



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

**Implementação de um sistema de marcação proteômica organelar por proximidade
baseado em APEX2 para glicossomos e núcleos de tripanossomatídeos**

PAULA MARIAN VIEIRA GOULART

Brasília

2024

PAULA MARIAN VIEIRA GOULART

**Implementação de um sistema de marcação proteômica organelar por proximidade
baseado em APEX2 para glicossomos e núcleos de tripanossomatídeos**

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, para obtenção do título de
Mestre em Patologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau

Brasília

2024

PAULA MARIAN VIEIRA GOULART

**Implementação de um sistema de marcação proteômica organelar por proximidade
baseado em APEX2 para glicossomos e núcleos de tripanossomatídeos**

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, para obtenção do título de
Mestre em Patologia Molecular.

Brasília, 8 de fevereiro de 2024

BANCA EXAMINADORA

Sébastien Olivier Charneau (Orientador/Presidente)
Universidade de Brasília (UnB)

Carlos André Ornelas Ricart (Membro titular)
UnB

Clênia dos Santos Azevedo (Membro titular)
Ministério da Saúde

Lucas Silva de Oliveira (Suplente)
UnB

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas (LBQP) – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, com apoio financeiro do CNPq, CAPES e FAPDF, em parceria com o Muséum National d’Histoire Naturelle, Paris, França.

**Dedico este trabalho aos muitos que,
por circunstâncias diversas, foram
privados do acesso ao conhecimento
científico.**

"Dans la vie, rien n'est à craindre, tout est à comprendre."

- Marie Curie

AGRADECIMENTOS

É com imensa gratidão que dedico este espaço para agradecer àqueles que foram essenciais na minha jornada durante este mestrado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau, expresso minha profunda gratidão pela sua orientação excepcional, pelas oportunidades valiosas que me foram concedidas e pela confiança depositada em mim. Sou grata também pela amizade que construímos, pelas risadas compartilhadas e por todos os momentos marcantes e alegres que vivemos na França e no Brasil.

À Prof^a. Dr^a. Izabela Marques Dourado Bastos Charneau, agradeço imensamente pela sua orientação, sabedoria e amizade. Seus conselhos foram fundamentais para este trabalho, e sou imensamente grata por cada momento de aprendizado e cada conversa enriquecedora que compartilhamos.

Aos Professores do Muséum National d’Histoire Naturelle (MNHN), Philippe Grellier e Coralie Martin, pela liderança e orientação, que foram cruciais para o meu desenvolvimento acadêmico. Sou profundamente grata pelo acolhimento e apoio que recebi durante minha estadia em Paris.

Ao Dr. Frédéric Fercoq, cuja assistência nas imagens de imunofluorescência foi essencial para o avanço do meu trabalho.

A todos os docentes da UnB, do MNHN e da Sorbonne Université com os quais tive a oportunidade de aprender. O conhecimento compartilhado e as lições ministradas foram fundamentais para o meu crescimento acadêmico.

A todos os meus amigos e colegas, da Maison du Brésil, do MNHN, do LBQP e da vida, que compartilharam comigo momentos de alegria, descobertas e desafios - são tantos que, se fosse listar todos, correríamos o risco de transformar esta mensagem em um pequeno livro. Vocês tornaram essa jornada mais alegre e leve. Obrigada pelas incontáveis memórias que criamos juntos.

Às minhas irmãs, Rafaella Glice e Victória Tessa, pelo apoio emocional constante, mesmo à distância. Vocês foram meu refúgio nos momentos de saudade e incerteza.

Aos meus pais, Raquel Vieira e Sérgio Goulart, faltam palavras para expressar minha gratidão. O apoio e motivação que vocês me proporcionaram ao longo da minha vida foram o alicerce de todas as minhas conquistas. Sou eternamente grata pela educação, amor e valores que vocês me transmitiram.

Aos órgãos de fomento: CNPq, CAPES e FAPDF, pelo suporte financeiro que tornou possível a realização deste mestrado.

RESUMO

Os tripanossomatídeos, pertencentes à classe Kinetoplastida e incluindo os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*, são agentes causadores de doenças tropicais negligenciadas que impactam mais de 1,7 bilhão de pessoas em todo o mundo, conforme relatado pela OMS em 2023. Estes parasitos possuem características biológicas únicas, como organelas especializadas e núcleos com uma composição proteica peculiar, diferenciando-os notavelmente de outros eucariotos. Entre as organelas especializadas, o glicossomo se destaca pela diversidade de seu repertório enzimático, essencial para processos metabólicos como a via das pentoses-fosfato, gliconeogênese, via de salvamento de purina, β -oxidação de ácidos graxos e biossíntese de éter-lipídios, isoprenóides, esteróis e pirimidinas. As enzimas glicossomais, fundamentais nessas vias, são alvos promissores para o desenvolvimento de medicamentos. No entanto, até o momento, as análises do proteoma dessas organelas foram abordadas por meio de métodos convencionais de enriquecimento, que resultam em uma cobertura limitada das proteínas identificadas. Para superar essa limitação, os métodos de marcação por proximidade têm sido amplamente aplicados para o mapeamento proteômico de diferentes compartimentos subcelulares. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi elaborar uma estratégia de marcação de proximidade baseada em APEX2 para analisar a composição proteica dos glicossomos e do núcleo de *Leishmania infantum* e *Trypanosoma cruzi*. Inicialmente, procedemos com a clonagem da sequência da APEX2, que foi fusionada ao peptídeo de endereçamento glicossômico (PTS1) e ao sinal de localização nuclear (NLS), nos vetores pLEXY (*Leishmania*) e pTRES (*T. cruzi*), adquiridos comercialmente. Paralelamente, como controle, realizamos a clonagem da sequência de mNeonGreen, também fusionada aos mesmos peptídeos. Essa estratégia resultou na criação de um total de oito construções distintas. Após transfecção dos plasmídeos e seleção dos parasitos resistentes à marca de seleção, os diferentes clones foram avaliados quanto à sua expressão e atividade. Os resultados indicaram que as proteínas APEX2 estão abundantemente expressas nos extratos proteicos de ambos os parasitos transfectados com o cassete. Contudo, em relação às proteínas mNeonGreen, observou-se uma expressão reduzida nos extratos proteicos examinados. Adicionalmente, as proteínas APEX2-PTS1 e APEX2-NLS promoveram a biotinylation específica de proteínas nos glicossomos e no núcleo, respectivamente, em *L. infantum*. Esses resultados revelam a possível viabilidade da aplicação da APEX2 no contexto bioquímico de *L. infantum*. Como perspectiva, visamos validar a técnica em *T. cruzi* e realizar uma análise proteômica comparativa entre os dois organismos. Acreditamos que essa abordagem nos permitirá revelar mecanismos de adaptação metabólica empregados por esse grupo de parasitos, além de identificar possíveis alvos farmacológicos para o tratamento das doenças associadas a tripanossomatídeos.

