Ca}^{2+}$ . w é molécula de água ( $\text{H}_2\text{O}$ ). (BABINI *et al.*, 2005).

A primeira descrição das Centrinas foi feita em células da alga verde *Tetraselmis striata* spp., depois em fungos (*Saccharomyces cerevisiae*), flagelados ameboides (*Paramecium* spp.), e mamíferos (*Homo sapiens*, *Mus musculus*) (SCHIEBEL e BORNENS, 1995; MADEDDU *et al.*, 1996). Em diversos organismos, Centrinas não possuem um número específico de homólogos, por exemplo, um em levedura, quatro em mamíferos, no mínimo dez no protozoário *Tetrahymena* spp. e 48 no *Paramecium* spp. (GONGENDEAU *et al.*, 2008). Em tripanossomatídeos, como *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*, foram descritas cinco Centrinas relacionadas a divisão celular desses parasitos (SELVAPANDIYAN *et al.*, 2012).



**Figura 7. Representação esquemática do domínio EF-Hand.** Um domínio EF-Hand é constituído por dois motivos EF. Hélices I e II são um motivo e Hélices III e IV, outro. Setas representam  $\alpha$ -hélices e linhas, partes não estruturadas da cadeia peptídica. X, Y e Z são as possíveis ligações ao  $\text{Ca}^{2+}$ . G é aminoácido Glicina e I, Isoleucina. (BABINI *et al.*, 2005).

As Centrinas são uma das mais antigas proteínas com funções relacionadas à conexão dos microtúbulos e estruturas ligadas à membrana, garantindo a forma celular (DEVOS *et al.*, 2014). Existem evidências de associação entre a formação do complexo nuclear, que forma os microtúbulos, e a maquinaria de divisão celular (DEVOS *et al.*, 2014). Essas proteínas são associadas aos centros organizadores de microtúbulos (MTOCs) em organismos não ciliados; em corpos basais de organismos flagelados e corpo polar do fuso em leveduras (SALISBURY, 1995). As Centrinas relacionam-se também aos filamentos contráteis que se

ligam a essas diferentes organelas; dessa forma, são proteínas envolvidas na duplicação e segregação do centrossomo e corpos basais, que são aparatos importantes para a divisão celular (SELVAPANDIYAN *et al.*, 2007).

A proteína centrina de *Chlamydomonas reinhardtii* foi a primeira proteína centrossomal molecularmente caracterizada e também está relacionada a fibras contráteis do núcleo e do corpo basal (WRIGHT *et al.*, 1985). Em fungos como *S. cerevisiae*, a proteína centrina codificada pelo gene CDC31 foi estabelecida como essencial para esse organismo; ela é relacionada à duplicação dos corpos basais e do corpo polar do fuso, uma rede de filamentos que organiza o citoesqueleto durante a divisão celular (SHIEBEL E BORNENS, 1995).

Em humanos, foram identificadas três proteínas Centrininas com diferentes funções celulares, relacionadas principalmente à posição relativa ao centríolo e associada ao centrossomo durante todo o ciclo celular (SHIEBEL E BORNENS, 1995). Em células HeLa, a expressão reduzida da centrina2 acarretou a diminuição do conteúdo centriolar e, 72 horas após a intervenção, 70% das células não possuíam nenhum centríolo. Este experimento deu fundamentos para relacionar a centrina à maquinaria de duplicação, durante a divisão celular. Com isso, outras consequências aconteceram para a célula, como defeitos posteriores na mitose e citocinese que causaram morte celular (RICE E AGARD, 2002).

### **1.11 Centrinas EM TRYPANOSOMATIDAE**

Em tripanossomatídeos existem cinco genes prováveis para Centrininas (HE *et al.*, 2005; SELVAPADIYAN *et al.*, 2012) que possuem várias diferenças quanto à localização e atividade. A homologia das cinco Centrininas entre os tripanossomatídeos é baixa (35-45%); além disso, essas proteínas possuem similaridades entre seus homólogos de outros organismos eucariotos. A sequência amino-terminal das Centrininas é a região com maior número de diversificação, o que pode evidenciar as diferenças funcionais existentes entre essas proteínas (SELVAPADIYAN *et al.*, 2007).

Outros cinetoplastídeos foram analisados quanto às consequências da deleção de Centrininas. Selvapadiyan, em 2004, analisou a deleção dos dois alelos da LdCEN1 em amastigotas (intracelular) de *Leishmania donovani*. Isso resultou no bloqueio da progressão

do ciclo celular e da infecção, causou mudanças morfológicas como células com múltiplos núcleos e cinetoplastos. Além disso, a LdCEN1 foi relacionada à duplicação do corpo basal. Em *Trypanosoma brucei*, a TbCEN1 é localizada no corpo basal (HE *et al.*, 2005) e quando reprimida, impede a citocinese e divisão do cinetoplasto e corpos basais .

TbCEN2 foi citolocalizada no complexo de Golgi em uma estrutura bilobular (HE *et al.*, 2005). Quando reprimida, impede a citocinese e divisão do cinetoplasto; além disso, a duplicação do Golgi foi reprimida quando a TbCEN2 estava deletada (HE *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2012). Outras estruturas como FAZ, local de ligação com o flagelo e membrana citoplasmática, também são inibidas quando há o silenciamento de TbCEN2, provavelmente pela localização da proteína que é adjacente à zona FAZ (ZHOU *et al.*, 2010).

A TbCEN3 foi citolocalizada no flagelo, e quando deletada causou retardo na mobilidade dos parasitos; então, eles percorreram distâncias menores. A ausência de movimento dos parasitos foi relacionada ao insucesso das ligações ao  $Ca^{2+}$ , que são necessárias para a motilidade dos flagelos (WEI *et al.*, 2014)

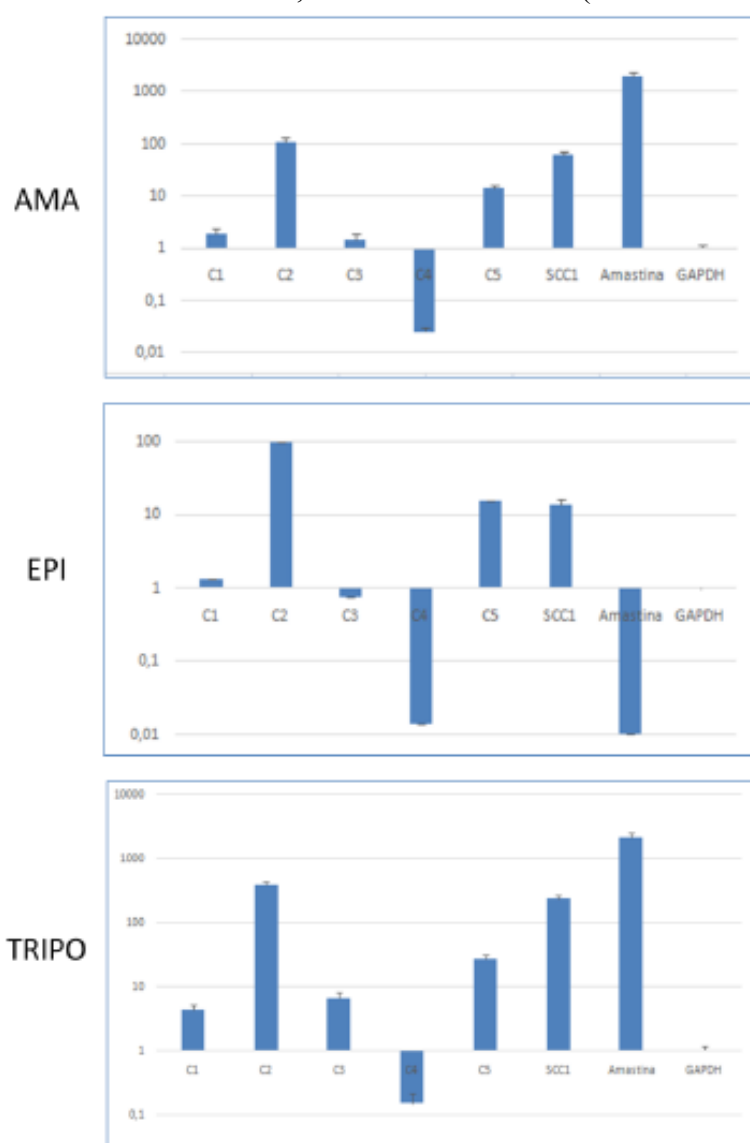
TbCEN4 não é reconhecida pelo anticorpo monoclonal 20H5 de *C. reinhardtii*; possui três domínios *EF-Hand*, e está localizada ao redor dos corpos basais (SELVAPADIYAN *et al.*, 2007). Ao ser deletada, causou retardo na progressão do ciclo celular e células com múltiplos ou nenhum núcleo, porém com todas as outras organelas divididas normalmente (SHI *et al.*, 2008, WANG *et al.*, 2012). Ao se multiplicarem, perdem a forma e o flagelo. Em sua morfologia, essas células ficam aumentadas e sem forma definida (pleomórficas) (SELVAPADIYAN *et al.*, 2007).

### 1.11.1 CENTRINA5

A centrina5 (CEN5) foi identificada em tripanossomatídeos e não foi descrita em nenhum outro grupo de organismos. A TbCEN5 também não é reconhecida pelo anticorpo monoclonal 20H5, como outras centrinas de tripanossomatídeos (HE *et al.*, 2005). Souza (2016) analisou os níveis de expressão de mRNA para as cinco Centrinas de *Trypanosoma cruzi* (TcCENs) e Subunidade SCC1 da Coesina (SCC1) nas diferentes formas do parasito (Figura 8). A Subunidade SCC1 é relacionada à citocinese e segregação de cromossomos e a sua deleção causa falhas na divisão celular (GLUENZ *et al.*, 2008). Em comparação às outras

Centrinas, a TcCEN2 e TcCEN5 tiveram um padrão de expressão de mRNA semelhante a SCC1, que é ativa em toda citocinese. Isso levantou a hipótese de que a TcCEN5 pode relacionar-se à cariocinese, já que apresentou níveis altos de expressão de mRNA (SOUZA, 2016).

A filogenia de TbcEN5 relacionou-a evolutivamente à TbcEN2 e previu um peso molecular de 20kDa. A citolocalização por fluorescência evidenciou sua localização no flagelo e distribuição no núcleo, obedecendo um padrão durante a citocinese. No decorrer do ciclo celular, a distribuição foi mais concentrada no núcleo. Além disso, suspeita-se da interação entre TbcEN5 e TbcEN1, TbcEN3 e TbcEN4 (SHAN *et al.*, 2019).



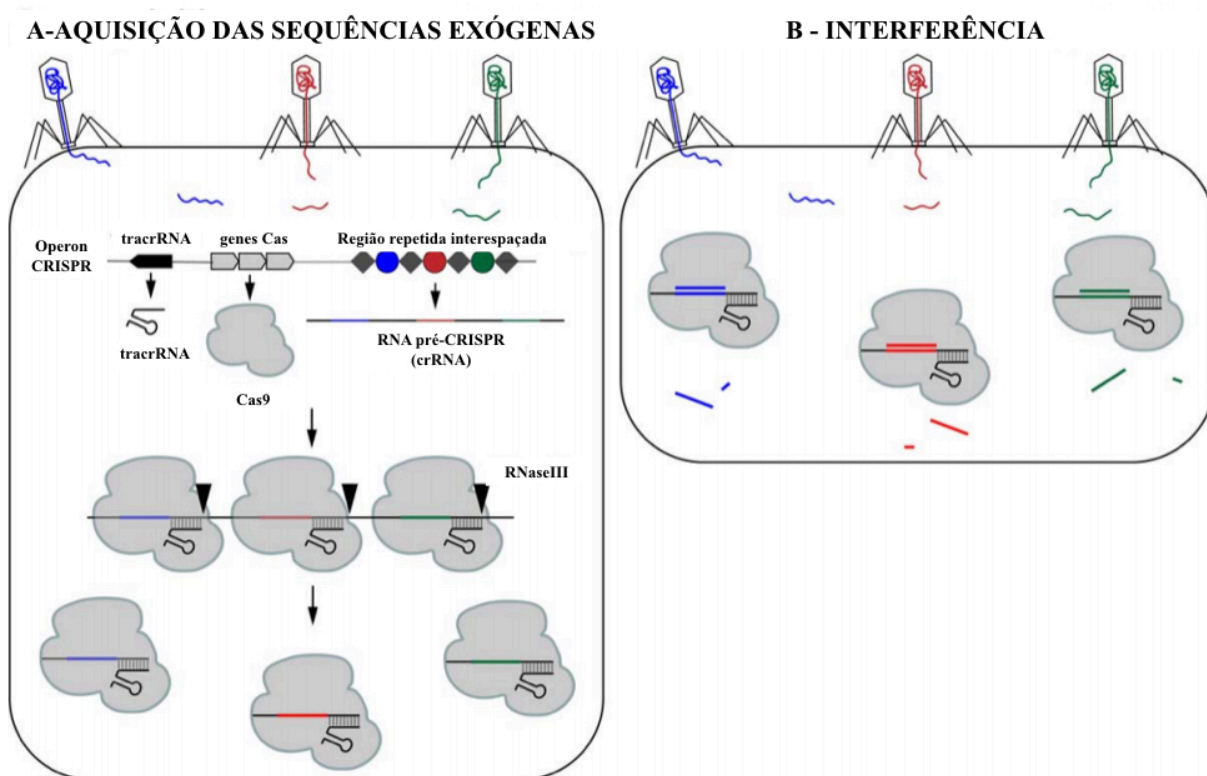
**Figura 8. Expressão relativa de mRNA nas três formas de vida do *T. cruzi* em relação a expressão do gene de manutenção *GAPDH*. AMA - amastigota, EPI - epimastigota e TRIPO - tripomastigota. C1, C2, C3, C4, C5 são TcCEN1, TcCEN2, TcCEN3, TcCEN4, TcCEN5 respectivamente; SCC1 é a Subunidade 1 da Coesina; *Amastina* é gene endógeno e controle juntamente com gene de manutenção *GAPDH*. (SOUZA, 2016).**

### 1.12 SILENCIAMENTO DA TcCEN5 COM CRISPR/Cas9

A maquinaria de CRISPR-Cas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat* e *CRISPR-associated proteins*) foi descoberta como mecanismo de imunidade de bactérias e archaeas e pode ser utilizada na engenharia genética de outros organismos (KOONIN e MARAKOVA, 2009). CRISPR-Cas9 funciona como uma memória imunológica que induz a clivagem de um ácido nucleico exógeno. No genoma bacteriano há operon com grupos de nucleotídeos repetidos palindrômicos inter espaçados por pequenas sequências adquiridas a partir de ácidos nucleicos externos provenientes de uma infecção por bacteriófagos (HORVATH e BARRANGOU, 2010). O sistema CRISPR-Cas9, encontrado em *Streptococcus pyogenes*, é uma nuclease do tipo II, que utiliza um RNA guia (sgRNA) como forma de induzir uma quebra na dupla fita de DNA ao reconhecer a sequência exógena previamente incorporada (Figura 9) (HELER *et al.*, 2015). CRISPR-Cas9 é composta por um RNA guia (sgRNA) e endonuclease Cas9 (CUI *et al.*, 2018). O sgRNA é formado pela fusão de RNA CRISPR (crRNA) e crRNA transativado (tracrRNA) (CUI *et al.*, 2018). O crRNA é obtido pela transcrição do *spacer*, que consiste em aproximadamente 20 nucleotídeos, complementares à sequência-alvo proveniente de bacteriófagos invasores (HELER *et al.*, 2015). O tracrRNA é uma sequência constante que se liga à Cas9 ao adquirir uma estrutura secundária (CUI *et al.*, 2018). Para que CRISPR-Cas9 seja ativada é necessária uma sequência de reconhecimento chamada PAM (*protospacer adjacent motif*), constituída de nucleotídeos 5' NGG 3' adjacente aos nucleotídeos alvo (Figura 10) (HELER *et al.*, 2015).

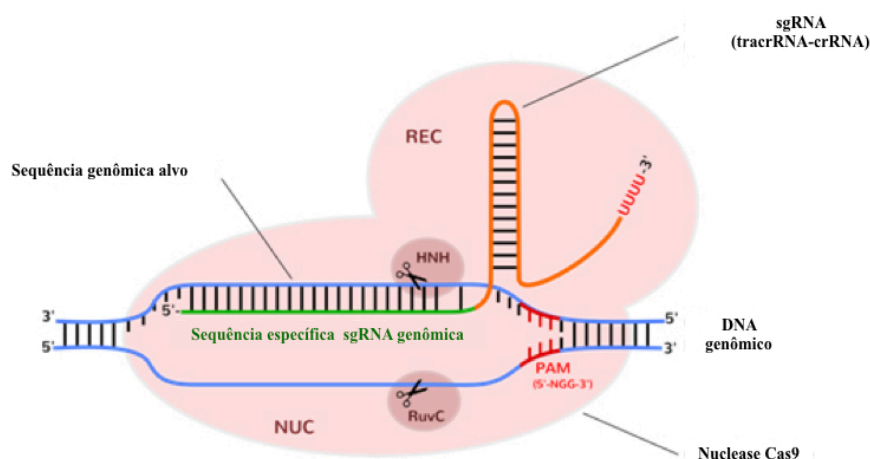
Como o *Trypanosoma cruzi* não possui o mecanismo de RNA interferente (RNAi), e com o objetivo de investigar a função da TcCEN5, foi então empregada a técnica de edição gênica por CRISPR-Cas9 para efetuar o silenciamento do gene devido sua eficácia comprovada em *T. cruzi* (PENG *et al.*, 2015). Essa técnica consiste na utilização de um oligonucleotídeo de RNA (RNAguia - sgRNA) para um alvo específico que, ao hibridizar com o DNA genômico, induz a modificação conformacional da endonuclease Cas9 e causa uma clivagem da dupla fita (*double-stranded break* - DSB) do DNA em um local específico. A partir daí, a maquinaria celular é responsável por reparar a quebra da dupla fita; nesse organismo, em específico, os reparos acontecem por micro homologia das junções de quebra (*microhomology-mediated end joining* - MMEJ) (Figura 11). A sequência está propensa a

erros ao ser reparada na ausência de uma sequência de homologia, possibilitando deleções de nucleotídeos do gene. Outra forma de reparo da dupla quebra do DNA é a utilização de uma sequência de nucleotídeos homólogos ao local da modificação; um cassete da região pode ser utilizado para induzir um reparo guiado. Essa estratégia foi utilizada para inserir sequências específicas na região da quebra e causar uma modificação guiada, como a inserção de cólons de parada precoce (PENG *et al.*, 2015).

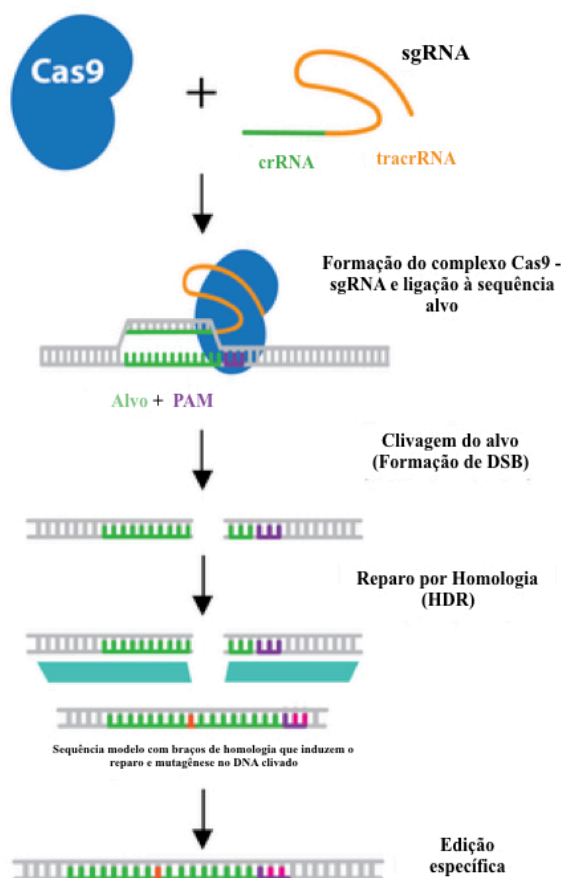


**Figura 9. Visão geral do mecanismo de aquisição de sequências e interferência do sistema CRISPR/Cas9.** (A) Mecanismo de aquisição de sequências exógenas por CRISPR/Cas9. Ácidos nucleicos invasores são clivados e incorporados ao genoma bacteriano, como *spacers* (blocos coloridos), entre regiões repetitivas (losângulos cinza). Depois da transcrição, o crRNA é clivado pela RNAseIII formando associações com proteínas Cas9. (B) Mecanismo de interferência de CRISPR/Cas9. No momento de uma nova infecção, as sequências sgRNA na Cas9 são responsáveis por reconhecer o material genético exógeno e clivar, de forma que a infecção não prosseguirá (THURTLÉ-SCHMIDT e LO, 2018; adaptado).