Palavras-chave: *L. infantum*, *T. cruzi*, APEX2, glicossomos, núcleo, proteômica de organelas

ABSTRACT

The trypanosomatids, belonging to the Kinetoplastida class and including the genera *Trypanosoma* and *Leishmania*, are agents causing neglected tropical diseases that impact more than 1.7 billion people worldwide, as reported by the WHO in 2023. These parasites possess unique biological characteristics, such as specialized organelles and nuclei with a peculiar protein composition, distinctly differentiating them from other eukaryotes. Among the specialized organelles, the glycosome stands out for the diversity of its enzymatic repertoire, essential for metabolic processes such as the pentose phosphate pathway, gluconeogenesis, purine salvage, β -oxidation of fatty acids, and biosynthesis of ether lipids, isoprenoids, sterols, and pyrimidines. Glycosomal enzymes, fundamental in these pathways, are promising targets for drug development. However, to date, analyses of the proteome of these organelles have been approached through conventional enrichment methods, resulting in limited coverage of identified proteins. To overcome this limitation, proximity labeling methods have been widely applied for proteomic mapping of different subcellular compartments. Thus, the aim of this study was to develop a proximity labeling strategy based on APEX2 to analyze the protein composition of glycosomes and the nucleus of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma cruzi*. Initially, we proceeded with the cloning of the APEX2 sequence, which was fused to the glycosomal targeting peptide (PTS1) and the nuclear localization signal (NLS), in the vectors pLEXY (*Leishmania*) and pTREX (*T. cruzi*). Concurrently, as a control, we performed cloning of the NeonGreen sequence, also fused to the same peptides. This strategy resulted in the creation of a total of eight distinct constructs. After transfection of the plasmids and selection of resistant parasites, the different clones were evaluated for their expression and activity. The results indicated that the APEX2 proteins are abundantly expressed in the protein extracts of both parasites transfected with the cassette. However, in relation to the mNeonGreen proteins, a reduced expression was observed in the examined protein extracts. Additionally, the APEX2-PTS1 and APEX2-NLS proteins promoted specific biotinylation of proteins in the glycosomes and nucleus, respectively, in *L. infantum*. These results reveal the potential viability of applying APEX2 in the biochemical context of *L. infantum*. As a perspective, we aim to validate the technique in *T. cruzi* and carry out a comparative proteomic analysis between the two organisms. We believe that this approach will allow us to reveal metabolic adaptation mechanisms employed by this group of parasites, in addition to identifying potential pharmacological targets for the treatment of diseases associated with trypanosomatids.

Keywords: *L. infantum*, *T. cruzi*, APEX2, glycosomes, nucleus, organelle proteomics

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AnB: anfotericina B
- ATP: adenosina trifosfato
- APEX2: ascorbato peroxidase modificada
- BgIII: enzima de restrição
- BioID: do inglês, *proximity-dependent Biotin-IDentification*
- BirA: biotina-ligase modificada de *E. coli*
- BP: do inglês, *biotin-phenol*
- BZ: benznidazol
- CDC: do inglês, *Centers for Disease Control and Prevention*
- DAPI: do inglês, *4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride*
- DC: doença de Chagas
- DNA: do inglês, *deoxyribonucleic acid* ou ácido desoxirribonucleico
- DTNs: doenças tropicais negligenciadas
- ECL: do inglês, *enhanced chemiluminescence*
- EDTA: do inglês, *ethylenediamine tetraacetic acid*, ou ácido etilenodiamino tetra-acético
- HA: tag de hemaglutinina
- HRP: do inglês, *horseradish peroxidase*
- IFA: ensaio de imunofluorescência
- kDa: kiloDalton
- LB: meio Luria-Bertani
- LC: leishmaniose cutânea
- LIT: do inglês, *liver infusion tryptose*
- LMC: leishmaniose mucocutânea
- LV: leishmaniose visceral
- MP: técnica de marcação por proximidade
- NAD⁺: do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide* ou dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
- NES: do inglês, *nuclear export signal* ou sinal de exportação nuclear
- NFX: nifurtimox
- NLS: do inglês, *nuclear localization signal* ou sinal de localização nuclear

NotI: enzima de restrição

OMS ou WHO: Organização Mundial da Saúde ou, em inglês, *World Health Organization*

pb: pares de base

PBS: do inglês, *phosphate buffer saline* ou Tampão fosfato-salino

PCR: do inglês, *polymerase chain reaction*

PMD: pentamidina

PS: peptídeo sinal

PTS1: do inglês, *peroxisomal targeting signal type 1*

PTS2: do inglês, *peroxisomal targeting signal type 2*

PV: vacúolo parasitóforo

RE: retículo endoplasmático

RIPA: do inglês, *radioimmunoprecipitation assay buffer*

SDS-PAGE: do inglês, *sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

SBF: soro bovino fetal

TM: tripomastigota metacíclico

XbaI: enzima de restrição

XhoI: enzima de restrição

WT: do inglês, *wild-type*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição global dos casos de doença de Chagas, com base em estimativas oficiais.....	2
Figura 2. Esquema representativo das principais formas de vida do parasito <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
Figura 3. Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	6
Figura 4. Manifestações clínicas das fases aguda e crônica da doença de Chagas.....	8
Figura 5. Distribuição global dos casos de Leishmania Visceral, com base em estimativas oficiais.....	11
Figura 6. Esquema representativo das principais formas de vida de <i>Leishmania infantum</i>	12
Figura 7. Ciclo biológico de <i>Leishmania infantum</i>	14
Figura 8. Visão geral e destaques funcionais da forma epimastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
Figura 9. Representação esquemática do proteoma glicosômico de epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
Figura 10. Esquema mostrando a biotinylação catalisada por APEX2.....	25
Figura 11. Fluxograma do conjunto de experimentos conduzidos no projeto.....	28
Figura 12. Mapa do vetor pLEXSY-hyg2 utilizado nas etapas de clonagem molecular para expressão epissomal em <i>Leishmania infantum</i>	30
Figura 13. Mapa do vetor pTREX-neo utilizado nas etapas de clonagem molecular para expressão epissomal em <i>Trypanosoma cruzi</i>	31
Figura 14. Fluxograma do protocolo de transfecção utilizado para <i>Leishmania infantum</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i>	35
Figura 15. Fluxograma ilustrando o protocolo utilizado para o ensaio de biotinylação realizado em extratos de parasitos <i>Leishmania infantum</i>	36
Figura 16. Confirmação da clonagem dos insertos no vetor pLEXSY-hyg2.....	39
Figura 17. Confirmação da clonagem dos insertos no vetor pTREX-neo.....	40
Figura 18. Detecção das proteínas APEX2 por <i>Western blot</i>	42
Figura 19. Detecção das proteínas mNeonGreen de <i>Leishmania infantum</i> por <i>Western blot</i>	43
Figura 20. Confirmação do ensaio de biotinylação, realizado <i>in vivo</i> , por estreptavidina-blot em <i>Leishmania infantum</i>	44
Figura 21. Confirmação do ensaio de biotinylação, após a lise dos parasitos, por estreptavidina-blot em parasitos <i>Leishmania infantum</i>	45
Figura 22. Imunofluorescência da proteína APEX2-HA-PTS1 e APEX-HA-NLS expressa em <i>Leishmania infantum</i>	46
Figura 23. Imunofluorescência das proteínas biotinyladas vizinhas à proteína APEX2-HA-PTS1 de <i>Leishmania infantum</i>	47

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO.....	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	v
LISTA DE FIGURAS	vii
SUMÁRIO.....	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Doença de Chagas.....	1
1.1.1. Agente etiológico: <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
1.1.2. Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
1.1.3. Manifestações clínicas	7
1.1.4. Tratamento.....	8
1.2. Leishmanioses.....	10
1.2.1. Agente etiológico: <i>Leishmania spp.</i>	11
1.2.2. Ciclo biológico de <i>Leishmania infantum</i>	13
1.2.3. Manifestações clínicas	14
1.2.4. Tratamento.....	16
1.3. Relevância do estudo de organelas especializadas de tripanossomatídeos.....	17
1.3.1. Os glicossomos	20
1.3.2. O núcleo.....	22
1.4. Técnicas de marcação dependentes de proximidade em proteômica.....	23
1.4.1. Aplicação das técnicas de marcação por proximidade para mapeamento subcelular de tripanossomatídeos.....	26
2. JUSTIFICATIVA.....	27
3. OBJETIVOS.....	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1. Cultura celular de <i>L. infantum</i> e <i>T. cruzi</i>	28
4.2. Construção dos plasmídeos de expressão episomal	29
4.3. Transformação bacteriana.....	32
4.4. Preparação plasmidial	33
4.5. Transfecção em <i>L. infantum</i> e <i>T. cruzi</i>	33
4.6. Ensaio de biotilação	35
4.7. <i>Western blot</i> e estreptavidina- <i>blot</i>	37
4.8. Ensaio de imunofluorescência.....	37
5. RESULTADOS	38
5.1. Clonagens dos genes APEX2 e mNeonGreen nos vetores pLEXY e pTRES.....	38
5.2. Confirmação da expressão das proteínas por <i>Western blot</i>	41
5.3. Confirmação da biotilação das proteínas organelares.....	43
5.4. Análise de imagens por imunofluorescência	45

6. DISCUSSÃO.....	47
7. CONCLUSÕES.....	53
8. PERSPECTIVAS	54
APÊNDICE	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1. INTRODUÇÃO

A família Trypanosomatidae, pertencente à classe Kinetoplastida, compreende um grupo diversificado de protozoários parasitos, incluindo espécies dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*, agentes causadores de doenças significativas em humanos, como a leishmaniose, a tripanossomíase africana e a doença de Chagas (DC). Estas patologias, potencialmente letais sem tratamento adequado, representam algumas das principais Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs), afetando mais de 1,7 bilhão de pessoas mundialmente, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2023a). As DTNs são predominantes em áreas de baixa renda, onde condições socioeconômicas limitadas intensificam sua disseminação. A falta de investimento em pesquisa para estas doenças, devido ao baixo potencial de lucro pelas empresas farmacêuticas, contribui para a continuidade da negligência. Portanto, é essencial que esforços globais se concentrem em encontrar soluções terapêuticas econômicas para reduzir o impacto das DTNs nas comunidades mais vulneráveis.

Os tripanossomatídeos são caracterizados por suas organelas especializadas (Souza, de, 2002), as quais têm sido o foco de vários estudos proteômicos visando compreender a biologia celular desses organismos. As análises proteômicas dessas estruturas subcelulares têm revelado um amplo espectro de proteínas exclusivas aos tripanossomatídeos, proporcionando informações relevantes sobre seus mecanismos metabólicos e regulatórios (Pedra-Rezende, Bombaça e Menna-Barreto, 2022). Avanços recentes em técnicas de marcação por proximidade (MP) têm facilitado o mapeamento preciso das interações proteína-proteína em compartimentos celulares específicos (Vélez-Ramírez *et al.*, 2021). Essa pesquisa é fundamental não apenas para a compreensão da biologia dos tripanossomatídeos, mas também na busca contínua por novos alvos terapêuticos, tendo em vista que as proteínas exclusivas dessas organelas podem ser candidatas promissoras para o desenvolvimento de fármacos.

1.1. Doença de Chagas

A DC, também conhecida como tripanossomíase americana, é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. A OMS estima que entre 6 a 7 milhões de pessoas globalmente estejam infectadas com *T. cruzi*, sendo prevalente em 21 países da América Latina (WHO, 2023b). Historicamente, a DC estava confinada às Américas, mas nas últimas décadas observou-se uma mudança no padrão epidemiológico, com a doença se tornando mais urbana devido à mobilidade populacional e urbanização (WHO, 2023b). Isso levou ao aumento de casos em

países fora da América Latina, incluindo Estados Unidos, Canadá, e algumas nações europeias, africanas, do Mediterrâneo Oriental e do Pacífico Ocidental (Figura 1). Atualmente, cerca de 75 milhões de pessoas estão em risco de infecção (WHO, 2023b). A doença é comum em áreas rurais do México, América Central e América do Sul, onde condições precárias de habitação favorecem a presença do vetor, o barbeiro. Esforços de saúde pública têm reduzido a incidência de novas infecções, mas a transmissão congênita ainda ocorre (Dahal *et al.*, 2021).