**Figura 10. Diagrama da endonuclease Cas9 com sgRNA pareado à sequência exógena e induzindo a clivagem das duas fitas do DNA.** A sequência sgRNA consiste em cerca de 20 nt ligado a um tracrRNA que ativa a Cas9. O pareamento na sequência alvo do DNA exógeno acontece pela formação de um pareamento complementar do sgRNA à sequência alvo, que é aberta. O domínio de reconhecimento (REC) interage com o sgRNA e o domínio nuclear (NUC) contém os domínios de nucleases e interage com PAM e DNA alvo. A três nucleotídeos da sequência PAM os domínios nucleases (RuvC e HNH) de Cas9 clivam cada um o DNA invasor (CONG *et al.*, 2013) (<https://www.ozbiosciences.com/content/58-transfection-reagents-for-genome-editing>; adaptado).



**Figura 11. Mecanismo de ação e indução de reparo por homologia direta (HDR).** Cas9 se liga ao sgRNA que reconhece a sequência alvo causando clivagem nas duas fitas de DNA alvo. Uma sequência com homologia adjacente ao sítio de clivagem é inserida no sistema. O mecanismo biológico de reparo utiliza a sequência homóloga para reparar o DNA danificado. Na sequência de homologia pode-se inserir diferentes mutações (<http://www.addgene.org/guides/crispr/>; com adaptações).

## 2 JUSTIFICATIVA

O *Trypanosoma cruzi* é responsável por causar a doença de Chagas em cerca de 8 milhões de pessoas e, anualmente, propicia o óbito de 10 mil dessas pessoas, que vivem principalmente em situação de pobreza, mas não exclusivamente (OMS, 2017). Esses pacientes, em geral, não sabem que estão infectados até que sintomas crônicos comecem a se agravar e tornem-se um fardo debilitante com alta taxa de morbidade (CHATELAIN, 2015).

Mesmo com a interrupção da transmissão vetorial com *T. infestans*, foram reportados novos casos com transmissão vetorial bem como surtos de casos agudos relacionados à transmissão oral (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Outras formas de transmissão, como por transfusão sanguínea, transplante de órgãos e congênita, podem ocorrer em locais não endêmicos (CHATELAIN, 2015). Essas formas de transmissão são responsáveis por expandir a contaminação com *T. cruzi* juntamente com a globalização e o aumento do fluxo migratório tanto para países não endêmicos, como pelo êxodo rural (COURA e VINAS, 2014).

Os tratamentos oferecidos contra o parasito estão defasados e possuem muitos efeitos colaterais. As maiores taxas de cura são obtidas apenas durante a fase aguda da doença (MOLINA *et al.*, 2015). Em adição a isso, os países e a indústria farmacêutica negligenciam a necessidade dessas pessoas limitando a quantidade de recursos destinados à pesquisas. Dessa forma, não só o tratamento é afetado, como também as formas de controle da transmissão e o estudo da biologia do agente etiológico (PEDRIQUE, 2013).

O *Trypanosoma cruzi* é um organismo com ciclo biológico complexo, que passa por mudanças morfológicas e fisiológicas (CALDERANO *et al.*, 2017). Os mecanismos celulares, moleculares e organização genômica não foram completamente descritos; pois possuem características únicas que ainda não foram estudadas o suficiente (FREILIJ, 2019), principalmente, devido ao fator de ser uma doença negligenciada.

As proteínas Centrininas são ubíquas em organismos eucariotos. Essas proteínas foram encontradas em quantidades diferenciadas em cada organismo e a sua função relacionada principalmente a divisão de organelas (GONGENDEAU *et al.*, 2007). Apesar disso, elas não foram propriamente estudadas e suas funções não estão completamente esclarecidas no *T. cruzi*.

Nos tripanossomatídeos foram encontradas cinco Centrinas, que possuem uma baixa homologia entre si. Em *Trypanosoma brucei* as cinco Centrinas foram caracterizadas, TbCEN1, TbCEN2 e TbCEN4 foram relacionadas a divisão celular e de organelas essenciais como núcleo, Complexo de Golgi e cinetoplasto (HE *et al.*, 2005; SHI *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2012); enquanto a TbCEN3 e TbCEN5 foram associadas ao flagelo; sendo, a TbCEN3 com funções relativas a divisão dessa estrutura e à mobilidade do parasito (WEI *et al.*, 2014; SHAN *et al.*, 2019).

A centrina5 foi encontrada apenas em tripanossomatídeos, o que a torna uma proteína única na qual o estudo tem extrema importância (HE *et al.*, 2005). O estudo de uma proteína ainda não caracterizada e inédita permite a busca por novos alvos terapêuticos para a doença de Chagas. Além disso, pode conduzir a possíveis evidências quanto à filogenia do parasito em relação à evolução dos eucariotos. O estudo da centrina5 de *Trypanosoma cruzi* é relevante pois acrescenta conhecimento novo a um organismo causador de uma doença tropical mórbida e negligenciada.

### **3 OBJETIVO**

#### **3.1 Objetivo Geral**

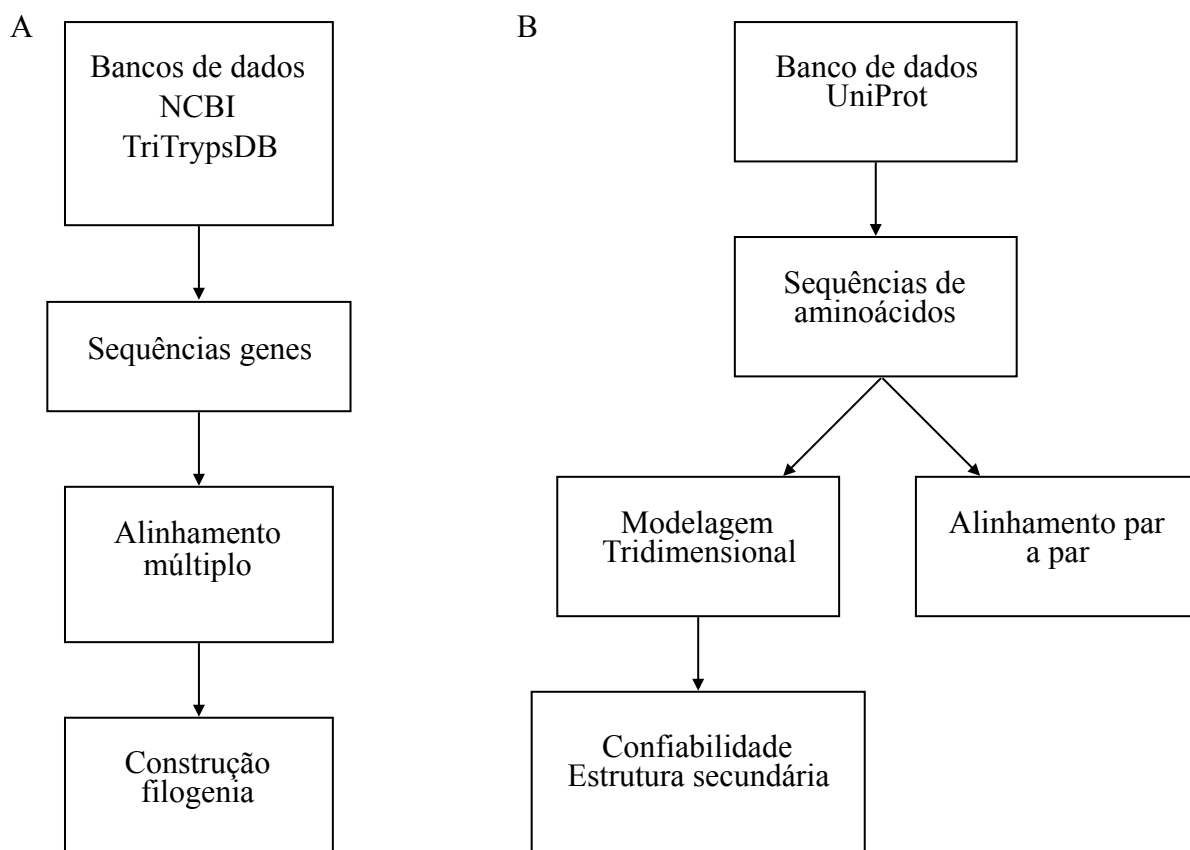
Estudar a proteína centrina5 de *Trypanosoma cruzi* quanto à filogenia, estrutura e função

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Estudar a proteína TeCEN5 *in silico*
- Analisar a função da centrina5 de *Trypanosoma cruzi*, por meio do silenciamento com CRISPR/Cas9.

#### 4 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

Para a caracterização da proteína TcCEN5 duas estratégias experimentais foram definidas. A primeira (Figura 12) tem como principal objetivo a caracterização *in silico* e análise filogenética da TcCEN5. A segunda estratégia (Figura 13) tem como objetivo principal a análise funcional da proteína e análise do parasito na ausência da proteína TcCEN5.



**Figura 12. Estratégia experimental para análise *in silico* de TcCEN5.** (A) Estratégia para análise de genes. (B) Estratégia para análise proteica e modelagem tridimensional.

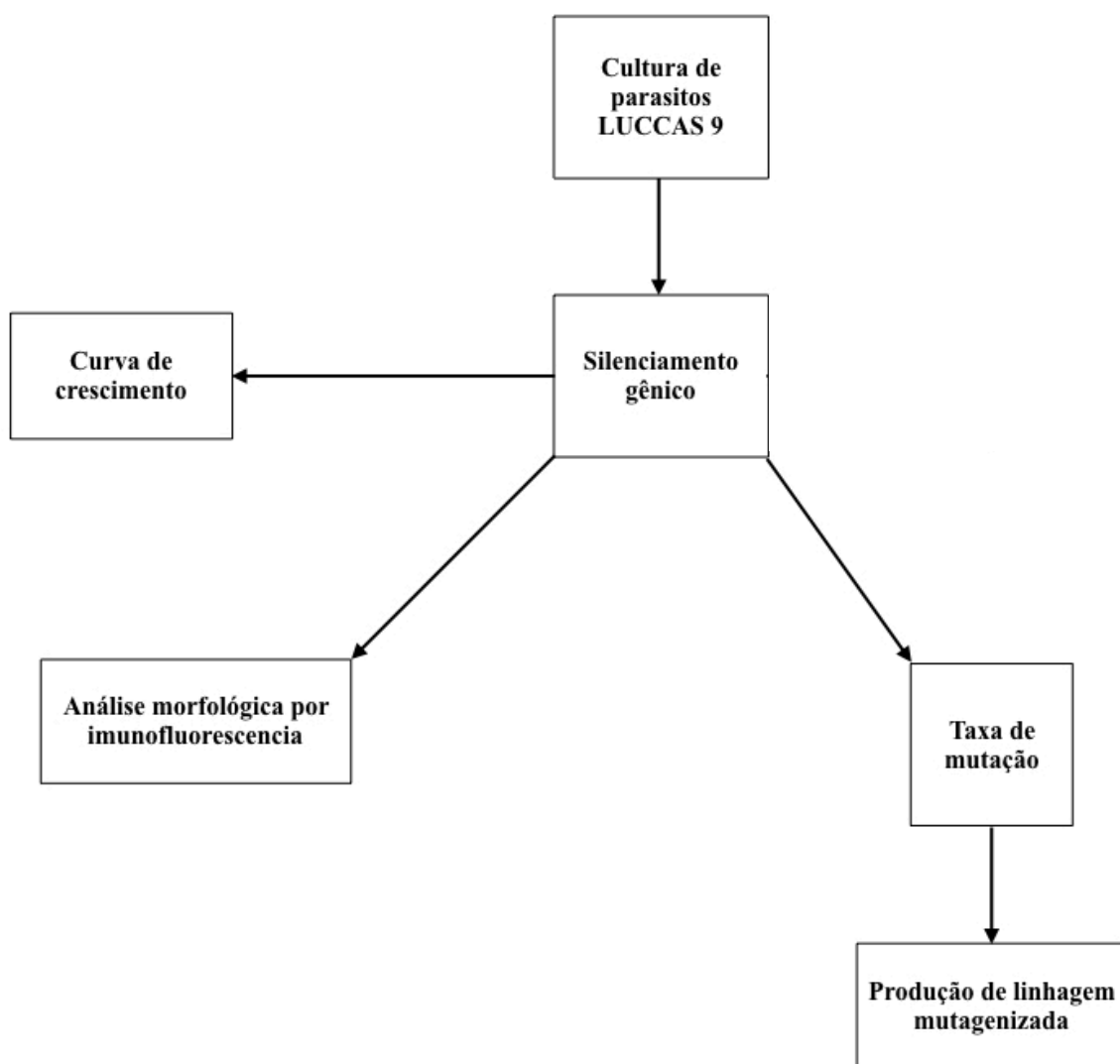


Figura 13. Estratégia experimental para análise da função de TcCEN5.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 MATERIAIS

#### 5.1.1 Soluções e Tampões

##### **Salina Tamponada com Fosfato (PBS) (1X)**

NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM; o pH foi ajustado para 7,2 e a esterilização feita em autoclave por 20 min a 121°C.

##### ***Terrific Broth (TB) para células competentes***

Pipes ou Hepes 10 mM; CaCl<sub>2</sub> 15 mM; KCl 250 mM; o pH foi ajustado para 6,7 com KOH, MnCl<sub>2</sub> 55 mM e depois o tampão foi esterilizado em filtro 0,45 µm pré-umedecido e estocado a 4°C.

##### **Tampão de eletroporação para *Trypanosoma cruzi***

KCl 120 mM; CaCl<sub>2</sub> 0,15 mM; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM; Hepes 25 mM; EDTA 2 mM; MgCl<sub>2</sub> 5 mM pH ajustado para 7,6 e esterilizado em autoclave por 20 min a 121°C (DAROCHA *et al.*, 2004).

##### **Solução para extração de DNA plasmidial**

###### **Solução I**

Glicose 50 mM; Tris-Cl 25mM pH 8,0; EDTA 10 mM pH 8,0; a esterilização feita em autoclave por 20 min a 121°C.

###### **Solução II**

NaOH 0.2N; SDS 1%; a solução foi preparada no momento do uso em temperatura ambiente.

###### **Solução III**

Acetato de Potássio 3 M; Ácido acético 5M.

## **Soluções para eletroforese e gel de agarose**

### **Tampão TBE (0,5X)**

Tris-borato 45 mM; EDTA 2mM.

### **Tampão de Amostra (1X)**

TBE 10X; Glicerol 50%; Azul de Bromofenol 0,01%; Xileno Cianol 0,01%.

### **Brometo de Etídeo (BrEt)**

Solução estoque de 10 mg/mL em água destilada. Solução de uso 0,5 µg/mL.

## **5.1.2 Meios de cultura para bactérias**

Todos os meios foram esterilizados em autoclave, por 20 min, a 121°C.

### **2YT**

Triptona 1,6%; Extrato de levedura 1,0%; NaCl 0,5%; O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH.

### **Luria-Bertani (LB) ágar**

Triptona 1,0%; Extrato de levedura 0,5%; NaCl 1,0%; O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH; 1,5% agarose.

### **SOB**

Triptona 2,0%; Extrato de levedura 0,5%; NaCl 0,05%; KCl 2,5 mM; O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH, antes do uso foi adicionado MgCl<sub>2</sub> 2 M.

### **SOC**

Idêntico ao meio SOB, com a adição de glicose 20 mM também estéril.

## **5.1.3 Meio de cultura para *Trypanosoma cruzi***

*Liver Infusion Triptose* (LIT): Infuso de fígado 0,5%; NaCl 0,4%; KCl 0,4%; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,8%; Glicose 0,2%; Triptose 0,5%. O extrato de fígado foi adicionado a água destilada e aquecido, sob agitação, por 1 hora e depois filtrado com papel Whatman® número



1. O pH foi ajustado com HCl para 7,2. O meio foi esterilizado por filtração com filtro Milipore (Merck) 0,22  $\mu\text{m}$ . No momento do uso, o meio foi suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) 10%, Hemina (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e antibióticos: Ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), Estreptomicina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e Canamicina (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Para linhagens celulares LUCCAS9 foi adicionado Puromicina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

#### **5.1.4 Soluções para imunofluorescência**

##### **TB para imunofluorescência**

Triton X-100 0,1%; SFB 0,1% diluído em PBS.

##### **Mounting**

Glicerol 50%; DABCO 2,5%; DAPI 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em PBS.

#### **5.1.5 Linhagens celulares**

As linhagens utilizadas foram *Trypanosoma cruzi* CL Brener, parasitos modificados de *Trypanosoma cruzi* CL Brener LUCCAS9.

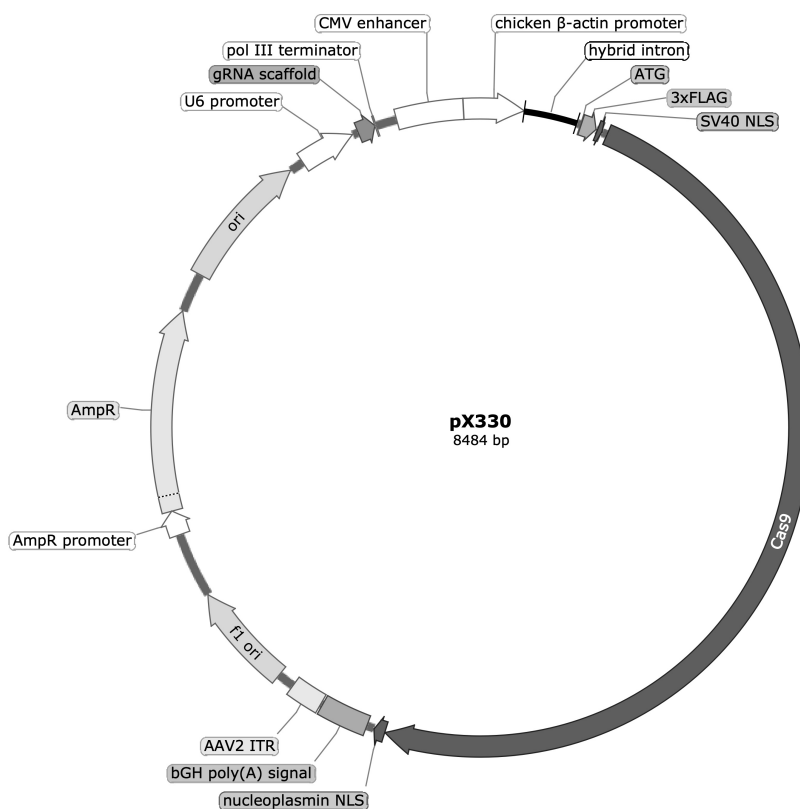
A linhagem LUCCAS9 foi cedida pela prof. Izabela Marques Dourado Bastos, Laboratório Interação Parasita-Hospedeiro, Departamento de Biologia celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília. Esta consiste em parasitos que expressam as proteínas Luciferase e a endonuclease Cas9 constitutivamente, foram utilizadas para os experimentos de silenciamento gênico.

Células bacterianas de *Escherichia coli* da linhagem DH5 $\alpha$  (Invitrogen). Utilizadas para procedimentos de clonagem.

#### **5.1.6 Plasmídeo**

O plasmídeo pX330 (Figura 14) (CONG *et al.*, 2013) foi utilizado para incorporação da sequência *scaffold* ao RNA guia do sistema CRISPR/Cas9. Essa sequência é necessária para a estrutura terciária do RNA que se liga à Cas9, por isso é uma parte essencial o

funcionamento e estabilidade do sgRNA, principalmente durante a atividade *in vitro* (NISHIMASU *et al.*, 2014).



**Figura 14. Mapa físico do plasmídeo pX330.** O vetor possui 8484 pb, resistência a Ampicilina, sequência para tracrRNA (gRNA scaffold) e gene para Cas9 (CONG *et al.*, 2013). SnapGene Viewer versão 5.0.7.

## 5.2 MÉTODOS

### 5.2.1. Análises *in silico*

#### 5.2.1.1 Bancos de Dados

Com o objetivo de reunir e ordenar as sequências de nucleotídeos e aminoácidos referentes às Centrininas, foram utilizados os bancos de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para sequências genômicas de Cinetoplastídeos (TriTrypDB) (<https://tritrypdb.org/tritrypdb/> - Release 46, 6 Nov 2019) e de proteínas (UniProt) (<https://www.uniprot.org/>). Os genes escolhidos e seus respectivos números de acesso estão descritos na Tabela 3.