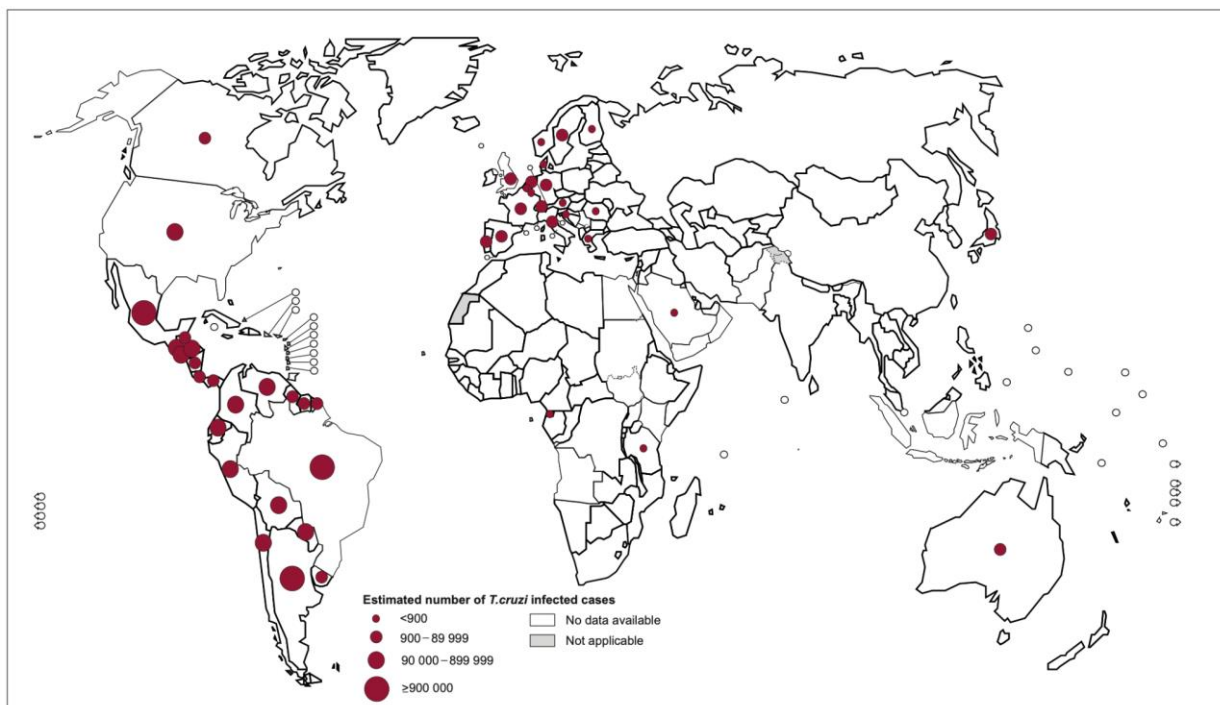


Figura 1. Distribuição global dos casos de doença de Chagas, com base em estimativas oficiais (OMS, 2018).

A prevalência da DC no Brasil apresenta variações significativas entre diferentes regiões, refletindo a complexidade epidemiológica e os desafios no controle da doença. Estudos recentes indicam que, embora haja uma tendência geral de diminuição na prevalência devido ao controle eficaz da transmissão vetorial e transfusional, ainda existem áreas, especialmente em regiões como o Nordeste, onde a doença permanece um problema de saúde pública significativo (Hasslocher-Moreno *et al.*, 2021). Além disso, aspectos como a ausência de utilização de serviços de saúde por pessoas com DC, especialmente em regiões endêmicas, ressaltam a importância de políticas públicas que levem em conta os elementos contextuais que influenciam o acesso e a utilização dos serviços de saúde (Damasceno *et al.*, 2022). Desse

modo, a DC continua sendo um desafio no Brasil, exigindo atenção contínua para prevenção, diagnóstico e tratamento, especialmente em populações rurais e de baixa renda (Fidalgo *et al.*, 2021).

1.1.1. Agente etiológico: *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é um parasito classificado na taxonomia biológica como parte do Reino Protista, Filo Euglenozoa, Classe Kinetoplastida, Ordem Trypanosomatida, Família Trypanosomatidae e Gênero *Trypanosoma* (Tibayrenc e Ayala, 2022).

A transmissão do *T. cruzi* ocorre principalmente através de insetos triatomíneos, conhecidos popularmente como barbeiros. Entre os vetores mais importantes estão o *Triatoma infestans*, predominante na Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai, Uruguai e Peru; o *Rhodnius prolixus*, encontrado na Colômbia, Venezuela e América Central; o *Triatoma dimidiata*, presente no Equador e América Central; e o *Rhodnius pallescens*, localizado no Panamá (PAHO, 2023). Esses insetos são capazes de infectar uma ampla gama de mamíferos hospedeiros, incluindo humanos, em ambientes tanto silvestres quanto domésticos. Além da transmissão por insetos triatomíneos, que representa aproximadamente 70% das infecções, a transmissão congênita é responsável por 26% dos casos, e um número reduzido de pessoas (<1% de cada uma das seguintes categorias) é infectada por transfusão ou transplante de um doador infectado por *T. cruzi*, acidentes laboratoriais ou consumo de líquidos ou alimentos contaminados com o parasito, caracterizando a transmissão oral (Bonney *et al.*, 2019).

O *T. cruzi* apresenta quatro formas de vida principais que se alternam durante seu ciclo biológico: tripomastigota metacíclico (TM), amastigota, tripomastigota sanguíneo e epimastigota (Figura 2). Porém, descrevem-se também outros estágios intermediários como esferomastigota, possíveis intermediários na transição para epimastigotas e capazes de replicação, e a forma “zoide”, descrita recentemente, resultante de uma divisão celular assimétrica (Ferreira, 2020; Kurup e Tarleton, 2014).

Os TM representam a forma infectiva encontrada na extremidade distal do tubo digestório dos triatomíneos (Ferreira, 2020). Eles possuem forma alongada e medem cerca de 17 µm de comprimento. O flagelo, curto, emerge próximo à extremidade posterior da célula e forma uma estrutura livre que é facilmente observável (Figura 2). O núcleo localiza-se na região central da célula, enquanto o cinetoplasto é encontrado próximo à base do flagelo (Neves *et al.*, 2016).

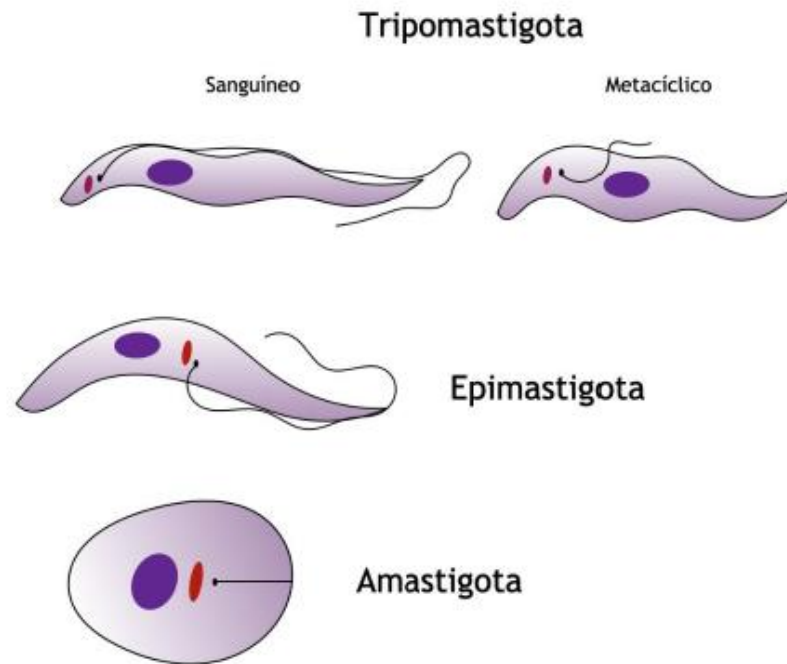


Figura 2. Esquema representativo das principais formas de vida do parasito *Trypanosoma cruzi* (Criada pela autora, 2024).

Os amastigotas de *T. cruzi* são formas intracelulares, encontradas no interior de células do mamífero e constituem o principal estágio reprodutivo nesses hospedeiros. Eles medem entre 3 e 5 μm de diâmetro e possuem forma arredondada ou oval (Figura 2). O flagelo é reduzido e não emerge da célula, tornando-se difícil de visualizar (Neves *et al.*, 2016). O núcleo ocupa uma posição central na célula, e o cinetoplasto está localizado próximo a ele (Ferreira, 2020). Multiplicam-se por fissão binária no citoplasma das células hospedeiras infectadas.

Os tripomastigotas sanguíneos são encontrados majoritariamente no sangue do hospedeiro vertebrado. Eles possuem morfologia semelhante aos TM, mas apresentam um flagelo maior e são mais longos, com cerca de 20 μm de comprimento. Além disso, diferem-se quanto ao metabolismo e ao perfil de expressão de proteínas, bem como aos mecanismos de infecção celular (Ferreira, 2020).

Por fim, os epimastigotas são estágios extracelulares encontrados em vetor invertebrado. Eles possuem um corpo alongado (20 a 30 μm de comprimento), similar aos tripomastigotas sanguíneos, mas diferem principalmente na posição do cinetoplasto e do flagelo (Neves *et al.*, 2016). O cinetoplasto localiza-se anteriormente ao núcleo, e o flagelo emerge da célula na parte

anterior, mas não forma uma extensão livre tão longa quanto nas formas tripomastigotas (Figura 2). Essa forma se reproduz por fissão binária no intestino médio do vetor antes de se transformar em tripomastigotas metacíclicos infectantes (Ferreira, 2020).

1.1.2. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*

O ciclo biológico de *T. cruzi* (Figura 3) é um processo complexo e multifacetado que envolve múltiplos estágios de desenvolvimento tanto em hospedeiros mamíferos quanto em vetores triatomíneos. Inicialmente, o ciclo inicia com a ingestão de sangue de um hospedeiro mamífero por um inseto triatomíneo infectado. Durante a alimentação, o inseto libera TM em suas fezes próximas à ferida da picada. Esses TM adentram nas células hospedeiras, ligando-se a receptores específicos e originando o vacúolo parasitóforo (PV) em diversas células nucleadas. Nesse ambiente intracelular, os TM passam por diferenciação, assumindo a forma arredondada de amastigotas, que escapam do PV e se multiplicam por fissão binária no citoplasma da célula hospedeira. Posteriormente, os amastigotas se convertem novamente em tripomastigotas, que, ao romperem a célula hospedeira, disseminam-se na corrente sanguínea e nos tecidos, onde têm a capacidade de infectar novas células. Os tripomastigotas sanguíneos, quando ingeridos por um triatomíneo, transformam-se em epimastigotas no intestino médio do vetor. Em seguida, esses epimastigotas se multiplicam e migram para o intestino posterior, onde se fixam por meio de seus flagelos, passando por diferenciação até se tornarem novamente TM, prontos para reiniciar o ciclo infeccioso (CDC's Global Health Center, 2021; Ferreira *et al.*, 2023). Esta descrição compreende a visão clássica do ciclo de vida do *T. cruzi*, que envolve a alternância entre formas replicativas e não replicativas, assim como a transição entre hospedeiros mamíferos e vetores.

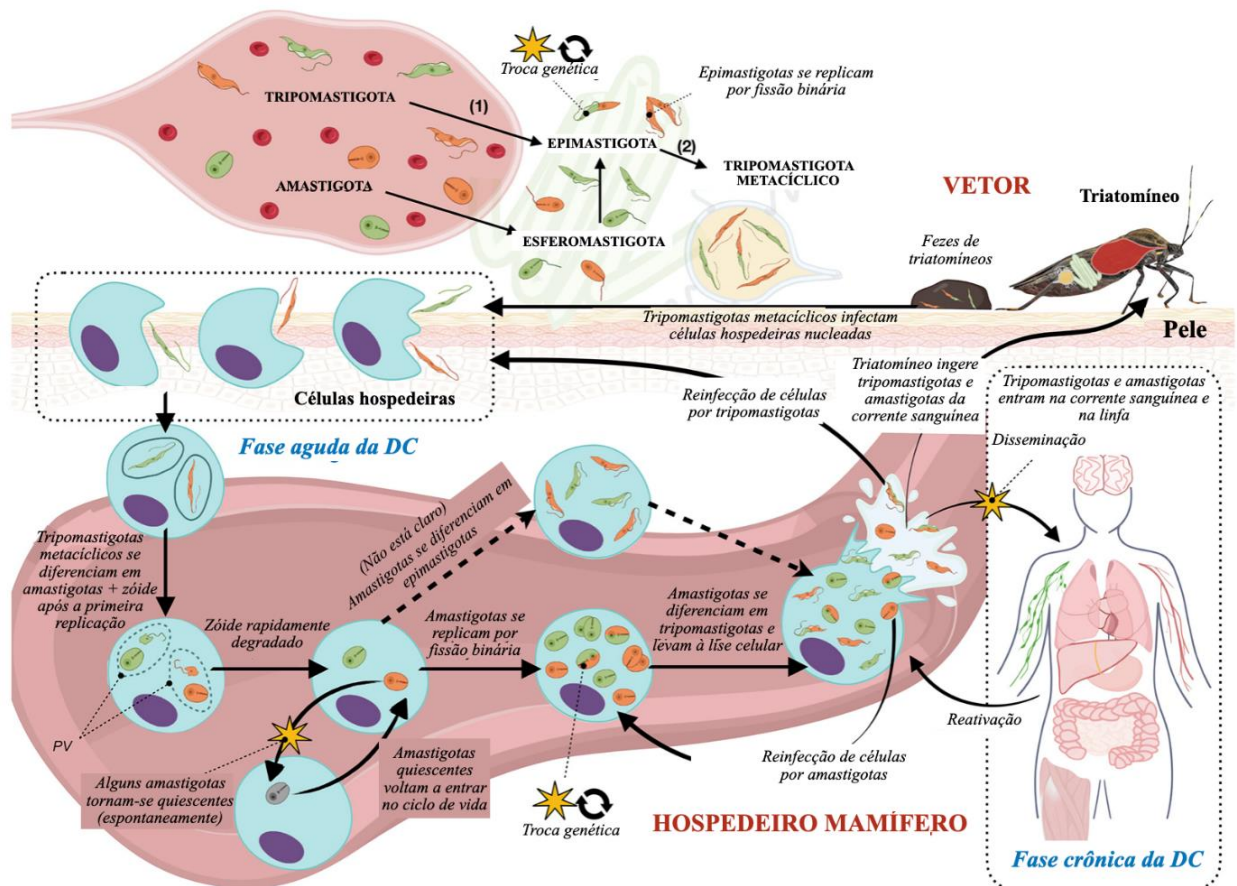


Figura 3. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi* (adaptado de Martín-Escolano *et al.*, 2022).