**Tabela 3. Números de acesso aos bancos de dados das sequências utilizadas para análises *in silico* das Centrininas.**

Organismo/ Cepa	Nome	NCBI Acession	TriTryp Acession	UniProt Acession	Referência
<i>Homo sapiens</i>	HsCEN1	NP_004057.1		Q12798	ERRABOLU <i>et al.</i> , 1994
<i>Homo sapiens</i>	HsCEN2	NP_004335.1		P41208	LEE e HUANG, 1993
<i>Homo sapiens</i>	HsCEN3.1	NP_001284694.1		E5RJF8	WIECH <i>et al.</i> , 1996
<i>Homo sapiens</i>	HsCEN3.2	NP_004356.2		O15182	WIECH <i>et al.</i> , 1996
<i>Homo sapiens</i>	HsCEN3.3	NP_001284697.1		O15182	WIECH <i>et al.</i> , 1996
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C	ScCDC31	NP_014900.3		P06704	GOFFEAU <i>et al.</i> , 1996
<i>Trypanosoma cruzi</i> CL Brener	TcCEN1	XP_821799.1	Tc00.1047053 506559.380	Q4E591	El-Sayed <i>et al.</i> , 2005
<i>Trypanosoma cruzi</i> CL Brener	TcCEN2	XP_821263.1	TcCLB. 506401.90	Q4E3T4	El-Sayed <i>et al.</i> , 2005

<i>Trypanosoma cruzi</i> CL Brener	TcCEN3	XP_806482.1	TcCLB. 503797.20	Q4CWI2	El-Sayed <i>et al.</i> , 2005
<i>Trypanosoma cruzi</i> CL Brener	TcCEN4	XP_813165.1	TcCLB. 508323.60	Q4DQ49	El-Sayed <i>et al.</i> , 2005
<i>Trypanosoma cruzi</i> CL Brener	TcCEN5	XP_811662.1	TcCLB. 509161.40	Q4DBB8	El-Sayed <i>et al.</i> , 2005
<i>Trypanosoma brucei</i> TREU927	TbCEN1	XP_844376.1	Tb927.4.2260	Q584G1	El-Sayed <i>et al.</i> , 2005
<i>Trypanosoma brucei</i> TREU927	TbCEN2	XP_846945.1	Tb927.8.1080	Q57VP6	El-Sayed <i>et al.</i> , 2005
<i>Trypanosoma brucei</i> TREU927	TbCEN3	XP_823096.1	Tb927.10.8710	Q38AA2	El-Sayed <i>et al.</i> , 2005
<i>Trypanosoma brucei</i> TREU927	TbCEN4	XP_845964.1	Tb927.7.3410	Q57WF6	El-Sayed <i>et al.</i> , 2005
<i>Trypanosoma brucei</i> TREU927	TbCEN5	XP_829446.1	Tb927.11.1390 0	Q382E7	El-Sayed <i>et al.</i> , 2005
<i>Trypanosoma grayi</i>	TgCEN1	XP_009309420.1	DQ04_017810 20		KELLY <i>et al.</i> , 2014
<i>Trypanosoma grayi</i>	TgCEN2	XP_009309580.1	DQ04_019110 40		KELLY <i>et al.</i> , 2014
<i>Trypanosoma grayi</i>	TgCEN3	XP_009307106.1	DQ04_003512 10		KELLY <i>et al.</i> , 2014
<i>Trypanosoma grayi</i>	TgCEN4	XP_009310513.1	DQ04_028110 20		KELLY <i>et al.</i> , 2014
<i>Trypanosoma grayi</i>	TgCEN5	XP_009307021.1	DQ04_003211 50		KELLY <i>et al.</i> , 2014
<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/ M2904	LbCEN1	XP_001564470.1	LbrM.20.1890	A4HAV0	PEACOCK <i>et al.</i> , 2007

<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/ M2904	LbCEN2	XP_001562574.1	LbrM.07.0780	A4H522	PEACOCK <i>et al.</i> , 2007
<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/ M2904	LbCEN3	XP_001569255.1	LbrM.35.6420	A4HQD0	PEACOCK <i>et al.</i> , 2007
<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/ M2904	LbCEN4	XP_001565047.1	LbrM.22.1290	A4HCI2	PEACOCK <i>et al.</i> , 2007
<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/ M2904	LbCEN5	XP_001567431.1	LbrM.32.0740	A4HK46	PEACOCK <i>et al.</i> , 2007
<i>Leishmania major</i> Friedlin	LmCEN1	XP_001686337.1	LmjF34.2390	Q4Q2W1	IVENS <i>et al.</i> , 2005
<i>Leishmania major</i> Friedlin	LmCEN2	XP_001680978.1	LmjF.07.0710	Q4QIM0	IVENS <i>et al.</i> , 2005
<i>Leishmania major</i> Friedlin	LmCEN3	XP_001687199.1	LmjF36.6110	Q4Q0E9	IVENS <i>et al.</i> , 2005
<i>Leishmania major</i> Friedlin	LmCEN4	XP_001683292.1	LmjF22.1410	Q4QBK6	IVENS <i>et al.</i> , 2005
<i>Leishmania major</i> Friedlin	LmCEN5	XP_001685381.1	LmjF.32.0660	Q4Q5L7	IVENS <i>et al.</i> , 2005
<i>Phytomonas serpens</i> Hart1	PsCEN1	CCW66545.1		W6KW10	PORCEL <i>et al.</i> , 2014
<i>Phytomonas serpens</i> Hart1	PsCEN2	CCW71655.1		W6LB17	PORCEL <i>et al.</i> , 2014
<i>Phytomonas serpens</i> Hart1	PsCEN3	CCW70028.1		W6L9C8	PORCEL <i>et al.</i> , 2014
<i>Phytomonas serpens</i> Hart1	PsCEN4	CCW66328.1		W6KZ12	PORCEL <i>et al.</i> , 2014

---

<i>Phytomonas</i>				
<i>serpens</i>	PsCEN5	CCW70565.1	W6L7R4	PORCEL <i>et al.</i> , 2014
Hart1				

---

### 5.2.1.2 Alinhamentos e construção filogenética

O alinhamento par a par foi feito com BLASTP versão 2.2.28+. Para a construção de alinhamentos e filogenias, foi utilizado o programa MegaX versão 10.1 (KUMAR *et al.*, 2018). Para construir os alinhamentos múltiplos foi utilizado o programa ClustalW com alinhamento progressivo, no qual sequências similares são alinhadas primeiro e utilizadas como base para alinhamentos subsequentes.

### 5.2.1.3 Modelagem da centrina5

Com intuito de prever os domínios da TcCEN5, a sequência de aminoácidos foi inserida no Pfam (versão 32.0) com *e-value* de até 1.0, que representa a casualidade da predição (EL-GEBALI *et al.*, 2019). Para previsão da estrutura secundária de TcCEN5 foi utilizado o programa JPRED 4 (versão v.2.3.1) (DROZDETSKIY *et al.*, 2015). Esse programa calcula a estrutura secundária da proteína com base no banco de dados PDB. Para obter as imagens com a predição da estrutura terciária, a sequência de aminoácidos de TcCEN5 foi inserida e analisada no banco de dados do *Swiss-model* (WATERHOUSE *et al.*, 2018).

### 5.2.2 Reação em Cadeia da DNA Polimerase (PCR)

Os oligonucleotídeos foram sintetizados a partir da sequência do gene TcCEN5 no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), número de referência XM\_806569.1 (EL-SAYED *et al.*, 2005).

As reações de amplificação foram feitas com tampão PCR 10X, dNTPs a 10 mM para cada, MgCl<sub>2</sub> 50,0 mM; 10,0 pmol de cada primer, 5 U/ μL de Platinum® TaqDNA polimerase

(Invitrogen), 10,0 ng/  $\mu\text{L}$  de DNA genômico de *Trypanosoma cruzi* e volume final de 30  $\mu\text{L}$ . Os ciclos parâmetros utilizados estão discriminados na Tabela 4.

**Tabela 4. Parâmetros utilizados para Reação em Cadeia da DNA Polimerase (PCR).**

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>n° Ciclos</b>
Desnaturação inicial	94°C	1 minuto	1 X
Desnaturação	94°C	30 segundos	
Anelamento	58° a 65°C	30 segundos	35 X
Extensão	72°C	30 segundos/ 500 pb	
Extensão final	72°C	1 minuto	1 X
<i>Hold</i>	4°C	$\infty$	

### 5.2.3 Preparo de Células Competentes

Para produção de células capazes de incorporar ácidos nucleicos exógenos foi utilizado o método adaptado de Inoue *et al.* (1990). Células *E. coli* DH5 $\alpha$  foram cultivadas *overnight* em uma placa de LB ágar a 37°C. Quatro a seis colônias de 2-3 mm de diâmetro foram inoculadas em 5,0 mL de meio SOB e crescidas *overnight* sob agitação (250 rpm) a 37°C. No dia seguinte, 3,0 mL da cultura foram inoculados em 150,0 mL de meio SOB e crescida sob agitação (250 rpm), a 18°C até a O.D.<sub>600</sub> = 0,6. O frasco foi incubado, em gelo, por 10 min e depois centrifugado a 2500 xg por 10 min, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuscitado em 48,0 mL de tampão TB gelado. Foi incubado no gelo por 10 min e depois centrifugado a 2500 xg por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuscitado em 12,0 mL de tampão TB. DMSO foi adicionado à concentração final de 7%. Aliquotas de 200  $\mu\text{L}$  foram separadas em gelo e depois essas células foram estocadas em -80°C.

### 5.2.4 Transformação celular por choque térmico

Em 200  $\mu\text{L}$  de *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes foram adicionados 1-10  $\mu\text{g}$  do produto de plasmídeo e incubadas em gelo por 30 min. O choque térmico foi feito ao incubar a amostra em banho maria 42°C por 30 seg e rapidamente transferida para o gelo de 1 a 2 min. 800  $\mu\text{L}$  de meio SOC foram adicionados e depois incubada a 37°C por 1 hora. 100  $\mu\text{L}$  da suspensão de células foram inoculados em meio LB ágar com antibiótico seletivo, a 37°C por 18 horas.

### 5.2.5 Extração de DNA plasmidial (miniprep)

Clones selecionados foram crescidos em 3 mL de meio 2YT com antibiótico de seleção e incubados sob agitação a 250 rpm, a 37°C, por 18 h. Pelo método de lise alcalina (SAMBROOK e RUSSEL, 2001), 1,5 mL da cultura foi submetido à extração e após a purificação foram ressuspensos em 40  $\mu\text{L}$  de água ultrapura estéril e incubados com RNase por 15 min a 37°C. As amostras obtidas foram analisadas em gel de agarose à concentração de 1,0 %.

### 5.2.6 Edição gênica com CRISPR-Cas9

#### 5.2.6.1 Escolha e produção do RNA guia (sgRNA)

O RNA guia foi desenhado especificamente para atingir o gene de interesse e se ligar à maquinaria da Cas9 (Figura 15). A sequência do gene TcCEN5 foi inserida na plataforma específica para patógenos eucariotos (*Eukaryotic Pathogen gRNA Design Tool* - EuPaGDT) (PENG e TARLETON, 2015) que procura possíveis sequências de sgRNA na extensão da sequência do gene de interesse, comparando com a sequência do banco de dados do organismo referência *T. cruzi* CLBrenner TritrypDB-32 (*hybrid diploid*). As sequências geradas pela plataforma levam em consideração diversos parâmetros: o motivo adjacente ao espaçador (PAM) com as sequências adjacentes à NGG, necessária para o funcionamento da endonuclease; previsão dos possíveis *off-targets*, locais que não há interesse de mutação no genoma; eficiência do guia para aquela posição exata. Além disso, a plataforma libera uma



lista com os cassetes que podem ser utilizados para induzir o reparo por microhomologia (PENG e TARLETON, 2015; PENG *et al.*, 2015).

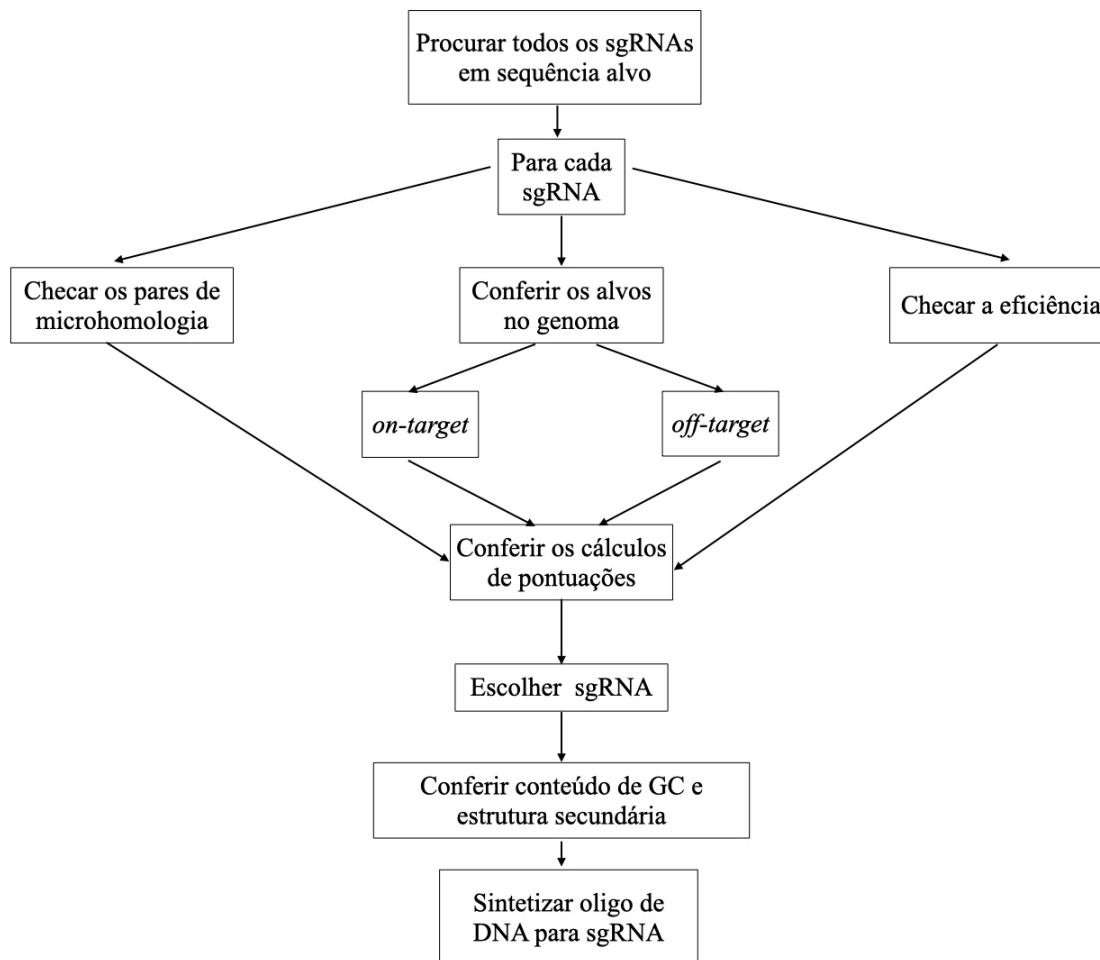


Figura 15. Fluxograma para escolha de sgRNA mais eficiente.

A estrutura dos sgRNAs foi baseada na sequência molde de Peng *et al.* (2015). Nessa estratégia, um cassete senso de 83 nt e um oligonucleotídeo antissenso amplificam a sequência *scaffold* do vetor pX330 para formação de uma sequência de DNA que será transcrita pela maquinaria T7 RNA polimerase (Figura 16).

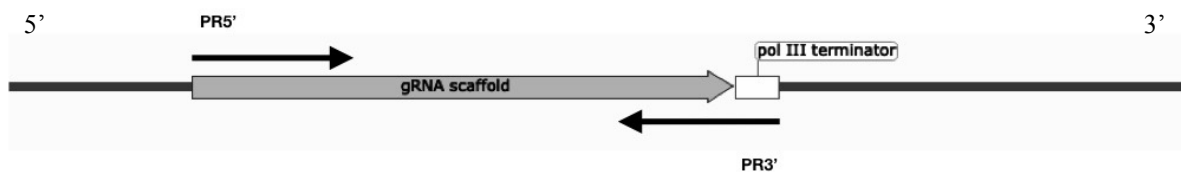


Figura 16. Esquema de amplificação da sequência *scaffold* inserida no vetor pX330. O produto da amplificação deve ter 83 nt. Os oligonucleotídeos senso possuem uma conformação que adiciona a sequência do promotor da T7 RNA polimerase ao sgRNA para posterior transcrição *in vitro*.

### 5.2.6.2 Anelamento ao vetor pX330

Para obter a sequência específica *scaffold* contida no plasmídeo pX330 foi feita uma amplificação *in vitro* por PCR. A amplificação foi feita com um cassete senso específico para cada sgRNA. A estrutura do cassete consiste em promotor para T7 RNA polimerase, sequência alvo específica para indução do corte e a sequência que anela à parte 5' da sequência *scaffold* contida no vetor pX330 (Figura 17). O oligonucleotídeo anti-senso é comum e anela à parte 3' da sequência *scaffold* (Tabela 5).

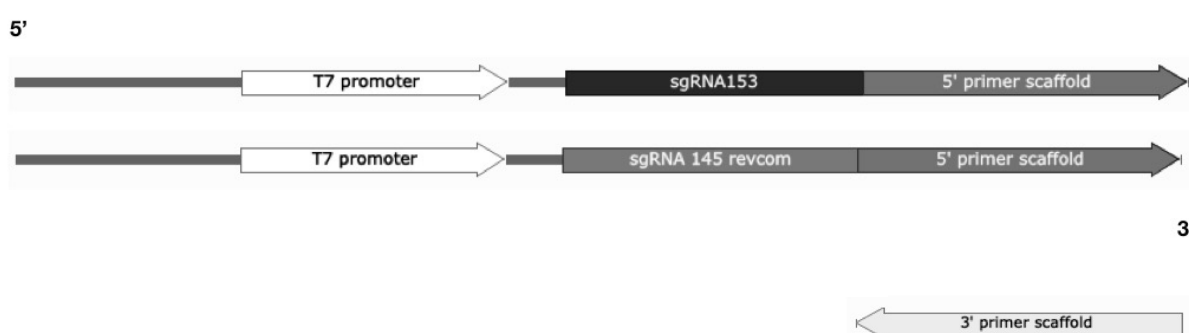


Figura 17. Estruturas dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação da sequência *scaffold* do vetor pX330.

Tabela 5. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação da sequência *scaffold* de pX330.

oligonucleotídeo	sgRNA	Sequência	Tm
PR635	153	GGAGGCCGGAGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTAAG GCGTTGGATGTGAAAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG	60°C
PR637	145 revcom	GGAGGCCGGAGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCCGT CCCTTCTGAGTCAAAAAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG	60°C
PR639	PR3' <i>scaffold</i>	AAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTT	65°C

O promotor da T7 RNA polimerase sublinhado. Em **negrito** a sequência específica para anelamento ao pX330.

### 5.2.6.3 Purificação e Transcrição *in vitro*

Após o anelamento da sequência *scaffold* ao sgRNA, o produto da reação foi purificado com *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen), conforme as instruções do fabricante. Nesse método, o DNA é purificado a partir da afinidade com sílica em altas concentrações de sais. Em seguida, esse produto purificado foi submetido a uma transcrição *in vitro* com *MEGashortscript™ T7 Transcription Kit* (Invitrogen), de acordo com as

instruções do fabricante. Após a purificação, o produto final foi quantificado com espectrofotômetro *NanoDrop Lite* (Thermo scientific) e submetido a um tratamento de pasteurização a 67°C por 30 minutos. Dessa forma, o sgRNA é eletroporado e logo utilizado pela maquinaria CRISPR-Cas9.

#### 5.2.6.4 Transfecção das sequências em parasitos LUCCAS9

Para a transfecção, foi feita uma cultura de parasitos *Trypanosoma cruzi* LUCCAS9 resistentes a Puromicina (10µg/mL) (Invitrogen); linhagem produzida e cedida pela Prof. Dra. Izabela Marques Dourado Bastos Charneau, Laboratório Interação Parasita-Hospedeiro, Departamento de Biologia celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília. Esses organismos possuem os genes Luciferase (LEWIS et al., 2014) e Cas9 internalizados, produzidos pela própria professora Izabela (não publicado). Em cada condição de transfecção foram eletroporados: os parasitos, os RNA guia para cada mutação (15µg) e seus respectivos cassetes para o reparo por homologia (10µg) (Tabela 6). Como controle os parasitos foram transfectados com a mesma quantidade em µL de H<sub>2</sub>O ultrapura.

**Tabela 6. Sequências dos cassetes de DNA sintetizadas para indução do reparo por homologia com introdução de códon de parada.**

Oligonucleotídeo	sgRNA	Sequência
PR636	153	TACATCGTAACCGAGAGCACAAAGCGCCACCTATCTATCTATTTTCACATC CAACGCCTTAATTCGTCCCGT
PR638	145 revcom	GCTCAACTTCGCGAGGCGTTTGACCTTTTTTAGATAGATAGGACTCAGA AGGGACGGGACGAATTAAGGCG

Foram feitas duas transfecções, na primeira foram eletroporados 1 x 10<sup>7</sup> parasitos (MOTTRAM, 2016) e na segunda, 5 x 10<sup>6</sup> (PENG *et al.*, 2015) parasitos para cada guia produzido. Depois os parasitos foram ressuspensos na solução de eletroporação proveniente do kit. A transfecção foi feita com o sistema AMAXA, Human T Cell Nucleofector™ Kit (Lonza) programa U33 de acordo com as instruções do fabricante. Esse método tem como princípio a criação de poros na membrana celular e nuclear após aplicação de um pulso elétrico, os programas e soluções são exclusivos e otimizados para esse kit. Depois os parasitos foram transferidos para cultura de meio LIT suplementado com 20% de SFB.

### 5.2.6.5 Extração de DNA genômico

Além dos parasitos coletados para imunofluorescência, foram separados 200  $\mu\text{L}$  de cultura para extração de DNA genômico. Essa etapa foi feita com *PureLink™ Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen) e em seguida a quantificação foi feita por absorbância no *NanoDrop Lite* (ThermoScientific).

### 5.2.6.6 PCR do DNA genômico

Para confirmar a inserção da sequência do códon de parada presente no cassete de homologia, foi feita uma amplificação das sequências mutagenizadas específicas com pares de oligonucleotídeos desenhados especificamente para a região de mutação (Tabela 7). Para cada reação de amplificação foram utilizados 70 ng/ $\mu\text{L}$  de DNA genômico.