No entanto, estudos têm revelado aspectos mais complexos desse ciclo biológico (Martín-Escolano *et al.*, 2022). Em 2014, identificou-se uma nova morfologia intracelular chamada “zóide”, resultante da divisão celular assimétrica, que implica numa diferenciação inicial dos TM (Kurup e Tarleton, 2014). Um avanço significativo foi o reconhecimento, em 2017, de amastigotas metabolicamente quiescentes ou dormentes (Francisco *et al.*, 2017). Essas formas representam um mecanismo potencial de resistência medicamentosa, capazes de permanecer em tecidos infectados a longo prazo e de reativar a infecção mesmo após tratamento (Sánchez-Valdéz *et al.*, 2018). A dormência é um fenômeno observado em diversos protozoários e está associada à recorrência da doença e à resistência a medicamentos (Markus, 2012; Sullivan e Jeffers, 2012).

No ciclo no vetor, foi observado que amastigotas da corrente sanguínea podem se diferenciar em formas com flagelos curtos, chamadas esfero mastigotas, que são provavelmente intermediários na transição para epimastigotas (Tyler e Engman, 2001). Além disso, TM demonstraram a capacidade de se diferenciar em formas semelhantes a epimastigotas, com

características proteômicas únicas, capazes de invadir células hospedeiras mamíferas e iniciar uma nova infecção (Kessler *et al.*, 2017).

1.1.3. Manifestações clínicas

A DC manifesta-se clinicamente em fases distintas: aguda, indeterminada e crônica (Tanowitz *et al.*, 1992), com períodos de incubação variáveis conforme a via de transmissão. Inicialmente, após a infecção, o parasito é fagocitado por macrófagos e se multiplica, levando à disseminação para diversos tecidos. O período de incubação desde a infecção até os primeiros sintomas pode variar: de 5 a 22 dias para transmissão vetorial, 20 a 30 dias podendo chegar a 117 para transfusional, 3 a 22 dias para oral, e até 20 dias para transmissão acidental (Salomão, 2023).

Na fase aguda, marcada por sintomas leves e inespecíficos, quando presentes, a infecção pode ser facilmente confundida com doenças virais. Essa confusão persiste a menos que haja evidências claras de infecção, como uma inflamação no local da picada do inseto, conhecida como chagoma (Figura 4A), ou um edema periorbital, característico após uma infecção conjuntival, denominado sinal de Romaña (Suárez *et al.*, 2022) (Figura 4B). Esta fase dura de semanas a alguns meses, com a detecção dos parasitos no sangue por 2 a 4 meses. Cerca de 1% dos infectados desenvolvem complicações graves como linfadenopatia e miocardite. Contudo, a grande maioria dos casos é assintomática ou apresenta sintomas leves, com a doença progredindo para a fase indeterminada (Benziger, Carmo, do e Ribeiro, 2017; Tanowitz *et al.*, 1992)

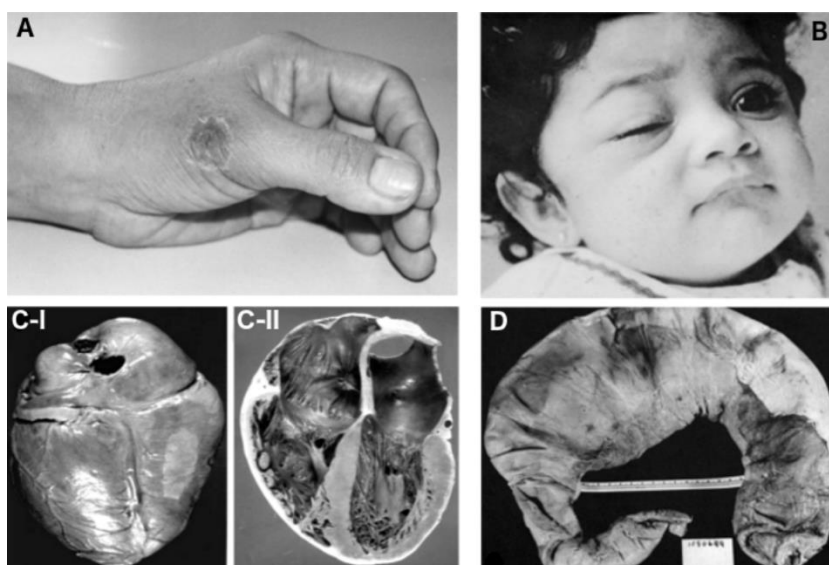


Figura 4. Manifestações clínicas das fases aguda e crônica da doença de Chagas. **A**, Formação de chagoma observada na superfície dorsal da mão esquerda, 21 dias após a inoculação acidental com tripomastigotas, indicando a fase aguda da infecção; **B**, Criança apresentando o sinal de Romana, caracterizado por edema unilateral palpebral, um indicativo clássico da fase aguda da doença; **C**, Alterações cardíacas associadas à fase crônica, incluindo: I. Aspecto da superfície superior de um coração afetado pela DC, evidenciando dilatação cardíaca, formação de placas fibrosas e alargamento dos vasos coronários. II. Corte transversal do coração mostrando dilatação significativa das câmaras cardíacas direita e esquerda, refletindo a gravidade da cardiopatia chagásica; **D**, Megacólon chagásico, evidenciado pela distensão extrema da porção distal do cólon, destacando uma complicação gastrointestinal da fase crônica da doença (Flower, 2003).

A fase indeterminada representa um longo período, podendo durar anos ou décadas, onde os indivíduos permanecem assintomáticos, mas com sorologia positiva para *T. cruzi*. Esta fase é marcada por uma infecção persistente sem manifestações clínicas.

Por fim, cerca de 30% dos infectados evoluem para a fase crônica, que pode surgir após anos de dano miocárdico acumulado não detectado (Bonney *et al.*, 2019). A cardiomiopatia é a principal manifestação clínica nesta fase, afetando 20-30% dos indivíduos infectados, e é associada à alta morbidade e mortalidade (Bonney *et al.*, 2019). Os tripomastigotas liberados durante a infecção são capazes de infectar praticamente qualquer célula nucleada, mas o parasito exibe um tropismo específico por miofibras cardíacas estriadas, o que pode contribuir para a prevalência desta manifestação (Fernandes e Andrews, 2012; Lewis e Kelly, 2016). As alterações morfológicas cardíacas incluem aumento global do coração, com significativa alteração de tamanho e forma (Figura 4C). Além do comprometimento cardíaco, a doença pode afetar o trato gastrointestinal e o sistema nervoso, resultando em sintomas como megaesôfago e megacólon (Figura 4D) devido a defeitos no sistema nervoso entérico (Jabari *et al.*, 2014; Matsuda, Miller e Evora, 2009).

1.1.4. Tratamento

O tratamento da DC enfrenta desafios consideráveis devido à falta de vacinas e às limitações das terapias disponíveis. Atualmente, existem apenas dois medicamentos aprovados para o tratamento desta doença: o benznidazol (BZ) e o nifurtimox (NFX), com o BZ sendo utilizado desde 1971 e o NFX desde 1965 (Crespillo-Andújar *et al.*, 2022; Jackson, Wyssa e Chappuis, 2020). Ambos fazem parte da Lista de Medicamentos Essenciais da OMS, tendo sido descobertos há mais de 45 anos, o que evidencia o desinteresse da indústria farmacêutica pelas DTNs (Ferraz *et al.*, 2022).