**Tabela 7. Oligonucleotídeos utilizados para confirmação da inserção do códon de parada no reparo por homologia**

Oligonucleotídeo	sgRNA	Sequência	Tm
5' PR561	-	5' CGGCTCGAGATGGAGTCAATTAAGGCCAAG 3'	60°C
3' PR679	153	CGCCACCTATCTATCTATTTTC	60°C
3' PR680	145 revcom	CCCTTCTGAGTCCTATCTATC	60°C

Sítio da enzima de restrição: XhoI - CTCGAG

### 5.2.6.7 Nested PCR

Com objetivo de aumentar a detecção da sequência mutagenizada, as amostras foram submetidas à amplificação do tipo *nested* (Figura 18). Essa técnica consiste num primeiro ciclo de amplificações de uma sequência mais externa e depois esse produto é submetido a uma segunda rodada de amplificações com um alvo específico. Neste trabalho a sequência amplificada foi a do gene TcCEN5 completo com os pares de oligonucleotídeos PR561-PR562. No segundo ciclo de amplificações foram utilizados os oligonucleotídeos (Tabela 8) que anelam nas sequências selvagem e mutadas específicas. Essas reações foram feitas com os parasitos da segunda transfecção.



**Figura 18. Reação de PCR do tipo *Nested*.** A primeira rodada de amplificação foi feita com oligonucleotídeos mais externos (em azul). Como a reação de amplificação aumenta o número de cópias da sequência, é possível utilizar esse produto para uma segunda rodada de amplificações com oligonucleotídeos específicos para a mutação (em rosa). A faixa em vermelho representa a mutação induzida.

**Tabela 8. Oligonucleotídeos utilizados para a PCR tipo *nested*.**

Oligonucleotídeo	sgRNA	Sequência	Tm
5' PR697	153	CCGCTTAGCATCAGCATTTC	60°C
3' PR698	153 selvagem	CAAAGCGCCACTTTCACATC	60°C
3' PR679	153 mutada	CGCCACCTATCTATCTATTTC	60°C
5' PR722	145 revcom	TCTCGTGAATGAGAAGCCTG	60°C
3' PR723	145 revcom selvagem	CCCGTCCCTTCTGAGTCAA	60°C
3' PR680	145 revcom mutada	CCCTTCTGAGTCCTATCTATC	62°C

### 5.2.6.8 Curva de crescimento

Para investigar se o silenciamento da TcCEN5 afetou o crescimento dos parasitos, eles foram quantificados após 24 h, 48 h e 96 h após a transfecção por contagem direta em câmara de Neubauer.

### 5.2.6.9 Imunofluorescência

Para analisar a mudança morfológica causada pelo silenciamento, foi executada a imunofluorescência dos parasitos. O preparo das lâminas para imunofluorescência envolve a fixação das amostras. Todas as soluções utilizadas foram filtradas antes do uso para evitar

*background* nas imagens. 200  $\mu\text{L}$  das amostras de parasitos foram retiradas, todos os dias, no mesmo horário da transfecção. As células foram lavadas com PBS 2 vezes e em seguida ressuspensas em 100  $\mu\text{L}$  de PBS com 1% de formaldeído e incubadas à temperatura ambiente (TA), por 30 min. Foi adicionado Triton X-100 em uma concentração final de 0,1% e incubadas à TA, por 10 min. Glicina foi adicionada a concentração de 0,1 M e incubada à TA por 10 min. Depois, essas células foram centrifugadas a 2000 rpm e ressuspensas em 200  $\mu\text{L}$  de PBS; 50  $\mu\text{L}$  de amostra foram espalhados em lâminas de microscopia tratadas com poli-Llisina 0,01% previamente. Foi adicionado TB às lâminas e incubadas à TA, por 5 min. Adicionado o anticorpo primário Anti-cinesina diluído 1:1000 em TB e incubado durante a noite, à 4°C. As lâminas foram lavadas 3x com PBS e o anticorpo secundário, Alexa Fluor 488 Invitrogen® anti-*mouse* 1:500, foi adicionado e as lâminas foram incubadas à TA por 1 hora, no escuro. Por fim, as lamínulas foram fixadas com *ProLong™ Gold Antifade Mountant* com DAPI (MOTTRAM, 2016). As lâminas foram analisadas e fotografadas com microscópio de fluorescência Axio Scope.A1 (Zeiss) e as imagens coletadas com o programa ZEN Lite. Posteriormente, as imagens foram tratadas no programa ImageJ.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

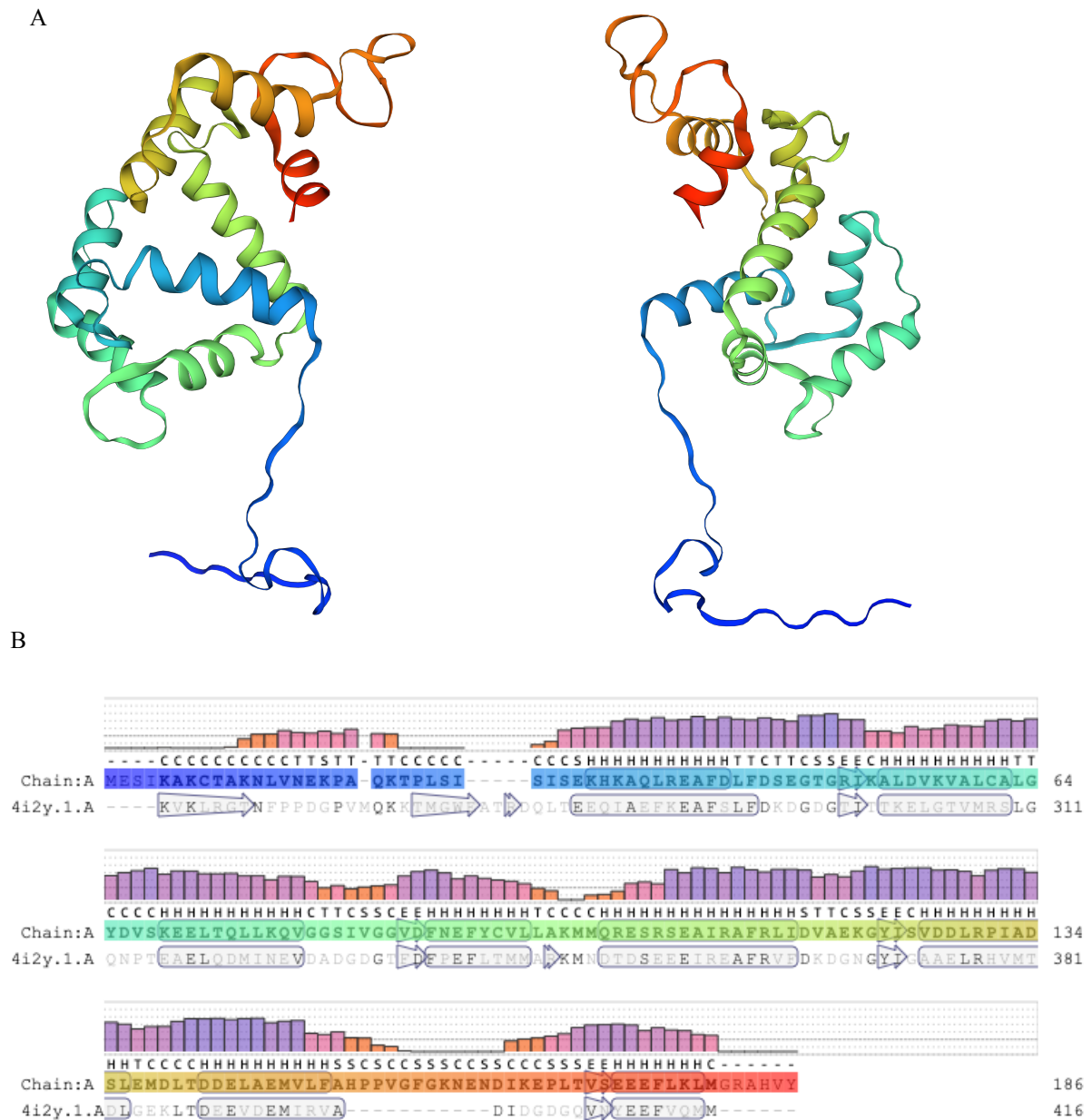
### 6.1 Análises *in silico*

#### 6.1.1 A estrutura da TcCEN5

O gene da centrina5 de *Trypanosoma cruzi* possui 561 nucleotídeos e não foi elucidado no cromossomo homólogo, ou seja, até então apenas uma cópia é encontrada no genoma, na fita complementar. A TcCEN5 é uma proteína com 186 aminoácidos e sua massa molecular é de 20.71kDa.

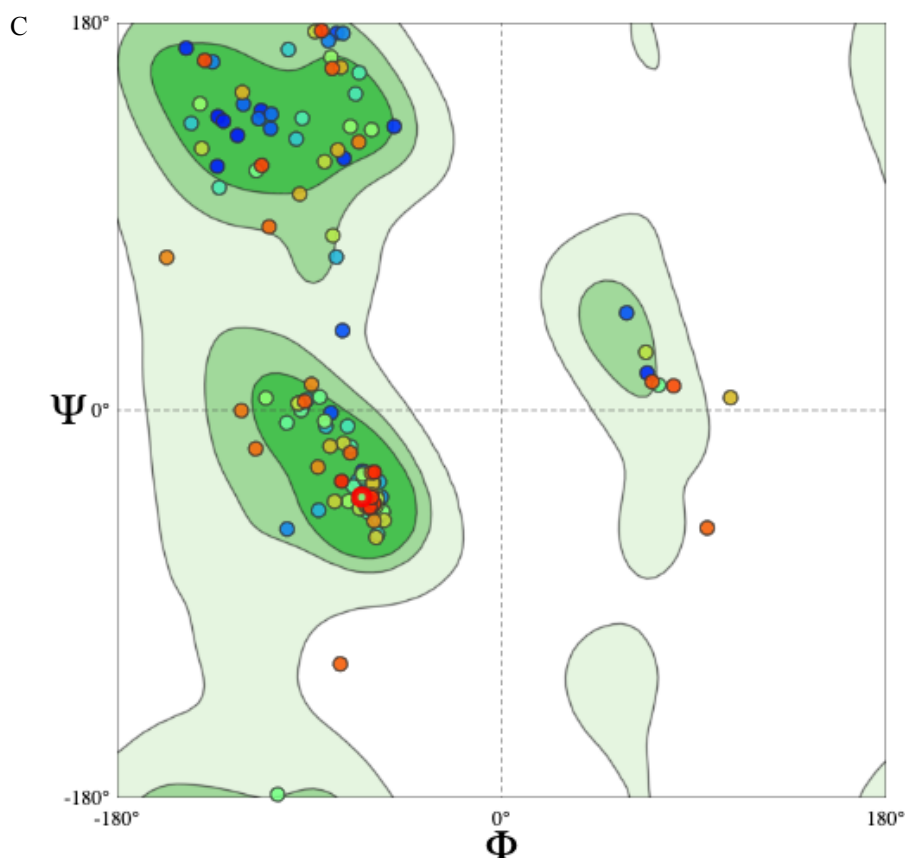
Análises da proteína em banco de dados (Pfam Versão 32.0) de domínios proteicos previu que a TcCEN5 possui dois domínios *EF-Hand* (EL-GEBALI *et al.*, 2019). Outros três domínios reconhecidos foram para canais de cálcio dependentes de voltagem (tipo L), ou seja, transportam  $\text{Ca}^{2+}$  dependendo do potencial de ação. Estudos anteriores com Centrinas reportaram a presença de dois domínios *EF-Hand* presentes nessa proteína em diferentes organismos como *Chlamydomonas reinhardtii* (VEERARAGHAVAN *et al.*, 2002) e *Toxoplasma gondii* (HU *et al.*, 2006).

A sequência de aminoácidos foi analisada em banco de dados para predição de estruturas de proteínas: *Swiss-Model* (WATERHOUSE *et al.*, 2018). Esse banco de dados cria modelos de proteínas a partir da procura por homologia de sequências já resolvidas. Para que o modelo seja criado, o programa identifica motivos estruturais, alinha as sequências ao modelo estrutural conhecido, constrói a imagem e analisa a qualidade da previsão estrutural. O modelo construído (Figura 19) possui locais de alça, que provavelmente se ligam ao  $\text{Ca}^{2+}$ , como predito na análise anterior. No diagrama de Ramachandran, o lado direito representa as conformações folha- $\beta$ , no superior, e  $\alpha$ -hélice, no inferior. No lado esquerdo superior, são representados  $\alpha$ -hélice com giro à esquerda. No modelo esboçado, os aminoácidos estão distribuídos entre as regiões de  $\alpha$ -hélice e folha- $\beta$  nos locais de maior probabilidade de ocorrência. Apesar disso, a pontuação GMQE calculada para a estrutura completa é de 0,64. A pontuação representa a qualidade do alinhamento da sequência modelo 4i2y.1.A e TcCEN5, o número varia de 0-1 que significa que números mais próximos de 1 são mais confiáveis.



**Figura 19. Modelagem da estrutura quaternária da proteína TcCEN5 pelo programa *Swiss-Model*.** (A) Estrutura predita da proteína TcCEN5 em esquema de fita. A porção N-Terminal da proteína é a porção azul e a C-terminal, vermelha. Pontos verdes representam o íon  $\text{Ca}^{2+}$ . (B) Alinhamento da TcCEN5 contra a proteína Indicadora de Cálcio RGE01 (4i2y), que se liga ao cálcio. As barras coloridas representam a pontuação esperada para cada aminoácido utilizando a proteína 4i2y como modelo para os aminoácidos da TcCEN5. abaixo delas encontra-se a sequência consenso. As cores do modelo representam cada aminoácido. (C) Diagrama de Ramachandran do modelo de TcCEN5. Cada ponto colorido representa a posição de cada aminoácido na estrutura. Os ângulos de torção entre os átomos de  $\text{C}\alpha$ -C ( $\Psi$ ) e  $\text{C}\alpha$ -N ( $\Phi$ ). (WATERHOUSE et al., 2018).



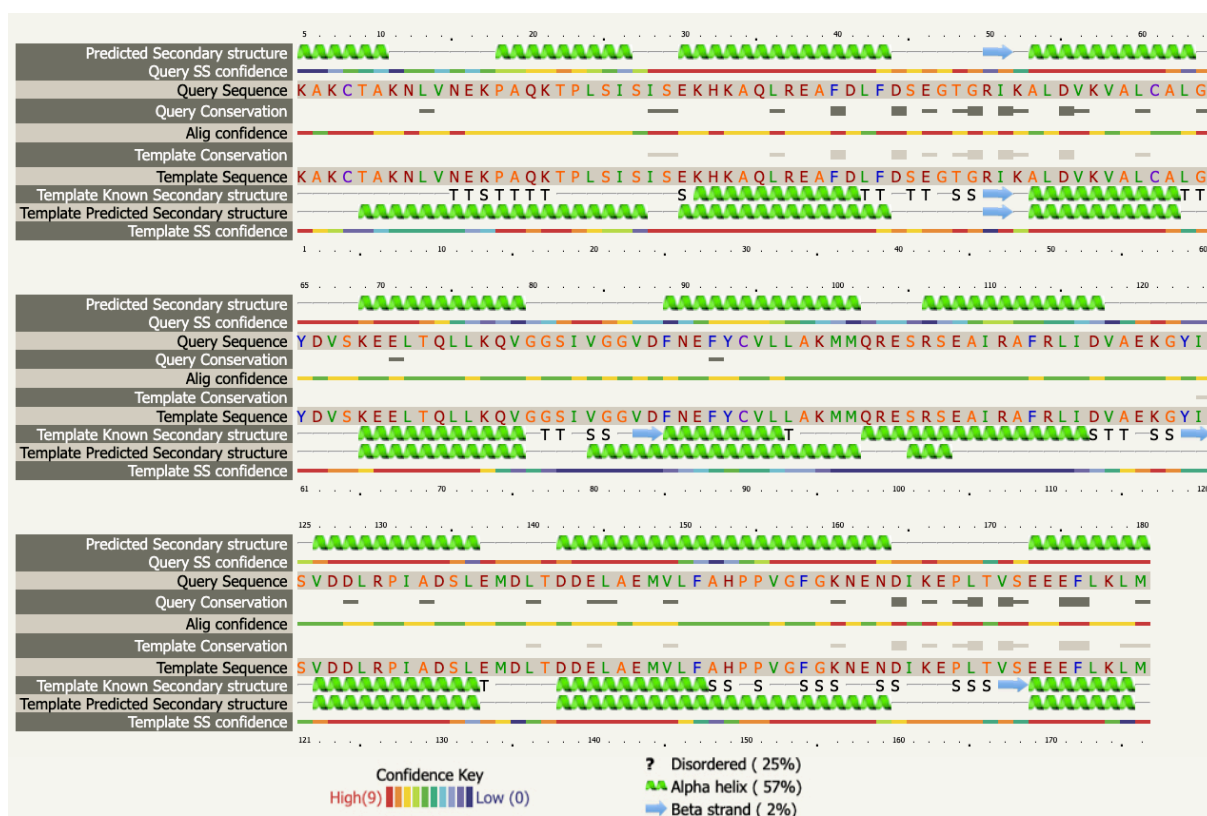


**Figura 19. Modelagem da estrutura quaternária da proteína TcCEN5 pelo programa *Swiss-Model*.** (A) Estrutura predita da proteína TcCEN5 em esquema de fita. A porção N-Terminal da proteína é a porção azul e a C-terminal, vermelha. Pontos verdes representam o íon  $\text{Ca}^{2+}$ . (B) Alinhamento da TcCEN5 contra a proteína Indicadora de Cálcio RGECO1 (4i2y), que se liga ao cálcio. As barras coloridas representam a pontuação esperada para cada aminoácido utilizando a proteína 4i2y como modelo para os aminoácidos da TcCEN5. abaixo delas encontra-se a sequência consenso. As cores do modelo representam cada aminoácido. (C) Diagrama de Ramachandran do modelo de TcCEN5. Cada ponto colorido representa a posição de cada aminoácido na estrutura correspondentes à imagem 19.B. Os ângulos de torção entre os átomos de  $\text{C}\alpha$ -C ( $\Psi$ ) e  $\text{C}\alpha$ -N ( $\Phi$ ). (WATERHOUSE et al., 2018).

SALISBURY, em 1995, descreveu que as Centrininas possuíam 4 motivos *EF-Hand*. Assim como nesse estudo, em concordância com os resultados obtidos previamente para o *Trypanosoma brucei* previu presença de quatro motivos *EF-Hand* para TcCEN5 (SHI et al., 2008; SHAN et al., 2019). Em contraposição, as conclusões obtidas anteriormente de que as Centrininas de tripanossomatídeos possuíam diferentes sítios de ligação ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Em *Leishmania major* e *Trypanosoma brucei* as Centrininas 1 a 3 foram descritas com dois sítios de ligação ao  $\text{Ca}^{2+}$ ; centrina4, com um sítio e centrina5 não foi encontrado nenhum sítio de ligação ao  $\text{Ca}^{2+}$  (SELVAPADIYAN et al., 2007). Essa divergência pode ser obtida devido aos diferentes programas de predição de famílias e domínios proteicos, nos resultados divergentes, os estudos foram feitos em um programa que atualmente encontra-se fora do ar

(<http://molbio.info.nih.gov/molbio/>). Quanto a pontuação QMQE, o resultado desse trabalho foi igual ao modelo proposto por SHAN *et al.* (2019), no qual a pontuação obtida foi de 0,64. Apesar de semelhantes, o modelo proposto por SHAN *et al.* (2019), foi obtido com a exclusão de 25 aminoácidos iniciais e pelo alinhamento de Centrininas já resolvidas dos organismos *Chlamydomonas reinhardtii*, *Homo sapiens*, *Mus musculus* e *Scherffelia dubia*. Ao passo que o modelo proposto por esse trabalho foi criado com base na proteína RGECO1, resolvida por cristalografia de raio-x e com sítios de ligação ao  $\text{Ca}^{2+}$  definidos.

Para analisar a confiabilidade da estrutura criada por *Swiss-Model* foi utilizado o programa Phyre2 (*Protein Homology/analogy Recognition Engine*; versão 2.0) (KELLEY *et al.*, 2015). A sequência de aminoácidos foi comparada com a estrutura tridimensional pelo programa *One-to-one threading* que alinha essas duas estruturas e calcula o intervalo de confiança, identidade, conservação da sequência modelo e a estrutura criada (Figura 20).



**Figura 20.** Alinhamento dos aminoácidos de TcCEN5 e da estrutura tridimensional criada em *Swiss-Prot*. O intervalo de confiança do alinhamento é de 99,95% e identidade de 100% entre aminoácidos e modelo 3D. No sítio de conservação está a informação da conservação de cada resíduo, linhas mais grossas representam maior conservação.

Em comparação com o modelo da TcCEN5 proposto por SHAN *et al.* (2019), a conformação de TcCEN5 não possui formato de halter, apesar disso, as sequências

apresentam 71% de identidade e 81,7% de similaridade. Com a análise *in silico* da estrutura da TcCEN5 e os intervalos de confiança das predições apresentados nesse trabalho, acredita-se que essa estrutura proposta esteja tão próxima a realidade quanto a estrutura de TbCEN5. Sugere-se, então, que análises de espectroscopia por ressonância magnética nuclear (NMR) sejam feitas para que as estruturas das proteínas possam ser elucidadas com mais precisão. Essa técnica permite a construção de imagens de proteínas a partir da energia nuclear dos átomos, que oferece maior resolução de imagens. Além disso, essa técnica permite a obtenção de imagens com mudanças estruturais das moléculas (RAMANUJAM *et al.*, 2020), que pode ser interessante para avaliar as diferentes conformações da centrina5 na presença ou não de Ca<sup>2+</sup>.

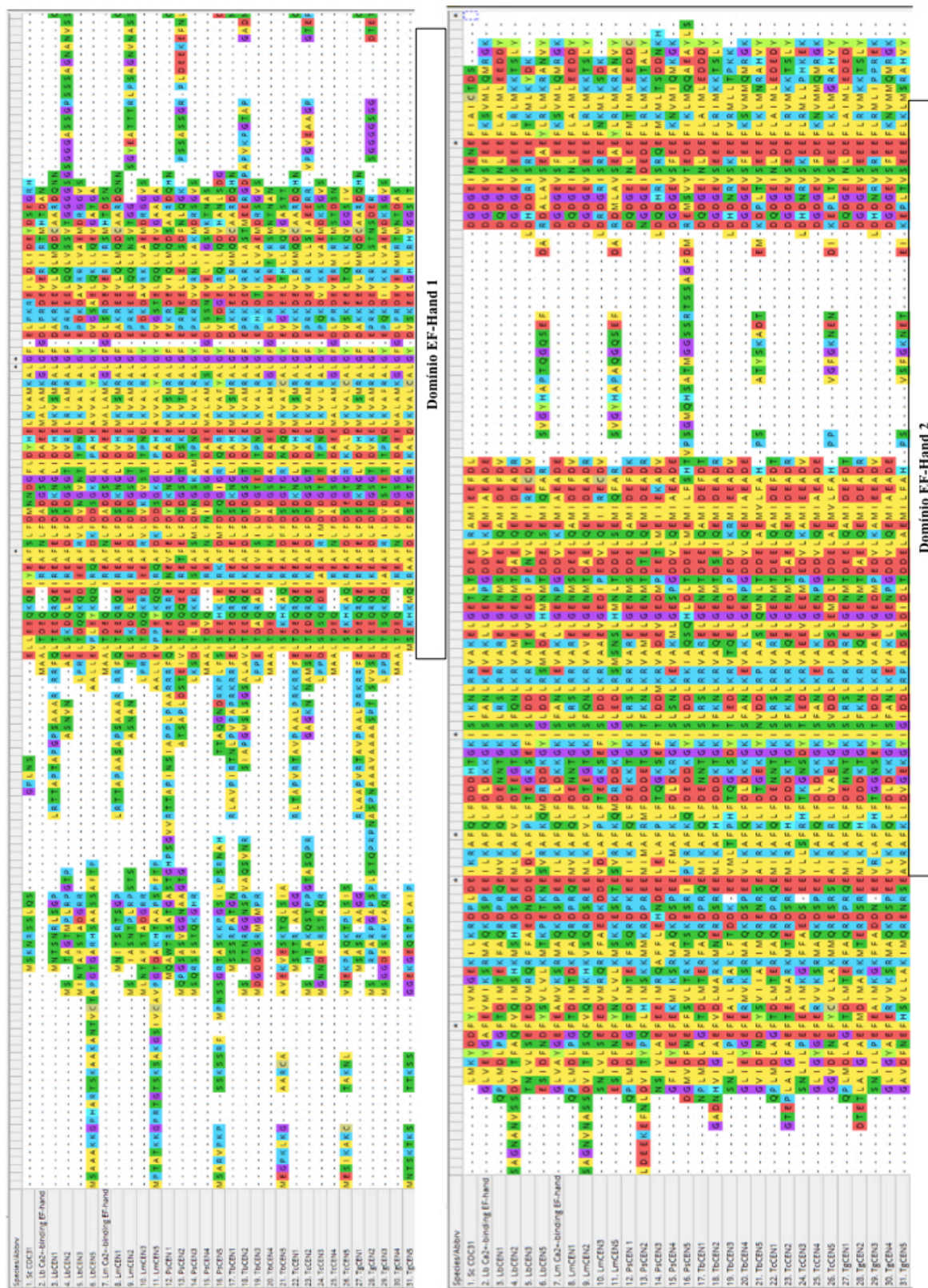
### 6.1.2 Filogenia das sequências de centrina

Para construção da filogenia da TcCEN5 foram executados alinhamentos par a par (*pairwise*) e alinhamentos múltiplos das sequências de aminoácidos de Centrinas descritas na Tabela 3. Os alinhamentos foram feitos com os programas BLASTP (NCBI) e ClustalW (LARKIN *et al.*, 2007).

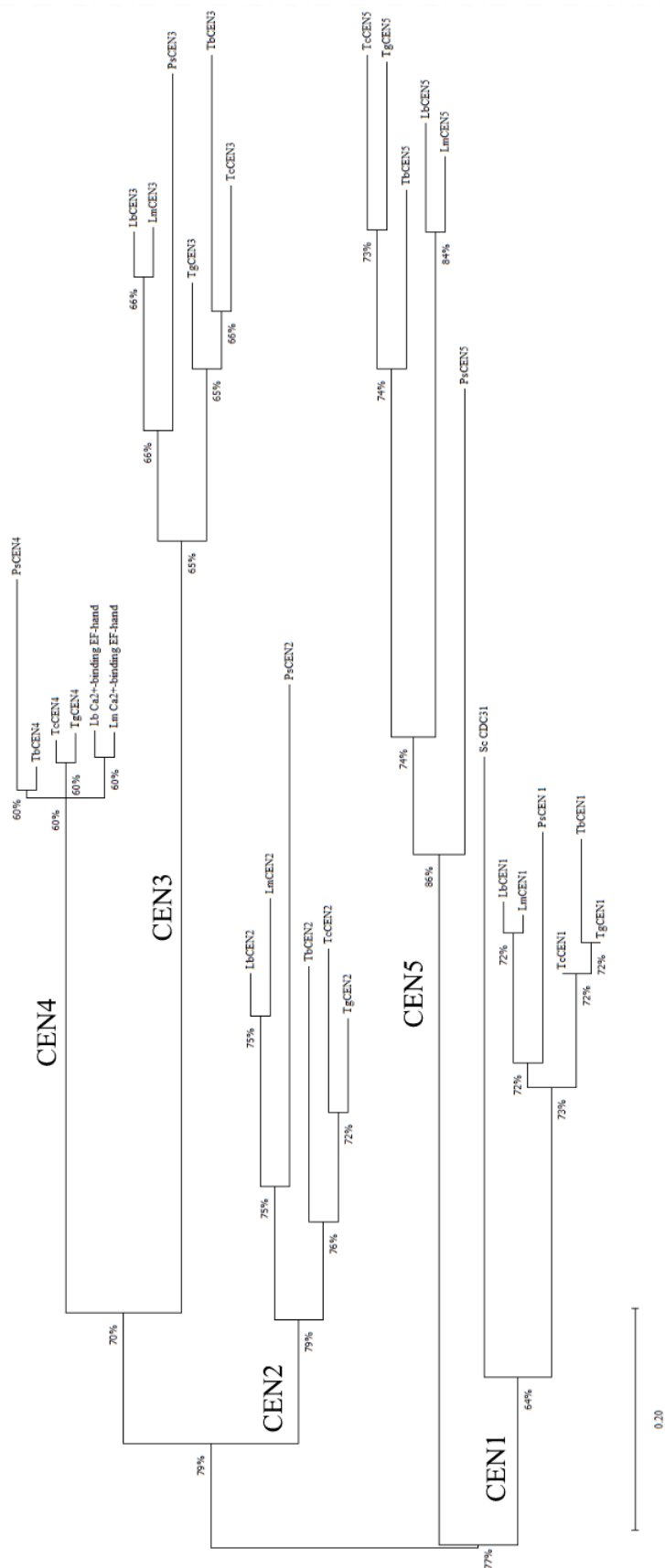
Os alinhamentos par a par foram feitos para identificar os níveis de identidade entre as centrinas de *Trypanosoma cruzi* (Tabela 9). O alinhamento múltiplo foi realizado para estabelecer níveis de conservação entre as Centrinas de tripanossomatídeos e a ScCDC31 (Figura 21); com esse alinhamento foi possível a construção de árvore filogenética desses organismos (Figura 22). O alinhamento múltiplo com tripanossomatídeos, ScCDC31 e centrinas de *Homo sapiens* também foi realizado com ClustalW (Figura 23) e a árvore construída por Máxima Verossimilhança (Figura 24). O Método de Máxima Verossimilhança foi o escolhido para todas as construções filogenéticas pois analisa as probabilidades de cada ramo e utiliza os agrupamentos de maiores porcentagens para construção dos nós, construindo uma árvore filogenética mais próxima ao modelo evolutivo (TAMURA *et al.*, 2011).

**Tabela 9. Matriz de identidade entre centrinas de *Trypanosoma cruzi* e a centrina 5.** Os parâmetros utilizados foram os de custo de gaps = 11 e matriz BLOSUM 62. Alinhamentos feitos com BLASTP. (NCBI)

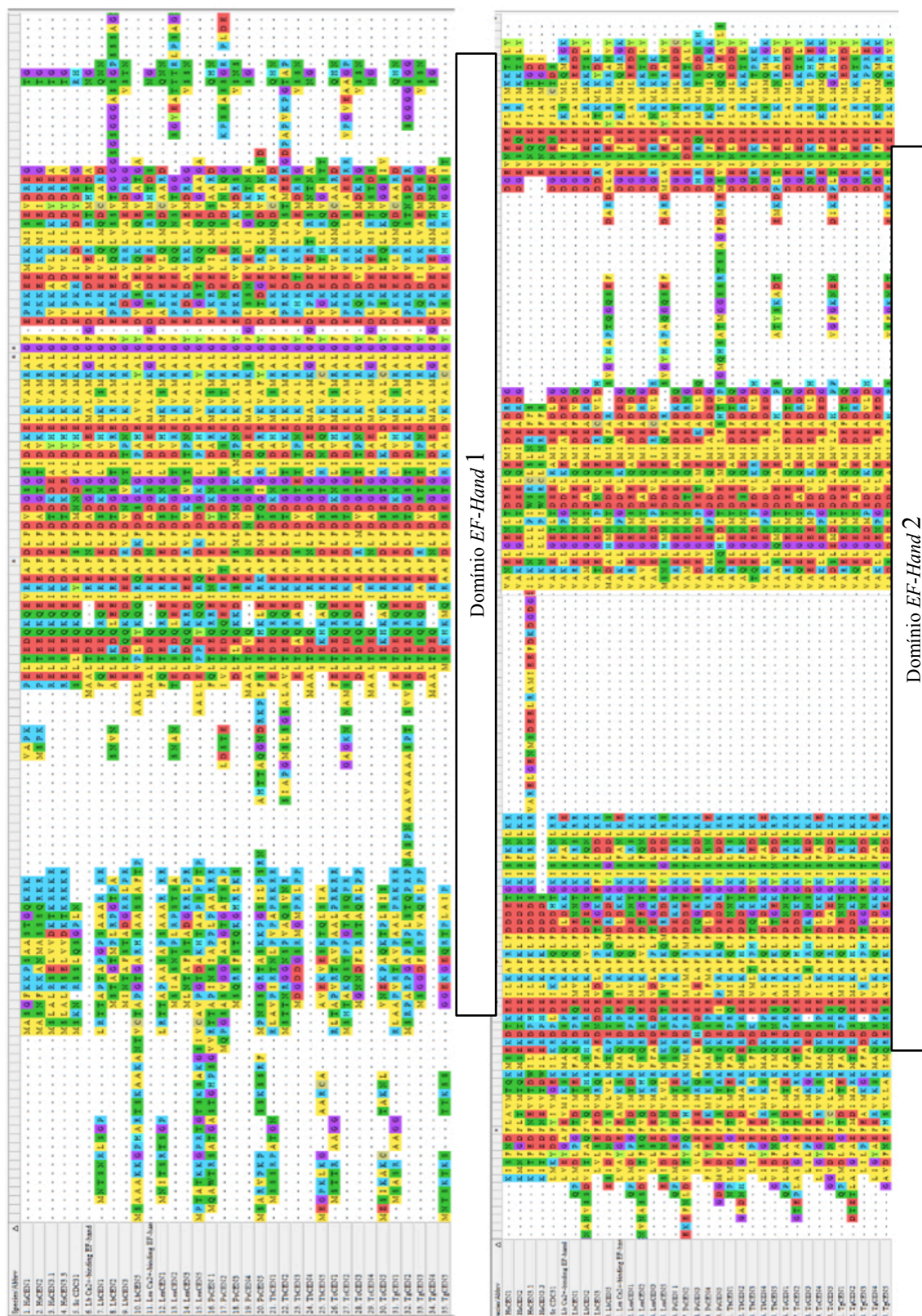
	TcCEN1	TcCEN2	TcCEN3	TcCEN4
TcCEN5	55%	35%	53%	35%



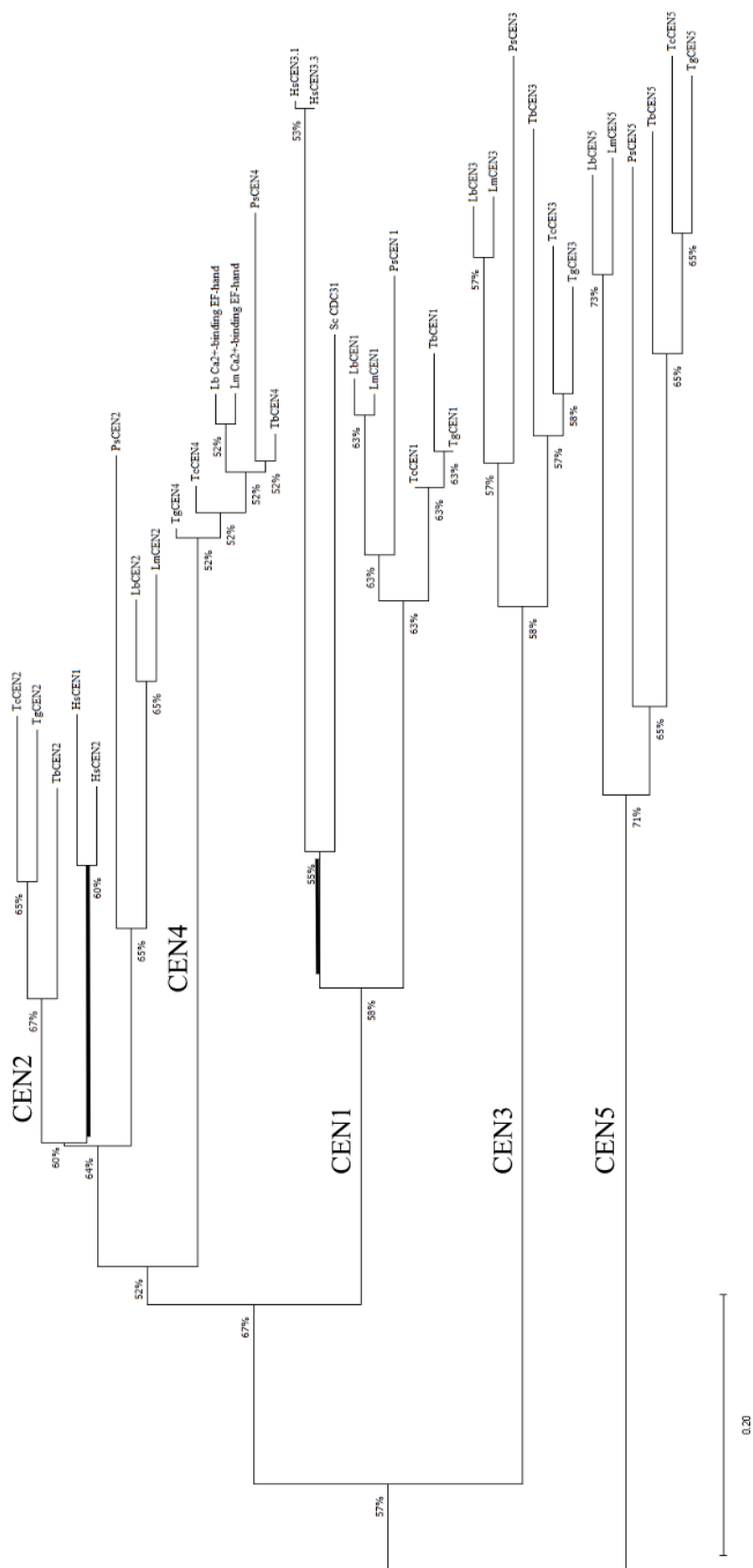
**Figura 21.** Alinhamento múltiplo de centrinas tripanossomatídeos e ScCDC31. Construído com ClustalW. Os possíveis domínios *EF-Hand* estão assinalados com os blocos. \* são locais de identidade dos aminoácidos. Sc - *Saccharomyces cerevisiae*; Lb - *Leishmania braziliensis*; Lm - *Leishmania major*; Ps - *Phytomonas serpens*; Tb - *Trypanosoma brucei*; Tc - *Trypanosoma cruzi*; Tg - *Trypanosoma grayi*.



**Figura 22. Árvore filogenética dos tripanossomatídeos e ScCDC31.** Construída com o método Máxima Verossimilhança. O modelo de matriz foi de JTT. As porcentagens indicam a cobertura da análise para cada ramo. Sc - *Saccharomyces cerevisiae*; Lb - *Leishmania braziliensis*; Lm - *Leishmania major*; Ps - *Phytomonas serpens*; Tb - *Trypanosoma brucei*; Tc - *Trypanosoma cruzi*; Tg - *Trypanosoma grayi*.



**Figura 23. Alinhamento múltiplo de centrinas de tripanossomatídeos, ScCDC31 e *Homo sapiens*.** Construído com ClustalW. Os possíveis domínios *EF-Hand* estão assinalados com os blocos. \* são locais de identidade dos aminoácidos. Sc - *Saccharomyces cerevisiae*; Hs - *Homo sapiens*; Lb - *Leishmania braziliensis*; Lm - *Leishmania major*; Ps - *Phytomonas serpens*; Tb - *Trypanosoma brucei*; Tc - *Trypanosoma cruzi*; Tg - *Trypanosoma grayi*.



**Figura 24.** Árvore filogenética de tripanossomatídeos, *ScCDC31* e *Homo sapiens*. Construída com o método Máxima Verossimilhança. O modelo de matriz foi de JTT. As porcentagens indicam a cobertura da análise para cada ramo. Linhas em negrito são os ramos das Centrinhas de humanos. Sc - *Saccharomyces cerevisiae*; Hs - *Homo sapiens*; Lb - *Leishmania braziliensis*; Lm - *Leishmania major*; Ps - *Phytomonas serpens*; Tb - *Trypanosoma brucei*; Tc - *Trypanosoma cruzi*; Tg - *Trypanosoma grayi*.

Pelos alinhamentos múltiplos pode-se inferir grupos sequências conservadas que provavelmente correspondem aos domínios *EF-Hand*, os sítios conservados são representados pelos blocos de mesma cor, cada aminoácido possui uma cor que o representa (Figura 21 e Figura 23). As filogenias foram construídas a partir dos alinhamentos múltiplos, mas possuíram divergências quanto aos nós e ramos quando comparadas às sequências das Centrininas humanas. Na Figura 21, Centrininas 2, 3 e 4 são ortólogas entre si, ou seja, são provenientes de um mesmo nó. As Centrininas 1 e 5 também foram relacionadas entre si, com um ancestral comum; corroborando com as identidades par a par expostas na Tabela 9. Nessa filogenia a TcCEN5 foi associada evolutivamente à centrina5 de *Trypanosoma grayi*. Esse tripanossomatídeo é um parasita extracelular de répteis crocódilianos, transmitido pela ingestão de fezes da mosca Tsé-Tsé (*Glossina palpalis*) (HOARE, 1931). Em estudos filogenéticos anteriores, o *Trypanosoma cruzi* foi evolutivamente relacionado ao *T. grayi* quando analisados filogeneticamente com outros tripanossomatídeos também investigados nesse trabalho como: *Trypanosoma brucei*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania major* e *Phytomonas serpens* (KELLY et al., 2014).

A filogenia construída com as Centrininas de *Homo sapiens* (Figura 22) foi divergente da primeira (Figura 24) montada nesse estudo. Nesta árvore filogenética, os grupos das Centrininas 1, 2 e 4 são grupos ortólogos. Além disso, as Centrininas 1 e 2 de *H. sapiens* são correlacionadas ao grupo da centrina2; a centrina3 de *H. sapiens*, e suas isoformas, associadas à centrina de *Saccharomyces cerevisiae* (ScCDC31) e ao grupo da centrina1. Nessa filogenia, o ramo da centrina5 é considerado o mais divergente entre todas as centrininas, já que está arranjado como grupo externo. Isto corrobora para o fato de que a centrina5 é evolutivamente divergente das centrininas de humanos e, possivelmente, um alvo para desenvolvimento de fármacos. Semelhante a esses resultados, o estudo precedente com *Trypanosoma brucei* aproximou a TbCEN5 à centrina5 de *Leishmania major* (LmCEN5) (SELVAPADIYAN et al., 2007). Apesar disso, outros grupos apresentaram trabalhos com filogenias divergentes quanto a história evolutiva da centrina5. SHI et al. (2009) e SHAN et al. (2019) correlacionaram a TbCEN5 à centrina4 de *L. major* (LmCEN4). A discordância pode ocorrer pois as sequências de *T. cruzi* não foram analisadas nesses estudos e devido aos diferentes métodos de alinhamento utilizados e das diferentes pontuações atribuídas a *gaps* e pelo modelo de



construção da árvore filogenética. Sugerem-se, então, estudos mais aprofundados acerca das sequências das centrinas de trypanossomatídeos.