Os mecanismos de ação propostos de ambos os fármacos são complexos e envolvem processos bioquímicos distintos. O BZ, um pró-fármaco, é bioativado no parasito pela

nitrorredutase mitocondrial tipo 1 TcNTR-1, gerando metabólitos reativos com atividade tripanocida, como danos ao DNA e depleção de tiol (Campos *et al.*, 2017; Hall e Wilkinson, 2012). O NFX, também um pró-fármaco, é ativado pela enzima NADPH-citocromo P-450 redutase, que converte seu grupo nitro (NO₂) em NO₂U⁻ e inicia um ciclo redox com oxigênio, gerando radicais superóxido (O₂U⁻). A desmutação do superóxido resulta em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Na presença de Fe³⁺, O₂U⁻ e H₂O₂ formam radicais hidroxila, que danificam macromoléculas do parasito. O radical NO₂U também inibe as enzimas glutationa e tripanotiona redutases, responsáveis pelo controle do estresse oxidativo intracelular (Gonzalez-Martin *et al.*, 2011; Maya *et al.*, 2007).

Aproximadamente 40% das cepas de *T. cruzi*, provenientes de distintas origens geográficas, demonstram resistência ou sensibilidade reduzida a esses compostos (Ferraz *et al.*, 2022). Mecanismos moleculares subjacentes à resistência ao BZ incluem a perda de cópias cromossômicas do gene TcNTR e mutações no alelo remanescente que diminuem a função enzimática da TcNTR-1, enzima essencial para a ativação metabólica do BZ (Campos *et al.*, 2014; Mejia *et al.*, 2012; Petravicius *et al.*, 2019). Adicionalmente, a eliminação do gene responsável pela codificação da flavoproteína *Old Yellow Enzyme* (TcOYE) de *T. cruzi*, cuja superexpressão eleva a sensibilidade ao BZ e NFX, indica a presença de múltiplos mecanismos de resistência (García-Huertas *et al.*, 2017; Murta *et al.*, 2006).

Ambos os medicamentos demonstram eficácia na prevenção e controle da progressão da doença em adultos, particularmente na fase assintomática e durante a infecção aguda. No entanto, enfrentam desafios devido à necessidade de tratamento prolongado, que pode estender-se até dois meses, e à ocorrência de reações adversas em até 40% dos pacientes adultos (Jackson, Wyssa e Chappuis, 2020). Estas reações podem requerer intervenções adicionais para complicações cardíacas, digestivas ou neurológicas (Jackson, Wyssa e Chappuis, 2020). Além disso, são contraindicados em populações específicas, como mulheres grávidas e indivíduos com insuficiência renal ou hepática (Meymandi *et al.*, 2018).

Portanto, a resistência dos parasitos aos tratamentos atuais, os efeitos colaterais e a ineficácia dos medicamentos durante a fase crônica ressaltam a urgência em desenvolver tratamentos novos, eficientes e de baixo custo para a DC. Esta necessidade é agravada pela alocação insuficiente de recursos globais para combater as DNTs. A pesquisa específica para a DC foi particularmente subfinanciada, recebendo apenas 0,67% do financiamento total destinado às DNTs entre 2010 e 2020 (Miranda-Arboleda *et al.*, 2021). Este dado enfatiza o

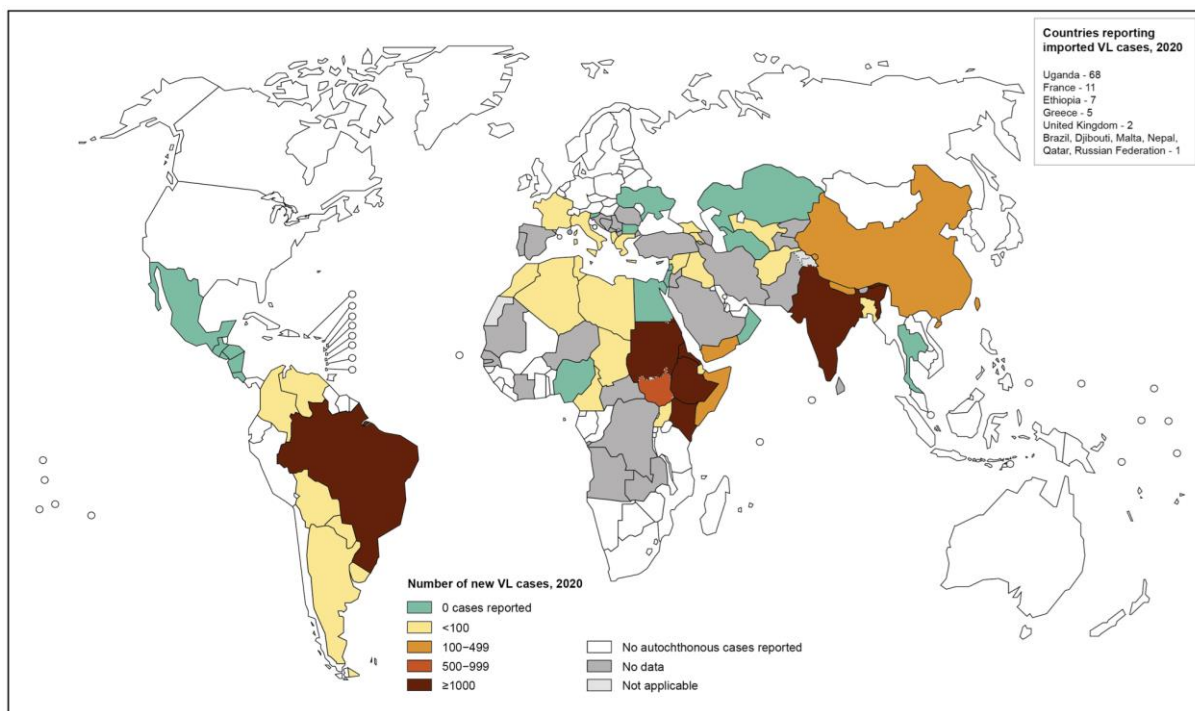
status da DC como a "mais negligenciada dentre as doenças tropicais negligenciadas" (Zaidel e Sosa Liprandi, 2021) e reforça a necessidade de redirecionar esforços e recursos para superar esses obstáculos no tratamento da doença.

1.2. Leishmanioses

As leishmanioses são um conjunto de doenças parasitárias causada por protozoários do gênero *Leishmania*, com mais de 20 espécies identificadas (WHO, 2023c). Esta doença apresenta três formas principais: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, e leishmaniose mucocutânea (LMC). A LC é a forma mais comum, a LV é a forma mais grave e a LMC é a forma mais incapacitante e desfigurante da doença (WHO, 2023c).

Distribuída em regiões tropicais, subtropicais e no sul da Europa, a leishmaniose afeta as populações de baixa renda, especialmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Fatores como desnutrição, imunidade reduzida, condições habitacionais precárias, migração e proximidade a habitats de flebotomíneos estimulam a vulnerabilidade a esta doença (Okwor e Uzonna, 2016). Além disso, o acesso limitado a cuidados de saúde contribui para diagnósticos e tratamentos tardios, aumentando a morbidade e mortalidade (Alvar, Yactayo e Bern, 2006).