## 6.2 Silenciamento gênico

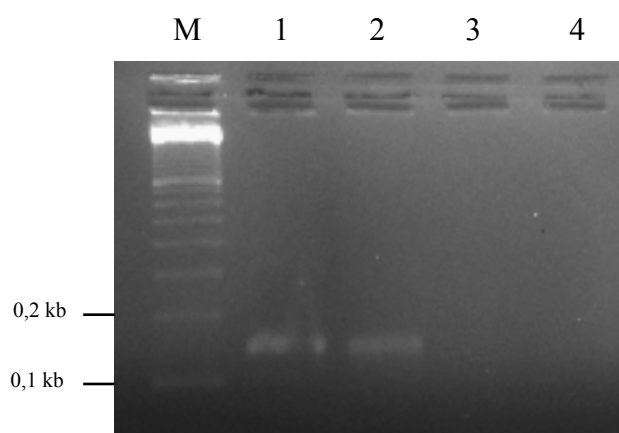
### 6.2.1 Escolha e produção do sgRNA

A partir da análise genética *in silico* e pelo uso da plataforma EuPaGDT foi obtida uma lista das possíveis sequências de sgRNA e duas delas foram escolhidas (Tabela 10) para a síntese. TcCEN5 145 revcom e TcCEN5 153 foram selecionadas com base no fluxograma para identificação do sgRNA (Figura 15). Ambas sequências foram escolhidas com base nas características para a melhor atividade do sistema CRISPR/Cas9. Ou seja, o sgRNA foi escolhido para a maior eficiência com base na pontuação geral obtida pelo número de *on* e *off-targets*, pontuação geral, posição do sgRNA e eficiência dos cassetes de microhomologia.

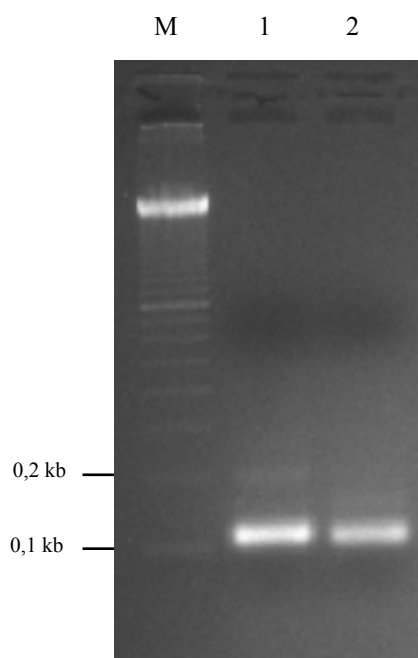
**Tabela 10. Sequências escolhidas para a produção do sgRNA pela plataforma EuPaDGT.**

sgRNA identificação	sequência sgRNA + PAM (NGG)	pontuação geral	<i>On-target hit</i>	<i>Off-target hit</i>
TcCEN5_145_revcom	CCGTCCCTTCTGAGTCAAAAAGG	0.54	1	0
TcCEN5_153	TAAGGCGTTGGATGTGAAAGTGG	0.36	1	2*

A amplificação da sequência *scaffold* foi feita com intuito de produzir um sgRNA completo para o silenciamento gênico. A sequência obtida com a amplificação desse produto (Figura 25) gerou um amplicom de 142 pares de base que posteriormente foi utilizado para a transcrição *in vitro* e eletroporação nos parasitos LUCCAS9.



**Figura 25. Produto da amplificação do vetor pX330.** (M) Marcador 100bp *DNA ladder* (Invitrogen). (1) PR635-PR639 - sgRNA153; (2) PR637-PR639 - sgRNA 145revcom; (3) Controle negativo PR635-PR639; (4) Controle negativo PR637-PR639. Eletroforese em gel de agarose 2,5% corada com EtBr. Amplicom de 142 pb.



**Figura 26. Produto de RNA proveniente da transcrição *in vitro* e após purificação.** M - Marcador 100bp *DNA ladder* (Invitrogen); (1) sgRNA153; (2) sgRNA145\_revcom. Eletroforese de agarose 2,5% corado com EtBr.

Em seguida o produto purificado foi submetido à transcrição *in vitro* para produção do RNA que foi transfectado. Parte do produto amplificado codifica para o promotor da T7 RNA polimerase; dessa forma, o produto de RNA da transcrição possui 102 nt (Figura 26). O RNA foi quantificado com NanoDropLite (ThermoScientific) (Tabela 11).

Tabela 11. Quantificação dos sgRNA após purificação.

Sistema	Quantificação (ng/ $\mu$ L)
TcCEN5_145_revcom	83,5
TcCEN5_153	51,0

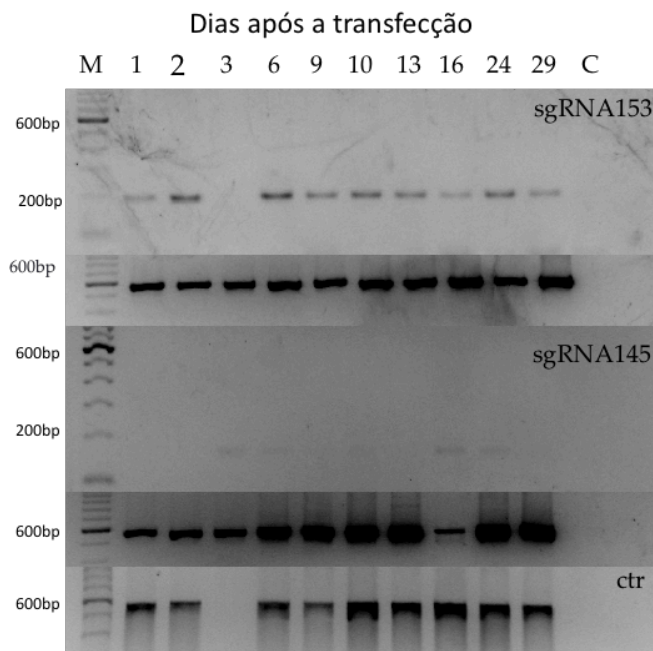
### 6.2.2 Transfecção de parasitos LUCCAS9

Os parasitos epimastigotos LUCCAS9 foram transfectados com o sistema AMAXA. Nas transfecções foram incorporadas as sequências dos sgRNAs e seus respectivos cassetes para indução do reparo por homologia.

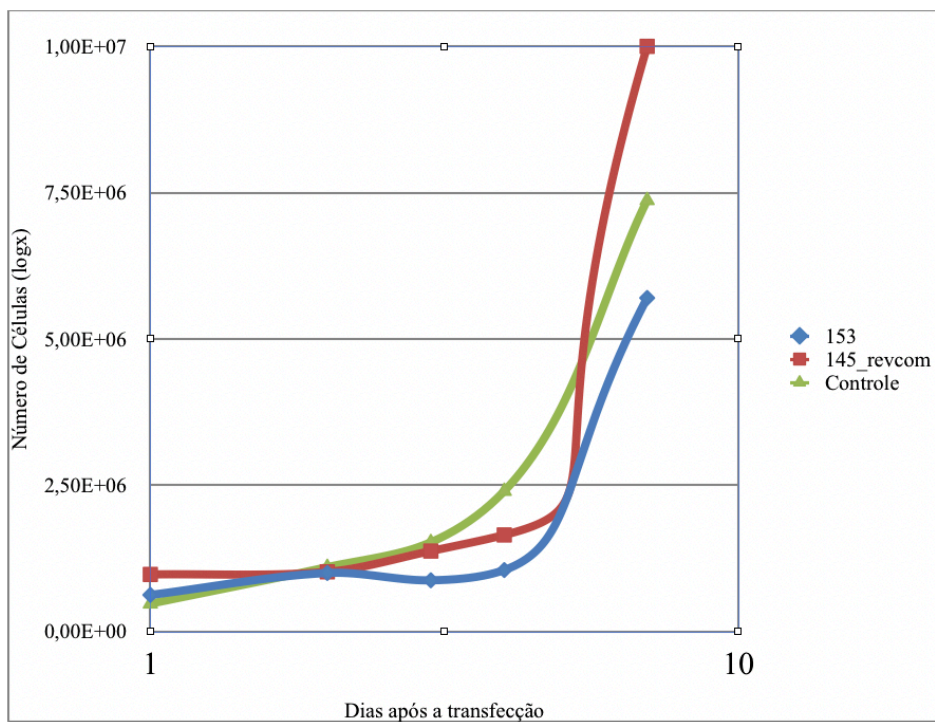
#### 6.2.2.1 Transfecção 1

Na primeira transfecção realizada, foram utilizados  $1 \times 10^7$  parasitos de acordo com o protocolo de MOTTRAM (2016). Para confirmar a introdução da sequência para mutação, parte dos parasitos foram separados para extração do DNA genômico. O DNA de cada condição foi submetido a um rodada de ampliações para confirmar a mutação dos parasitos transfectados. (Figura 27). Na primeira transfecção o DNA foi amplificado apenas com pares de oligonucleotídeos 5'PR697 e 3' PR679 e PR680. A amplificação de sequências com códon de parada corrobora para a afirmação de que houve uma inserção de mutação no genoma dos parasitos.

Após confirmada a inserção da sequência do códon de parada, foi realizada a contagem dos parasitos com o propósito de verificar se a mutação provocou alteração no crescimento dos parasitos mutados (Figura 28). houve uma diminuição do número de parasitos nos cinco primeiros dias. Após o quinto dia, o número de parasitos começou a aumentar.

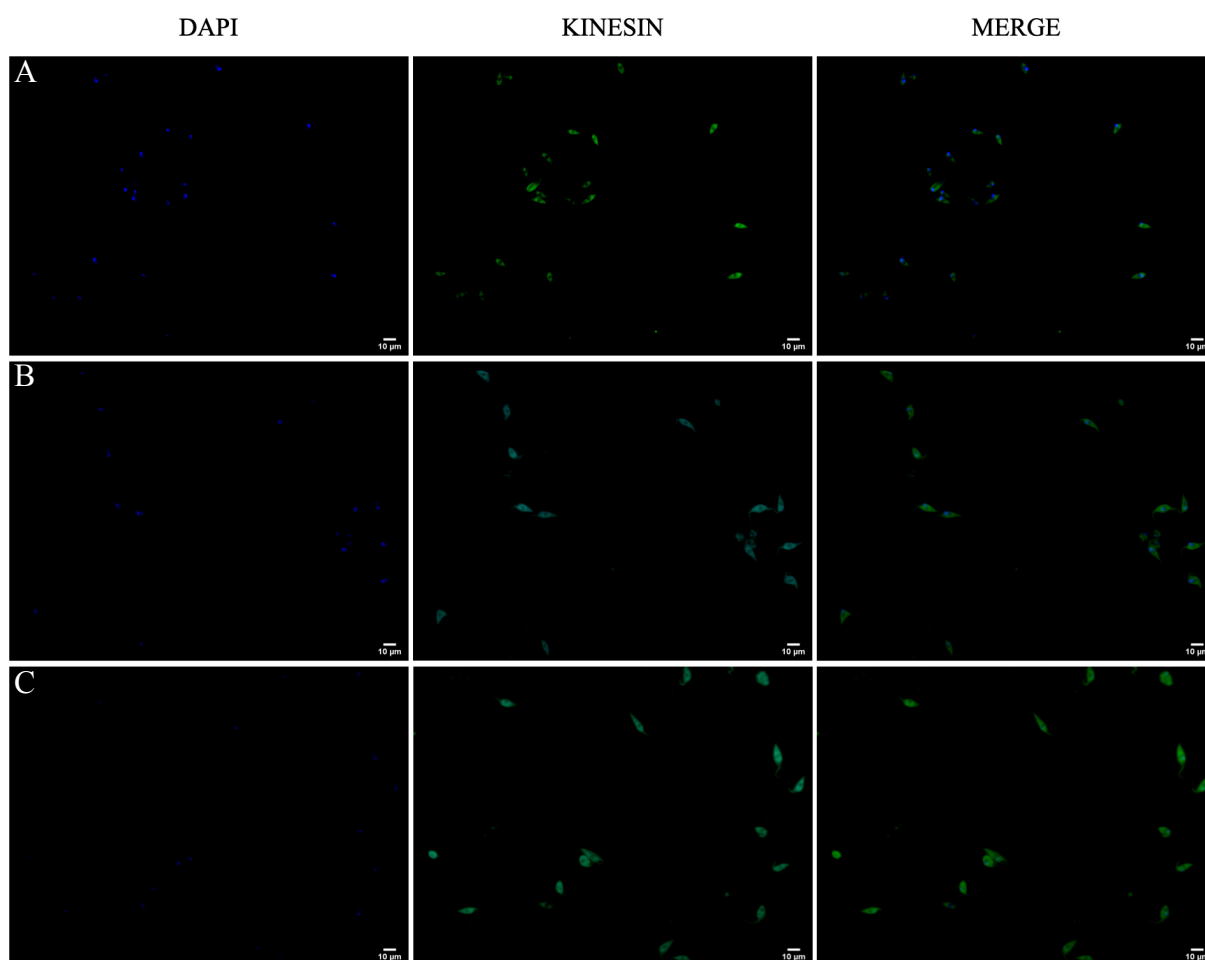


**Figura 27. Amplificação das seqüências mutagenizadas com códon de parada.** O controle são as seqüências amplificadas do gene completo, com 561pb. (M) Marcador molecular 100 bp ladder (Invitrogen). Gel de agarose 2,5% corado com EtBr.



**Figura 28. Curva de crescimento dos parasitos transfectados com sistema AMAXA 1.**  $1 \times 10^7$  parasitos foram transfectados com os sgRNAs 153 e 145\_revcom e seus respectivos cassetes de homologia. A contagem de parasitos foi feita em câmara de Neubauer.

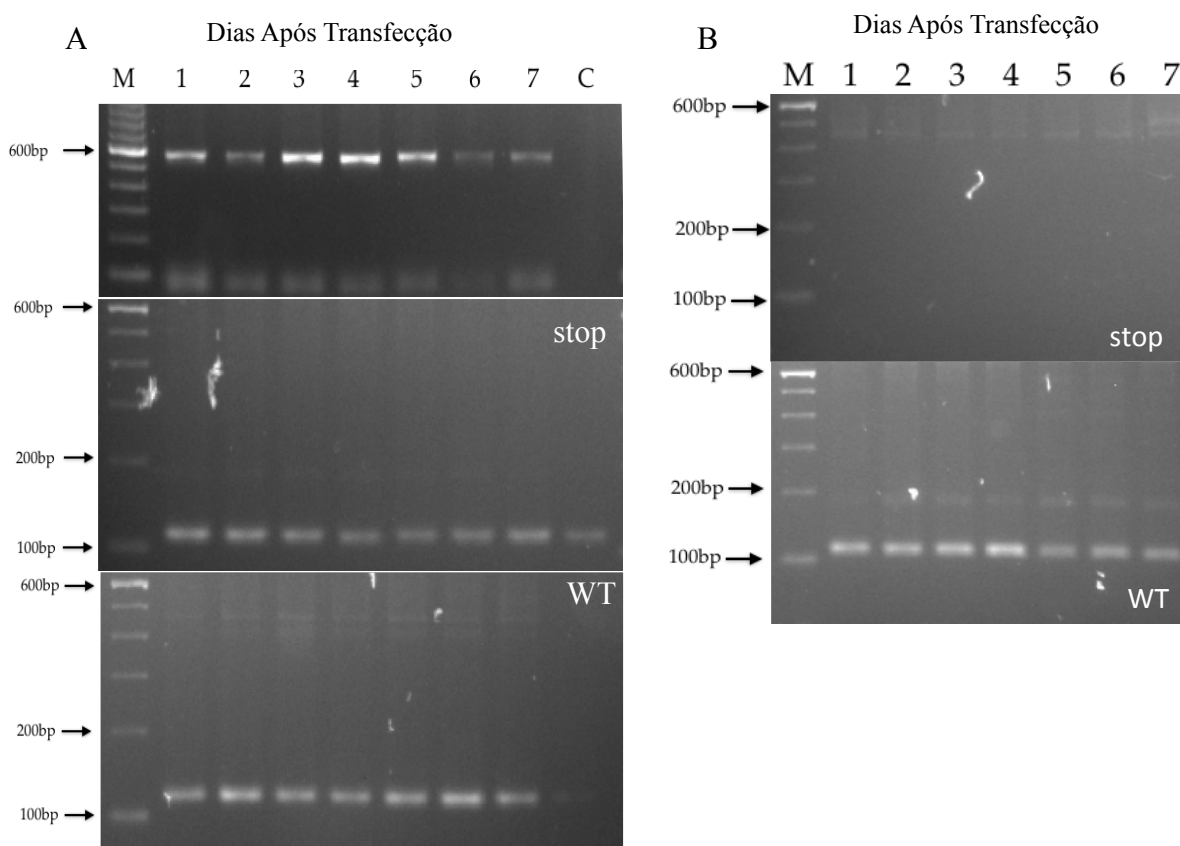
Além disso, parasitos também foram separados para análises de imunofluorescência para verificar mudanças morfológicas causadas pela mutação. Os parasitos foram incubados com anticorpos policlonais para kinesina seguido de incubação com anticorpo par IgG murino conjugado a Alexa fluor 488 para marcação de cinesina, proteína distribuída no corpo dos parasitos associado aos microtúbulos. Os parasitos também foram submetido a coloração com DAPI para visualização do núcleo e cinetoplasto. Nesse experimento não foi possível observar mudanças morfológicas em comparação com os parasitos controle (Figura 29). Com o anticorpo específico para TcCEN5 seria possível avaliar exatamente as mudanças morfológicas causadas pela depleção da TcCEN5.



**Figura 29. Análises de imunofluorescência dos  $1 \times 10^7$  parasitos transfetados.** (A) Sistema de sgRNA153; (B) Sistema sgRNA145\_revcom; (C) Parasitos controle transfetados com água. Escala 10 µm, imagem montada com o programa ImageJ.

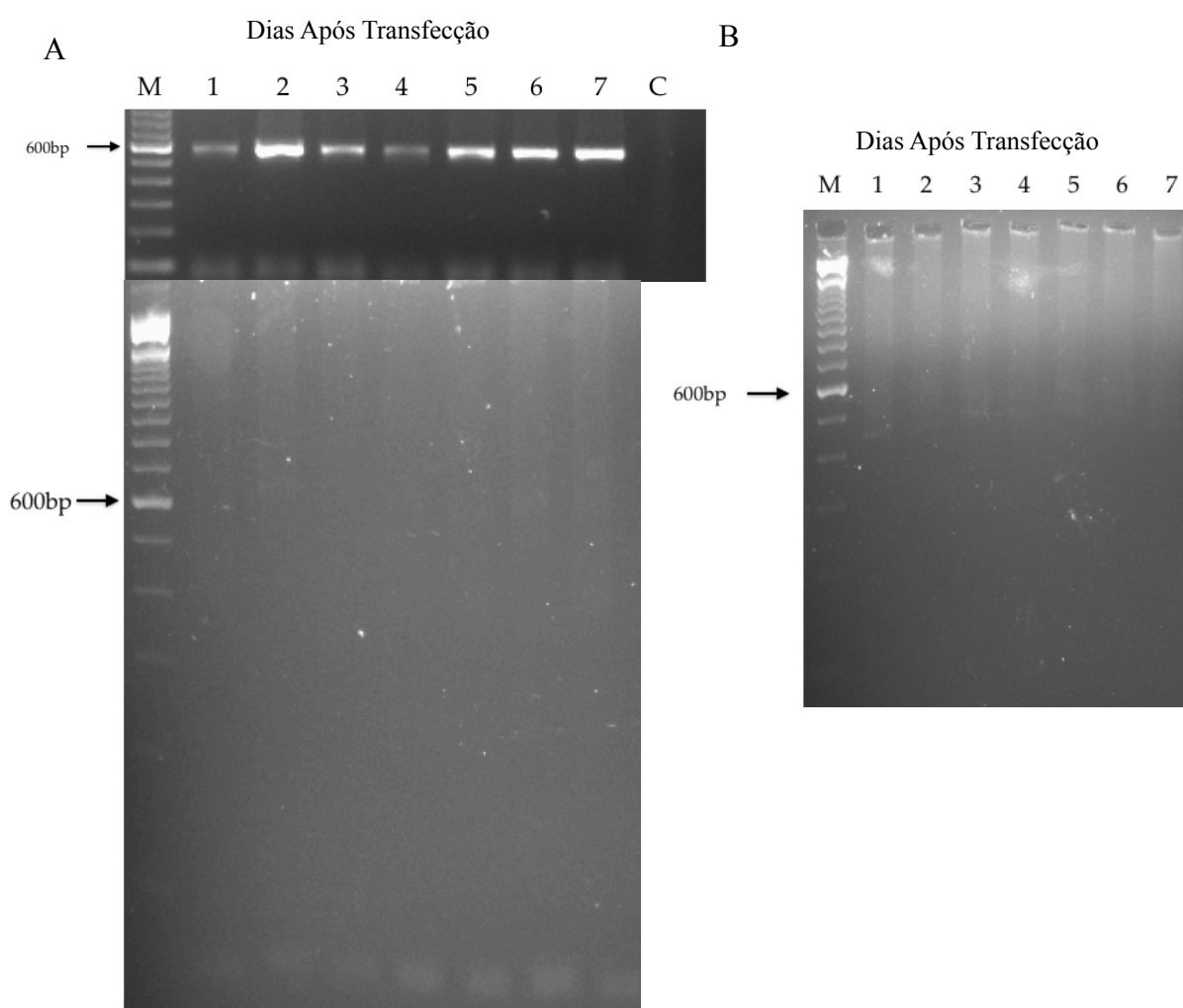
### 6.2.2.2 Transfecção 2

Na segunda transfecção realizada, foram utilizados  $5 \times 10^6$  parasitos de acordo com o protocolo de PENG *et al.* (2015). Essa estratégia foi utilizada, pois já havia sido utilizada para a transfecção de *Trypanosoma cruzi* com o sistema AMAXA, o mesmo utilizado nesse trabalho. Para melhorar a detecção da mutação, já que um menor número de parasitos foram utilizado, foi feita a PCR do tipo *Nested*. Após a extração, o DNA total foi submetido a uma primeira rodada de amplificação, que consistiu na obtenção do produto do gene TcCEN5. Depois, esse produto foi submetido a uma segunda PCR com os oligonucleotídeos que amplificam a sequência específicas da mutação e a sequência não mutada/selvagem. A inserção da mutação com códon de parada pode ser comprovada pelo produto das amplificações do sgRNA\_153 (Figura 30).



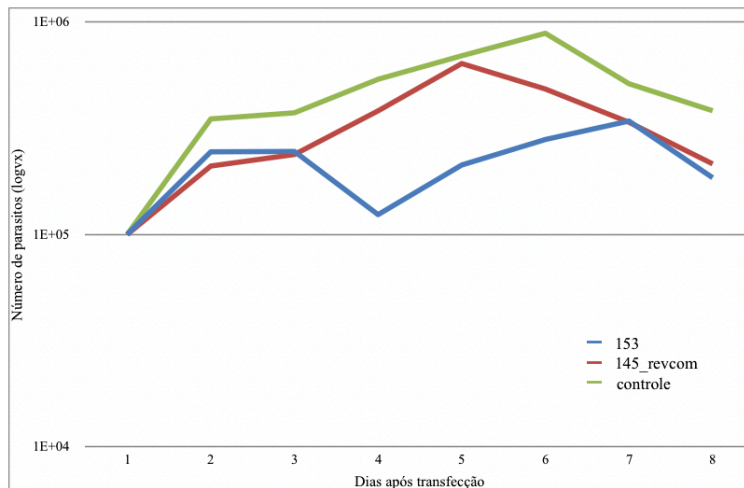
**Figura 30. Nested PCR dos oligonucleotídeos específicos para sgRNA\_153.** (A) Primeira reação da PCR dos parasitos mutados, seguida das reações específicas com o primer para stop códon e para a selvagem (WT); (B) Reações de nested PCR para os parasitos transfectados com água, controle. (M) Marcador 1kbPlus Ladder (Invitrogen). Gel de agarose 2,5% corado com EtBr.

Para o RNA guia sgRNA\_145\_revcom, a amplificação não pôde ser observada com os oligonucleotídeos específicos (Figura 31). Isso pode ser relacionado tanto ao número de parasitos submetidos à extração do DNA genômico, como também a uma menor eficiência do cassete de homologia em promover a mutação dos parasitos. Para melhorar a detecção dessa mutação, sugere-se que seja feita PCR em tempo real que tem maior sensibilidade durante os ciclos de amplificação.



**Figura 31. Nested PCR dos oligonucleotídeos específicos para sgRNA\_145\_revcom.** (A) Primeira reação da Nested PCR dos parasitos mutados, seguida das reações específicas com o primer para stop códon; (B) Reações de Nested PCR para os parasitos transfectados com água, controle. (M) Marcador 1kbPlus Ladder (Invitrogen). Gel de agarose 2,5% corado com EtBr.

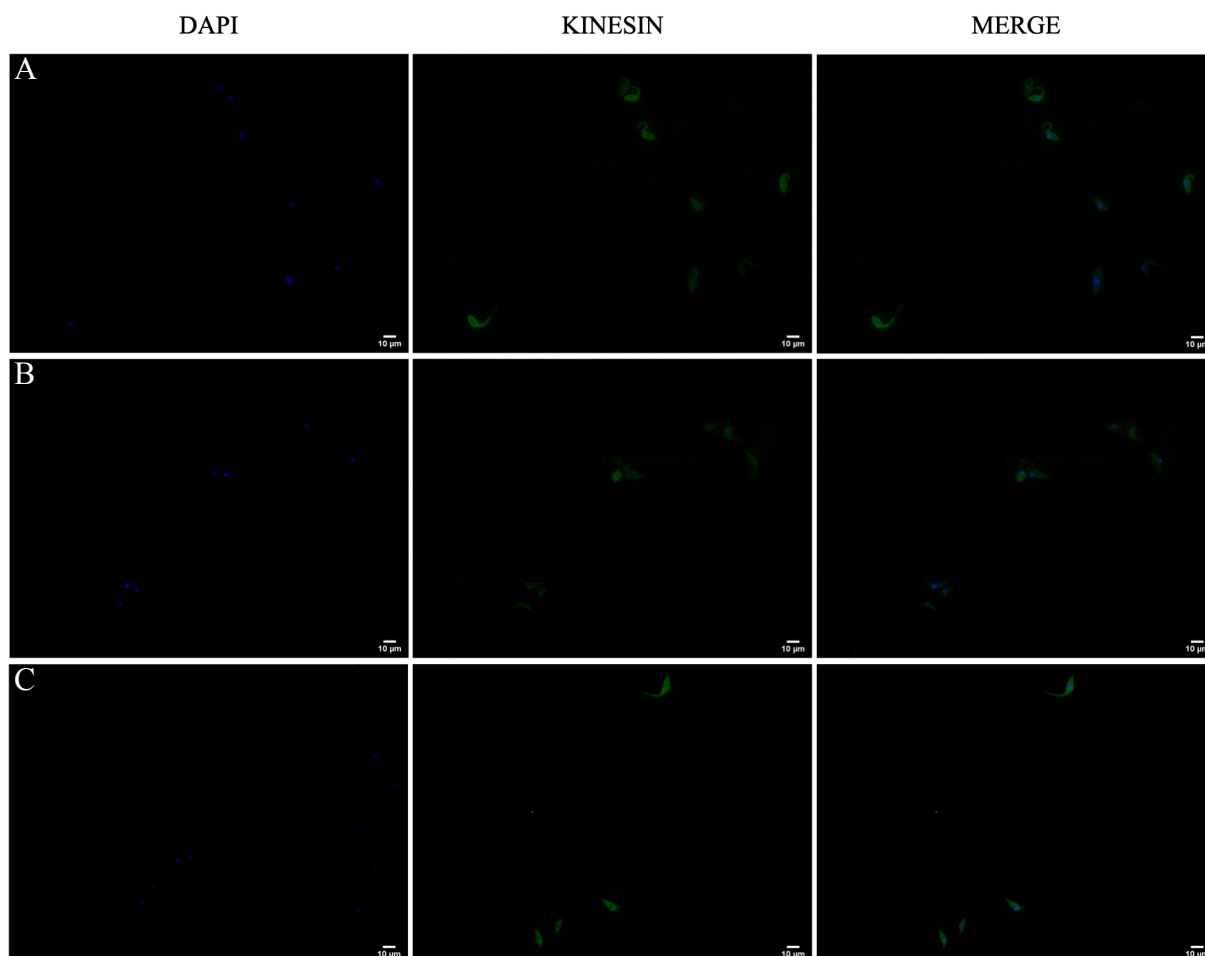
Após análise da inserção da sequência de códons de parada, foi realizada a contagem dos parasitos com o propósito de verificar se a mutação provocou alteração no crescimento dos parasitos mutados (Figura 32). Cada sistema de transfecção obedeceu um padrão diferente. Os parasitos transfectados com o sistema TcCEN5\_145\_revcom e os parasitos do controle negativo não tiveram decaimentos em número nos primeiros dias. Enquanto os parasitos transfectados com o sistema TcCEN5\_153 tiveram uma diminuição do número de parasitos entre o terceiro e quarto dia, tanto o sistema 145\_revcom como o controle tiveram aumento no número de células. Após o quinto dia, todos os sistemas voltaram a aumentar em número de células, mas após o oitavo dia todos os parasitos diminuiram em número e eventualmente todas as culturas morreram. Esse comportamento pode ser explicado pelo menor número de parasitos em cultura e instabilidade dos métodos de cultivo, já que o mesmo padrão foi observado também pelos parasitos controle. Em suma, os parasitos transfectados com o sistema sgRNA 153 apresentou um crescimento retardado quando comparado com os parasitos controles.



**Figura 32. Curva de crescimento dos parasitos transfectados com sistema AMAXA 2.**  $5 \times 10^6$  parasitos foram transfectados com os sgRNAs 153 e 145\_revcom e seus respectivos cassetes de homologia. A contagem de parasitos foi feita em câmara de Neubauer.

Além disso, para a análise morfológica desses parasitos também foi feito imunofluorescência das células dessa transfecção (Figura 33). Em comparação com os resultados de imunofluorescência anteriores, os parasitos também não apresentaram mudanças morfológicas.





**Figura 33. Análises de imunofluorescência dos  $5 \times 10^6$  parasitos transfectados.** (A) Sistema de sgRNA153; (B) Sistema sgRNA145\_revcom; (C) Parasitos controle transfectados com água. Escala 50  $\mu\text{m}$ , imagem montada com o programa ImageJ.

As curvas de crescimento dos parasitos transfectados possuem padrões de crescimento diferentes. Esses padrões podem ser explicados pela quantidade de parasitos utilizados ou pela qualidade e manutenção das culturas. Porém TcCEN5 aparentemente não é uma proteína essencial para sobrevivência do parasito. SHAN *et al.* (2019) propôs que TbCEN5 interage com TbCEN1, TbCEN3 e TbCEN4. Essas proteínas já foram caracterizadas anteriormente. A TbCEN1 e TbCEN4 foram localizadas no corpo basal e correlacionada à citocinese (HE *et al.*, 2005; SHI *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2012); a TbCEN3, localizada no flagelo e relacionada à mobilidade (WEI *et al.*, 2014). Como *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei* são organismos relacionados evolutivamente, as proteínas TcCEN5 e TbCEN5 são provavelmente

proteínas homólogas e podem exercer a mesma função (EL-SAYED *et al.*, 2005). Dessa forma, é possível especular que TcCEN5 também possa interagir com as outras Centrininas. Assim, quando há depleção de TcCEN5, possivelmente as outras Centrininas podem suprir a função perdida dessa proteína (NOWAK *et al.*, 1997; KAFRI *et al.*, 2009).

Além disso, a TcCEN5 parece não causar mudanças morfológicas no parasito assim como as outras centrininas descritas como LdCENp (SELVAPADIYAN *et al.*, 2001) e TbCEN5 (SHAN *et al.*, 2019). O estudo anterior que reduziu a expressão de TbCEN5 com RNAi também não obteve resultados quando a mudança morfológica e de motilidade dos parasitos (SHAN *et al.*, 2019); dessa forma, os resultados obtidos nesse trabalho corroboram para que o silenciamento da TcCEN5 não causa mudanças morfológicas em parasitos mutados. Como não foi verificado se TcCEN5 diminuiu a nível proteico, talvez por mais que o gene tenha sido deletado, há uma alta quantidade de TcCEN5 já traduzida e ela seja estável ou sofre pouca reciclagem. Seria interessante sintetizar um anticorpo específico para flagelo ou para a própria TcCEN5, já que SHAN *et al.* (2019) constatou que TbCEN5 é enriquecida no flagelo e no núcleo; assim, essas análises possibilitariam a investigação da localização e da expressão de TcCEN5 durante os diferentes formas biológicas e também os efeitos reais da depleção da centrina5 em *Trypanosoma cruzi*. Além disso, estudos de mobilidade celular e a duplicação do flagelo podem ser realizados para confirmar a ligação da TcCEN5 ao flagelo.

Outros autores também descreveram os papeis das Centrininas associadas a fibras contráteis e a duplicação e divisão de organelas (HE *et al.*, 2005; WEI *et al.*, 2014). Dessa forma é interessante a continuação dos estudos com as Centrininas, principalmente as consequências da deleção da TcCEN5, que é uma proteína única de tripanossomatídeos.

## 7. CONCLUSÕES

O modelo tridimensional proposto por esse trabalho parece ser próximo a conformação real da proteína. A TcCEN5 é evolutivamente mais próxima a TcCEN1 e TcCEN3 e elas podem compartilhar funções biológicas. Ao ser comparada evolutivamente com as Centrininas de *Homo sapiens*, a TcCEN5 torna-se um grupo externo divergente, ou seja, são proteínas distantes e logo, TcCEN5 ainda pode ser estudada para que se torne um alvo farmacológico. Apesar da confirmação da mutação, os parasitos não apresentaram mudança morfológica em comparação aos parasitos do grupo controle.

## 8. PERSPECTIVAS

A produção heteróloga da proteína TcCEN5 permitirá análises bioquímicas e biofísicas da proteína. Como em SHAN *et al.*, em que foi possível mensurar a quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  que se liga a proteína e as interações entre outras proteínas Centrininas. A produção de anticorpos é essencial para a imunolocalização (SHIEBEL e BORNERS, 1995), a análise por *western-blot*, quantificação da proteína quando submetida a edição gênica por CRISPR/Cas9 com anticorpos conjugados (PENG *et al.*, 2014).

Novos experimentos co CRISPR/Cas9 devem ser realizados em triplicatas. Com a produção do anticorpo anti-TcCEN5 será possível avaliar as possíveis mudanças morfológicas causadas pela deleção do gene TcCEN5.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**Addgene: CRISPR Guide.** Disponível em: <<http://www.addgene.org/guides/crispr/>>. Acesso em: 4 mar. 2020.

ANDRADE, D. V.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, p. e3010, 31 jul. 2014.

ANTINORI, S.; GALIMBERTI, L.; BIANCO, R.; GRANDE, R.; GALLI, M.; CORBELLINO, M. Chagas disease in Europe: A review for the internist in the globalized world. **European Journal of Internal Medicine**, v. 43, p. 6–15, set. 2017.

ALARCÓN DE NOYA, B.; DÍAZ-BELLO, Z.; COLMENARES, C.; RUIZ-GUEVARA, R.; MAURIELLO, L.; ZAVALA-JASPE, R; ... RIVAS, L. Large Urban Outbreak of Orally Acquired Acute Chagas Disease at a School in Caracas, Venezuela. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n. 9, p. 1308–1315, 1 maio 2010.

ALARCÓN DE NOYA, B.; NOYA GONZÁLEZ, O. Orally Transmitted Chagas Disease: Biology, Epidemiology, and Clinical Aspects of a Foodborne Infection. In: ALTICHEH, J. M.; FREILIJ, H. (Eds.). **Chagas Disease**. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 225–241.

ALBA SOTO, C. D.; GONZÁLEZ CAPPA, S. M. *Trypanosoma cruzi* Journey from the Insect Vector to the Host Cell. In: ALTICHEH, J. M.; FREILIJ, H. (Eds.). **Chagas Disease**. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 25–59.

ALBAJAR-VINAS, P.; JANSA, J. M.; CARLIER, Y.; SALAMANCA, D. D.; ANGHEBEN, A.; BARTOLONI, A.; SEIXAS, J.; VAN GOOL, T.; CANAVATE, C.; FLORES-CHAVEZ, M.; JACKSON, Y. J. ; CHIODINI, P. L.; et al. Chagas disease in European countries: the challenge of a surveillance system. **Euro Surveillance**, v. 16, n. 37, 2011.

ALLISON, M.; SALO, W.; MADDEN, M.; STREITZ, J.; BUIKSTRA, J.; GUHL F.; ARRIAZA, B.; RENIER, C.; WITTMERS, L. E.; FORNACIARI, G.; ALLISON, M. A 9,000-year record of Chagas' disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 7, p. 2034–2039, 17 fev. 2004.

BABINI, E.; BERTINI, I.; CAPOZZI, F.; LUCHINAT, C.; QUATTRONE, A.; TURANO, M. Principal Component Analysis of the Conformational Freedom within the EF-Hand Superfamily. **Journal of Proteome Research**, v. 4, n. 6, p. 1961–1971, dez. 2005.

BARBOSA-FERREIRA, J. M.; DE OLIVEIRA GUERRA, J. A.; DE SANTANA FILHO, F. S.; MARIA, B.; MAGALHÃES, L.; COELHO, L. I.; BARBOSA, M. D. G. V. Acometimiento Cardíaco en Casos de Enfermedad de Chagas Aguda de la Amazonía. **Arq Bras Cardiol**, v. 94, n. 6, p. e93-e95, 2010.

BASILE, L.; JANSA, J. M.; CARLIER, Y.; SALAMANCA, D. D.; ANGHEBEN, A.; BARTOLONI, A.; SEIXAS, J.; VAN GOOL, T.; CANAVATE, C.; FLORES-CHAVEZ, M.; JACKSON, Y. J.; CHIODINI, P. L.; ALBAJAR-VINAS, P. Chagas disease in European countries: the challenge of a surveillance system. **Euro Surveillance**, v. 16, n. 37, 2011.

BRANDÃO et al 2015 DESCRIÇÃO DE FOCOS RESIDUAIS DE TRIATOMA INFESTANS (KLUG, 1834) NO MUNICÍPIO DE NOVO HORIZONTE, BAHIA

BRITTO C. ;MOREIRAO. Diagnóstico molecular da doença de Chagas. Portal da doença de Chagas. 2017. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/diagnostico/#>> Acesso em: 4 mar. 2020.

CALDERANO, S. G.; MORETTI, N. S.; ARAUJO, C.; DA SILVA, M. S.; DE JESUS, T. C. L.; DE LIMA, L. P. O.; LOPES, M. C.; AUGUSTO, L. S.; DA CUNHA, J. P. C.; ELIAS, M. C.; SCHENKMAN, S. The cellular organization of Trypanosomatids during life cycle. In:

SILVA, M. S.; CANO, M. I. **Molecular and cellular biology of pathogenic trypanosomatids**. São Paulo, 2017. Cap.1, p.3-60.

CARDOSO, G., M. Comparative analysis of cell phenotypes in different severe clinical forms of Chagas' disease. **Frontiers in Bioscience**, v. 11, n. 1, p. 1158, 2006.

CARLOS PINTO DIAS, J. et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 21, p. 1–10, jun. 2016.

CARVALHO, T. U., Estudo Microscopia Óptica, Portal da Doença de Chagas, 2017. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/organizacao-estrutural/>>. Acesso em: 29 de maio de 2020.

CASTRO, E. Chagas' disease: lessons from routine donation testing. **Transfusion Medicine**, v. 19, n. 1, p. 16–23, 2009.

**CDC - Chagas Disease - Epidemiology & Risk Factors**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>>. Acesso em: 2 fev. 2019.

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**, v. 1, n. 2, p. 159–218, ago. 1909.

CHAO, C.; LEONE, J. L.; VIGLIANO, C. A. Chagas disease: Historic perspective. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 5, p. 165689, 1 maio 2020.

CHATELAIN, E. Chagas disease drug discovery: toward a new era. **Journal of biomolecular screening**, v. 20, n. 1, p. 22–35, jan. 2015.

CHIARI, E. et al. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 22, n. 1, p. 19–23, mar. 1989.

CLAYTON, J. Chagas disease 101. **Nature**, v. 465, n. 7301, p. S4–S5, jun. 2010

**CRISPR/Cas9 Genome Editing Transfection Reagents - ozbiosciences**. Disponível em: <<https://www.ozbiosciences.com/content/58-transfection-reagents-for-genome-editing>>.

Acesso em: 4 mar. 2020.

CONG, L.; ANN RAN, F.; COX D.; LIN S.; BARRETTO R.; HABIB N.; HSU P. D.; WU X.; JIANG W.; MARRAFFINI L. A.; ZHANG F., Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. **Science**. February v.15, n.339(6121), p.819–823, 2013.

CONG, L.; ZHANG, F. Genome Engineering Using CRISPR-Cas9 System. In: PRUETT-MILLER, S. M. (Ed.). . **Chromosomal Mutagenesis**. New York, NY: Springer New York, 2015. v. 1239p. 197–217.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, n. n7301\_suppl, p. S6–S7, 24 jun. 2010.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A.; JUNQUEIRA, A. Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 109, n. 7, p.856-862, nov. 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0074-0276140236>.

CUI, Y. et al. Review of CRISPR/Cas9 sgRNA Design Tools. **Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences**, v. 10, n. 2, p. 455–465, jun. 2018.

DAROCHA, W. D.; SILVA, R. A.; BARTHOLOMEU, D.C. ; PIRES, S. F.; FREITAS, J. M.; MACEDO, A. M.; VAZQUEZ, M. P.; LEVIN, M. J.; TEIXEIRA, S. M. R. Expression



of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. **Parasitology Research**, v. 92, n. 2, p. 113–120, 1 jan. 2004.

DE LANA, M.; MACHADO, E. M. DE M. 14 - Biology of *Trypanosoma cruzi* and Biological Diversity. In: TELLERIA, J.; TIBAYRENC, M. (Eds.). **American Trypanosomiasis**. London: Elsevier, 2010. p. 339–363.

DA SILVA COSTA, Antônio Jaques et al. *Trypanosoma cruzi*: A IMPORTÂNCIA DA PREVENÇÃO E O TRATAMENTO. **Mostra Científica da Farmácia**, v. 5, 2019.

DEVOS, D. P.; GRÄF, R.; FIELD, M. C. Evolution of the nucleus. **Current Opinion in Cell Biology**, Cell nucleus. v. 28, p. 8–15, 1 jun. 2014.

DIAS, J. P. et al. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 3, p. 296–300, jun. 2008.

DIAS, J. C. P. Human Chagas Disease and Migration in the Context of Globalization: Some Particular Aspects. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2013, 2013.

DOCAMPO, R.; HUANG, G. Calcium signaling in trypanosomatid parasites. **Cell calcium**, v. 57, n. 3, p. 194–202, mar. 2015.

DROZDETSKIY, A. et al. JPred4: a protein secondary structure prediction server. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W389–W394, 1 jul. 2015.

EL-GEBALI, S. et al. The Pfam protein families database in 2019. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D427–D432, 8 jan. 2019.

EL-SAYED, N. M. et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science (New York, N.Y.)**, v. 309, n. 5733, p. 409–415, 15 jul. 2005.

FERNANDES, A. et al. Pre-Columbian Chagas disease in Brazil: *Trypanosoma cruzi* I in the archaeological remains of a human in Peruaçu Valley, Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 514–516, ago. 2008.

ECHEVERRÍA, L. E. et al. Efficacy of the Benznidazole+Posaconazole combination therapy in parasitemia reduction: An experimental murine model of acute Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, 2020.

EL-GEBALI, S. et al. The Pfam protein families database in 2019. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D427–D432, 8 jan. 2019.

EL-SAYED, N. M. Comparative Genomics of Trypanosomatid Parasitic Protozoa. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 404–409, 15 jul. 2005.

ENEZ, V.D.; HENRIQUEZ, C.I. Chagasic megacolon in Venezuela – case report. **Journal of Coloproctology**, p. S2237936319301261, out. 2019.

ERRABOLU, R.; SANDERS, M. A.; SALISBURY, J. L. Cloning of a cDNA encoding human centrin, an EF-hand protein of centrosomes and mitotic spindle poles. **Journal of Cell Science**, v. 107 ( Pt 1), p. 9–16, 1994.

FERNANDES, A. et al. Pre-Columbian Chagas disease in Brazil: *Trypanosoma cruzi* I in the archaeological remains of a human in Peruaçu Valley, Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 514–516, ago. 2008.

FERREIRA, I. DE L. M.; SILVA, T. P. T. E. Eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* no Brasil: um fato histórico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 5, p. 507–509, out. 2006.

FILARDY, A. A.; GUIMARÃES-PINTO K.; NUNES M.P.; ZUKERAM K.; FLIESS L.; PEREIRA L.; OLIVEIRA NASCIMENTO D.; CONDE. L.; MORROT A. Human

Kinetoplastid Protozoan Infections: Where Are We Going Next? **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1493, 2018.

FREILIJ, H. Chagas Disease: Past, Present, and Future. In: ALTSCHEH, J. M.; FREILIJ, H. (Eds.). . **Chagas Disease**. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 3–22.

GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M.-J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta Tropica**, Chagas disease: 100 years of the discovery and beyond. v. 115, n. 1, p. 22–27, 1 jul. 2010.

GLUENZ, E. et al. Functional characterization of cohesin subunit SCC1 in *Trypanosoma brucei* and dissection of mutant phenotypes in two life cycle stages. **Molecular Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 666–680, ago. 2008

GOFFEAU, A. et al. Life with 6000 Genes. *Science*, v. 274, n. 5287, p. 546–567, 25 out. 1996.

GOGENDEAU, D.; KLOTZ C.; ARNAIZ, O.; MALINOWSKA, A.; DADLEZ, M.; DE LOUBRESSE, N. G.; RUIZ, F.; KOLL, F.; BEISSON, J. Functional diversification of centrins and cell morphological complexity. **Journal of Cell Science**, v. 121, n. 1, p. 65–74, 1 jan. 2008.

GOMES, Y. DE M. **Diagnóstico laboratorial – situação atual**. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/diagnostico/>>. Acesso em: 19 dez. 2019.

GOURBIÈRE, S. et al. Genetics and evolution of triatomines: from phylogeny to vector control. **Heredity**, v. 108, n. 3, p. 190–202, mar. 2012.

HE, C. Y.; PYPART, M.; WARREN, G. Golgi Duplication in *Trypanosoma brucei* Requires Centrin2. **Science**, v. 310, n. 5751, p. 1196–1198, 18 nov. 2005.

HELER, R. et al. Cas9 specifies functional viral targets during CRISPR–Cas adaptation. **Nature**, v. 519, n. 7542, p. 199–202, mar. 2015.

HOARE, C. A. Studies on *Trypanosoma grayi* . III. Life-Cycle in the Tsetse-fly and in the Crocodile. **Parasitology**, v. 23, n. 4, p. 449–484, out. 1931.

HORSTICK, O.; TOZAN, Y.; WILDER-SMITH, A. Reviewing Dengue: Still a Neglected Tropical Disease? **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 4, p. e0003632, 30 abr. 2015.

HORVATH, P.; BARRANGOU, R. CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea. **Science**, v. 327, n. 5962, p. 167–170, 8 jan. 2010.

HU, K. et al. Cytoskeletal Components of an Invasion Machine—The Apical Complex of *Toxoplasma gondii*. **PLoS Pathogens**, v. 2, n. 2, p. e13, 24 fev. 2006.

INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**, v. 96, n. 1, p. 23–28, 1 jan. 1990.

IVENS, Alasdair C.; PEACOCK, Christopher S.; WORTHEY, Elizabeth A.; *et al.* The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* (New York, N.Y.), v. 309, n. 5733, p. 436–442, 2005.

JACKSON, Y.; PINTO, A.; PETT, S. Chagas disease in Australia and New Zealand: risks and needs for public health interventions. **Tropical Medicine & International Health**, v. 19, n. 2, p. 212–218, fev. 2014.

JANSEN, A. M.; ROQUE, A. L. R.; XAVIER, S. C. C. 12 - *Trypanosoma cruzi* enzootic cycle: General aspects, domestic and synanthropic hosts and reservoirs. In: TELLERIA, J.; TIBAYRENC, M. (Eds.). **American Trypanosomiasis Chagas Disease (Second Edition)**. London: Elsevier, 2017. p. 265–282

KAFRI, R.; SPRINGER, M.; PILPEL, Y. Genetic Redundancy: New Tricks for Old Genes. **Cell**, v. 136, n. 3, p. 389–392, fev. 2009.

KELLEY, L. A. et al. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature Protocols**, v. 10, n. 6, p. 845–858, jun. 2015.

KELLY, S.; IVENS, A.; MANNA, P. T.; *et al.* A draft genome for the African crocodilian trypanosome *Trypanosoma grayi*. **Scientific Data**, v. 1, n. 1, p. 140024, 2014.

KIRCHHOFF, L.V. Chagas Disease (American Trypanosomiasis): Background, Pathophysiology, Epidemiology. **Medscape reference. Drugs, Diseases & procedures**, 16 set. 2018.

KOONIN, E. V.; MAKAROVA, K. S. CRISPR-Cas: an adaptive immunity system in prokaryotes. **F1000 Biology Reports**, 2009.

KOUMANDOU, V. L.; WICKSTEAD, B.; GINGER, M. L.; VAN DER GIEZEN, M.; DACKS, J. B.; FIELD, M. C. Molecular paleontology and complexity in the last eukaryotic common ancestor. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 48, n. 4, p. 373–396, 1 jul. 2013.

KUMAR, S. et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 1 jun. 2018.

LARKIN, M. A. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947–2948, 1 nov. 2007.

LEE, V D; HUANG, B. Molecular cloning and centrosomal localization of human caltractin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 23, p. 11039–11043, 1993.

LEVINE, N. D. et al. A Newly Revised Classification of the Protozoa\*: THE COMMITTEE ON SYSTEMATICS EVOLUTION OF THE SOCIETY OF PROTOZOLOGISTS †. **The Journal of Protozoology**, v. 27, n. 1, p. 37–58, fev. 1980.

LEWIS, M. D. et al. Bioluminescence imaging of chronic *Trypanosoma cruzi* infections reveals tissue-specific parasite dynamics and heart disease in the absence of locally persistent infection. **Cellular Microbiology**, v. 16, n. 9, p. 1285–1300, 2014.

LUQUETTI, A. O.; SCHMUÑIS, G. A. Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. In: **American Trypanosomiasis Chagas Disease**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 687–730.

MADEDDU, L. et al. Characterization of Centrin Genes in *Paramecium*. **European Journal of Biochemistry**, v. 238, n. 1, p. 121–128, 1996.

MEDEIROS, M. B. DE; GUERRA, J. A. DE O.; LACERDA, M. V. G. DE. Meningoencefalite em paciente com doença de Chagas aguda na Amazônia Brasileira. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, n. 5, p. 520–521, out. 2008.

MARTINS-MELO, F. R. et al. Prevalence of Chagas disease in Brazil: A systematic review and meta-analysis. **Acta Tropica**, v. 130, p. 167–174, 1 fev. 2014.

MARTINS-MELO, F. R. et al. Burden of Chagas disease in Brazil, 1990–2016: findings from the Global Burden of Disease Study 2016. **International Journal for Parasitology**, v. 49, n. 3, p. 301–310, 1 mar. 2019.

MATSUDA, N. M.; MILLER, S. M.; EVORA, P. R. B. The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas disease. **Clinics**, v. 64, n. 12, p. 1219–1224, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Panorama da doença de Chagas no Brasil. **Boletim epidemiológico**. v.50, n. 36, p. 1-14, nov. 2019.

MOLINA, I.; SALVADOR, F.; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A. The use of posaconazole against Chagas disease: **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 28, n. 5, p. 397–407, out. 2015.

MOTTRAM, L. Protocols for handling and working with leishmania species (working with *Leishmania for dummies*); 2008.

NISHIMASU, H. et al. Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA. **Cell**, v. 156, n. 5, p. 935–949, 27 fev. 2014.

NÓBREGA, A. A. et al. Oral Transmission of Chagas Disease by Consumption of Açaí Palm Fruit, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 653–655, abr. 2009.

NOWAK, M. A. et al. Evolution of genetic redundancy. **Nature**, v. 388, n. 6638, p. 167–171, jul. 1997.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Consultation on International Biological Reference Preparations for Chagas Diagnostic Tests. Geneva: World health Organisation., 2007

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de Chagas aguda transmitida por alimentos. Rio de Janeiro: PANAFTOSA-VP/OPAS/OMS, 2009. 92 p.: il. (Serie de Manuais Técnicos, 12).

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). WHO Consultation on Commutability of WHO Biological Reference Preparations for In Vitro Detection of Infectious Markers. Geneva: World Health Organization., 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Integrating neglected tropical diseases into global health and development: fourth WHO report on neglected tropical diseases. Geneva: World health organization., 2017.

OSTERMAYER, A. L. **História dos métodos de diagnóstico para a doença de Chagas.** Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/diagnostico/>>. Acesso em: 19 dez. 2019.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). 68th SESSION OF THE REGIONAL COMMITTEE OF WHO FOR THE AMERICAS. RESOLUTION. Set, 2016.

PÉREZ-SILANES, S; PAUCAR, R.; MORENO-VIGURI, E.; Challenges in Chagas Disease Drug Discovery: A Review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 28, p. 3154–3170, 13 out. 2016

PEACOCK, Christopher S.; SEEGER, Kathy; HARRIS, David; *et al.* Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nature Genetics*, v. 39, n. 7, p. 839–847, 2007.

PEDRIQUE, B. et al. The drug and vaccine landscape for neglected diseases (2000–11): a systematic assessment. **The Lancet Global Health**, v. 1, n. 6, p. e371–e379, 1 dez. 2013.

PENG, D. et al. CRISPR-Cas9-Mediated Single-Gene and Gene Family Disruption in *Trypanosoma cruzi*. **mBio**, v. 6, n. 1, p. e02097-14, 27 fev. 2015.

PENG, D.; TARLETON, R. EuPaGDT: a web tool tailored to design CRISPR guide RNAs for eukaryotic pathogens. **Microbial Genomics**, v. 1, n. 4, 2015.

PEREIRA, K. S., SCHMIDT, F. L., GUARALDO, A. M. A., FRANCO, R. M. B., DIAS, V. L. and PASSOS, L. A. C. Chagas' Disease as a Foodborne Illness. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 2, p. 441-446 Fevereiro 2009

PINAZO, M.-J.; GASCON, J. The importance of the multidisciplinary approach to deal with the new epidemiological scenario of Chagas disease (global health). **Acta Tropica**, v. 151, p. 16–20, nov. 2015.



PORCEL, Betina M.; DENOEUDE, France; OPPERDOES, Fred; *et al.* The streamlined genome of *Phytomonas* spp. relative to human pathogenic kinetoplastids reveals a parasite tailored for plants. *PLoS genetics*, v. 10, n. 2, p. e1004007, 2014.

RAMOS, V.; CUBIDES, J.C.; OLIVEIRA, M. Políticas de Controle e Notificação da Doença de Chagas: enfrentando o silêncio epidemiológico com a notificação dos casos crônicos. 2018. Portal da doença de Chagas. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/controle-e-notificacao/>>. Acesso em: 04 de maio de 2020.

RAMANUJAM, V. et al. Protein structural changes characterized by high-pressure, pulsed field gradient diffusion NMR spectroscopy. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 312, p. 106701, mar. 2020.

RASSI, A. et al. Clinical Phases and Forms of Chagas Disease. In: **American Trypanosomiasis**. [s.l.] Elsevier, 2010. p. 709–741.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America, Tropical Diseases**. v. 26, n. 2, p. 275–291, 1 jun. 2012.

REPETTO, E. C. et al. Neglect of a Neglected Disease in Italy: The Challenge of Access-to-Care for Chagas Disease in Bergamo Area. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. e0004103, 25 set. 2015.

REQUENA-MÉNDEZ, A. et al. Health Policies to Control Chagas Disease Transmission in European Countries. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, p. e3245, 30 out. 2014.

REQUENA-MÉNDEZ, A. et al. Cost-effectiveness of Chagas disease screening in Latin American migrants at primary health-care centres in Europe: a Markov model analysis. **The Lancet Global Health**, v. 5, n. 4, p. e439–e447, 1 abr. 2017.

RIBEIRO JR., G. et al. Frequent House Invasion of *Trypanosoma cruzi*-Infected Triatomines in a Suburban Area of Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 4, 24 abr. 2015.

RICE, L. M.; AGARD, D. A. Centriole Duplication: Centrin in on Answers? **Current Biology**, v. 12, n. 18, p. R618–R619, 17 set. 2002.

SALISBURY, J. L. Centrin, centrosomes, and mitotic spindle poles. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 7, n. 1, p. 39–45, jan. 1995.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SÁNCHEZ, L. V.; RAMÍREZ, J. D. Congenital and oral transmission of American trypanosomiasis: an overview of physiopathogenic aspects. **Parasitology**, v. 140, n. 2, p. 147–159, fev. 2013.

SANTOS, S. S. et al. Searching drugs for Chagas disease, leishmaniasis and schistosomiasis: a brief review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, p. 105906, jan. 2020.

SCHIEBEL, E.; BORNENS, M. In search of a function for centrins. **Trends in Cell Biology**, v. 5, n. 5, p. 197–201, 1 maio 1995.

SCHOFIELD, C. J.; GALVÃO, C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. **Acta Tropica**, The Biology of Triatominae - Vectors of Chagas Disease. v. 110, n. 2, p. 88–100, 1 maio 2009.

SELVAPANDIYAN, A. et al. Centrin Gene Disruption Impairs Stage-specific Basal Body Duplication and Cell Cycle Progression in *Leishmania*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 24, p. 25703–25710, 11 jun. 2004.

SELVAPANDIYAN, A. et al. Centrin1 is required for organelle segregation and cytokinesis in *Trypanosoma brucei*. **Molecular Biology of the Cell**, v. 18, n. 9, p. 3290–3301, set. 2007.

SELVAPANDIYAN, A. et al. Role of Centrioles 2 and 3 in Organelle Segregation and Cytokinesis in *Trypanosoma brucei*. **PLOS ONE**, v. 7, n. 9, p. e45288, 21 set. 2012.

SHAN, F. et al. *Trypanosoma brucei* centrin5 is enriched in the flagellum and interacts with other centrioles in a calcium-dependent manner. **FEBS Open Bio**, v. 9, n. 8, p. 1421–1431, ago. 2019.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 14–21, jul. 2010.

SHI, J. et al. Centrin4 coordinates cell and nuclear division in *T. brucei*. **J Cell Sci**, v. 121, n. 18, p. 3062–3070, 15 set. 2008.

SILVA, M. S.; CANO, M. I. N. (2017). *Frontiers in Parasitology Volume 1: Molecular and Cellular Biology of Pathogenic Trypanosomatids*. Sharjah: Bentham Science Publishers Ltd. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=nlebk&AN=1483671&lang=pt-br&site=eds-live>

SMITH, K.; MARCOS, L. A. Pathogenesis of Chagas Disease: an Emphasis for Transplant Patient Populations. **Current Tropical Medicine Reports**, 11 jan. 2019.

SOUZA, W. DE; VIDAL, J. Microscopia eletrônica. **Portal Chagas**. 2017. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/organizacao-estrutural/>>. Acesso em: 22 mar. 2019.

SOUZA, A. R. Divisão celular do *Trypanosoma cruzi*: o papel da subunidade TcSCC1 do complexo coesina e das proteínas centrinas. 73fls. Dissertação de mestrado (Mestrado em Patologia Molecular). Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

SOUZA-LIMA, R. DE C. DE 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**, v. 46, n. 4, p. 510–514, 10 maio 2013.

STRASEN, J. et al. Epidemiology of Chagas disease in Europe: many calculations, little knowledge. **Clinical Research in Cardiology**, v. 103, n. 1, p. 1–10, 1 jan. 2014.

STROUT, R. G. A Method for Concentrating Hemoflagellates. **The Journal of Parasitology**, v. 48, n. 1, p. 100, fev. 1962.

TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731–2739, 1 out. 2011.

THURTTLE-SCHMIDT, D. M.; LO, T.-W. Molecular biology at the cutting edge: A review on CRISPR/CAS9 gene editing for undergraduates: A Review on CRISPR/CAS9 Gene Editing for Undergraduates. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 46, n. 2, p. 195–205, mar. 2018.

VALENTE, S. A. DA S. et al. Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 3, p. 291–297, mar. 2009.

VEERARAGHAVAN, S. et al. Structural Independence of the Two EF-hand Domains of Caltractin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 32, p. 28564–28571, 9 ago. 2002.

VIOTTI, R. et al. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 7, n. 2, p. 157–163, mar. 2009.

WANG, M.; GHEIRATMAND, L.; HE, C. Y. An interplay between Centrin2 and Centrin4 on the bi-lobed structure in *Trypanosoma brucei*: Function of TbCentrin4 in procyclic *T. brucei*. **Molecular Microbiology**, v. 83, n. 6, p. 1153–1161, mar. 2012.

WATERHOUSE, A. et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W296–W303, 2 jul. 2018.

WEI, Y. et al. Centrin3 in trypanosomes maintains the stability of a flagellar inner-arm dynein for cell motility. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 4060, set. 2014.

WIECH, H.; GEIER, B. M.; PASCHKE, T.; *et al.* Characterization of green alga, yeast, and human centrins. Specific subdomain features determine functional diversity. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 37, p. 22453–22461, 1996WIECH, H.; GEIER, B. M.;

WILDER-SMITH, A.; TOZAN, Y.; HORSTICK, O. Reviewing Dengue: Still a Neglected Tropical Disease? **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 4, p. e0003632, 30 abr. 2015.

**WHO | Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Disponível em: <<http://www.who.int/chagas/en/>>. Acesso em: 11 mar. 2020.

WRIGHT, R. L.; SALISBURY, J.; JARVIK, J. W. A nucleus-basal body connector in *Chlamydomonas reinhardtii* that may function in basal body localization or segregation. **The Journal of Cell Biology**, v. 101, n. 5, p. 1903–1912, 1 nov. 1985.

ZHANG, Y.; HE, C. Y. Centrins in unicellular organisms: functional diversity and specialization. **Protoplasma**, v. 249, n. 3, p. 459–467, jul. 2012.

ZHOU, Q. et al. A Comparative Proteomic Analysis Reveals a New Bi-Lobe Protein Required for Bi-Lobe Duplication and Cell Division in *Trypanosoma brucei*. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, p. e9660, 15 mar. 2010.