Em termos epidemiológicos, atualmente a doença está presente em 98 países, com mais de 1 bilhão de pessoas vivendo em áreas endêmicas e com risco de infecção (OMS, 2023). Estima-se que ocorram anualmente cerca de 50.000 a 90.000 novos casos de LV, ocorrendo principalmente no Brasil, no leste da África e na Índia (Figura 5), e mais de 1 milhão de novos casos de LC (WHO, 2023c). No Brasil, em média, cerca de 3.500 casos de LV são registrados anualmente, com a região Nordeste liderando a maior parte dos casos (BRASIL. Ministério da Saúde, 2023a). Com relação à LC, também no Brasil, estima-se que ocorram 21.000 casos por ano, com a região Norte apresentando o maior coeficiente de incidência, seguida das regiões Centro-Oeste e Nordeste (BRASIL. Ministério da Saúde, 2023).



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2021. All rights reserved

Data Source: World Health Organization
Map Production: Control of Neglected Tropical Diseases (NTD)
World Health Organization



Figura 5. Distribuição global dos casos de Leishmania Visceral, com base em estimativas oficiais (OMS, 2020).

1.2.1. Agente etiológico: *Leishmania spp.*

A leishmaniose é causada por protozoários do gênero *Leishmania*, pertencente à família Trypanosomatidae. Dentre as 30 espécies deste gênero que infectam mamíferos, cerca de 21 são patogênicas para humanos (CDC's Global Health Center, 2017). As espécies patogênicas incluem o complexo *Leishmania donovani*, com 2 espécies (*L. donovani* e *L. infantum*), o complexo *L. mexicana*, com 3 espécies principais (*L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. venezuelensis*), *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*, e o subgênero *Viannia* com 4 espécies principais (*L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) peruviana*) (CDC's Global Health Center, 2017)

A LV é principalmente causada por *L. donovani* em regiões da Ásia e África Oriental (Velho Mundo), e *L. infantum* (também conhecida como *L. chagasi*) nas Américas, Novo Mundo (Alvar *et al.*, 2012). Espécies que frequentemente causam LC incluem *L. major*, *L. tropica*, e *L. aethiopica* em regiões da África e do Oriente Médio, e *L. mexicana* e *L. braziliensis* nas Américas (WHO, 2023c). A LMC é frequentemente associada a espécies do subgênero *Vianna* na América do Sul (WHO, 2023c).

A transmissão da leishmaniose ocorre por meio da picada de fêmeas de flebotomíneos dos gêneros *Phlebotomus*, predominantes no Velho Mundo (Europa, Ásia e África), e *Lutzomyia*, comuns no Novo Mundo (Lainson e Rangel, 2005). A distribuição geográfica desses vetores é ampla, abrangendo regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo, incluindo partes da Ásia, África, Europa e Américas, com recentes estudos mostrando uma expansão para o norte da Europa devido às mudanças climáticas (Chalghaf *et al.*, 2018). Além dos humanos, os animais que podem ser infectados por espécies do gênero *Leishmania* incluem principalmente cães, que são considerados os principais reservatórios urbanos da doença (Mohebbali, Moradi-Asl e Rassi, 2018).

Ao longo da infecção, o parasito apresenta três formas de vida principais: promastigota procíclico, promastigota metacíclico e amastigota. Os promastigotas procíclicos são as formas de vida iniciais no ciclo de vida dentro do vetor invertebrado, encontradas no intestino do mosquito. Eles possuem um corpo alongado e fino, com 10 a 20 μm de comprimento (Teixeira *et al.*, 2013). O flagelo, longo e móvel emerge da parte anterior da célula e é mais longo do que o corpo da célula, facilitando sua mobilidade dentro do intestino do mosquito (Figura 6). O núcleo está localizado na região central da célula, enquanto o cinetoplasto é encontrado próximo à base do flagelo, na extremidade anterior.

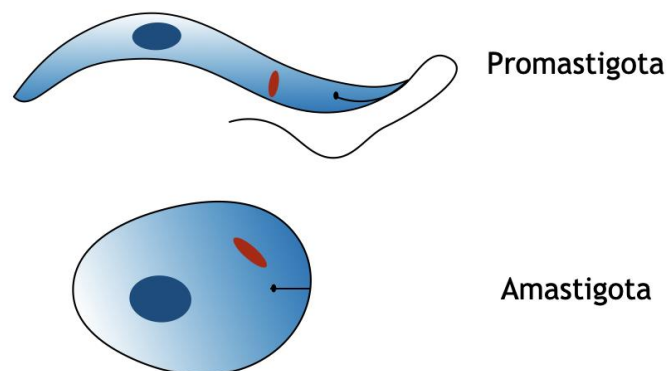


Figura 6. Esquema representativo das principais formas de vida de *Leishmania infantum* (Criada pela autora, 2024).

Os promastigotas metacíclicos representam as formas infectantes que são transmitidas ao hospedeiro vertebrado. Morfologicamente são semelhantes aos promastigotas procíclicos, mas geralmente são menores. O flagelo permanece longo, permitindo a locomoção, mas sua

estrutura e função são otimizadas para a penetração nas células do hospedeiro (Neves *et al.*, 2016). O núcleo e o cinetoplasto mantêm posições similares às da forma procíclica.

Os amastigotas são pequenos, com cerca de 2 a 5 µm de diâmetro, e têm forma arredondada ou oval (Neves *et al.*, 2016). O flagelo é muito curto, não emergindo da célula, o que os torna imóveis, focado em funções sensoriais (Figura 6) (Teixeira *et al.*, 2013). Os amastigotas multiplicam-se dentro das células do hospedeiro por fissão binária.

1.2.2. Ciclo biológico de *Leishmania infantum*

O ciclo biológico de *L. infantum* envolve a alternância entre dois hospedeiros: os insetos flebotomíneos e os hospedeiros vertebrados (Figura 7). O ciclo nos mamíferos se inicia quando fêmeas de flebotomíneos infectadas fazem um repasto sanguíneo e parasitos na forma de promastigotas metacíclicos são regurgitados, penetrando a derme do hospedeiro. Esses promastigotas são então fagocitados por células do sistema imune, como macrófagos, onde se diferenciam em amastigotas. Estas formas intracelulares replicam-se nos VPs que, em seguida, promovem a fusão com os lisossomos, resultando na formação do fagolisossomo. Este ambiente, notadamente oxidativo e adverso para uma vasta gama de organismos, é, no entanto, tolerado pelos amastigotas, onde promovem a ruptura celular e a subsequente reinfecção de novos fagócitos (Kaye e Scott, 2011). A forma amastigota pode infectar diversos tecidos, incluindo baço, fígado, medula óssea e linfonodos, causando danos significativos e manifestações clínicas da leishmaniose (CDC's Global Health Center, 2017).

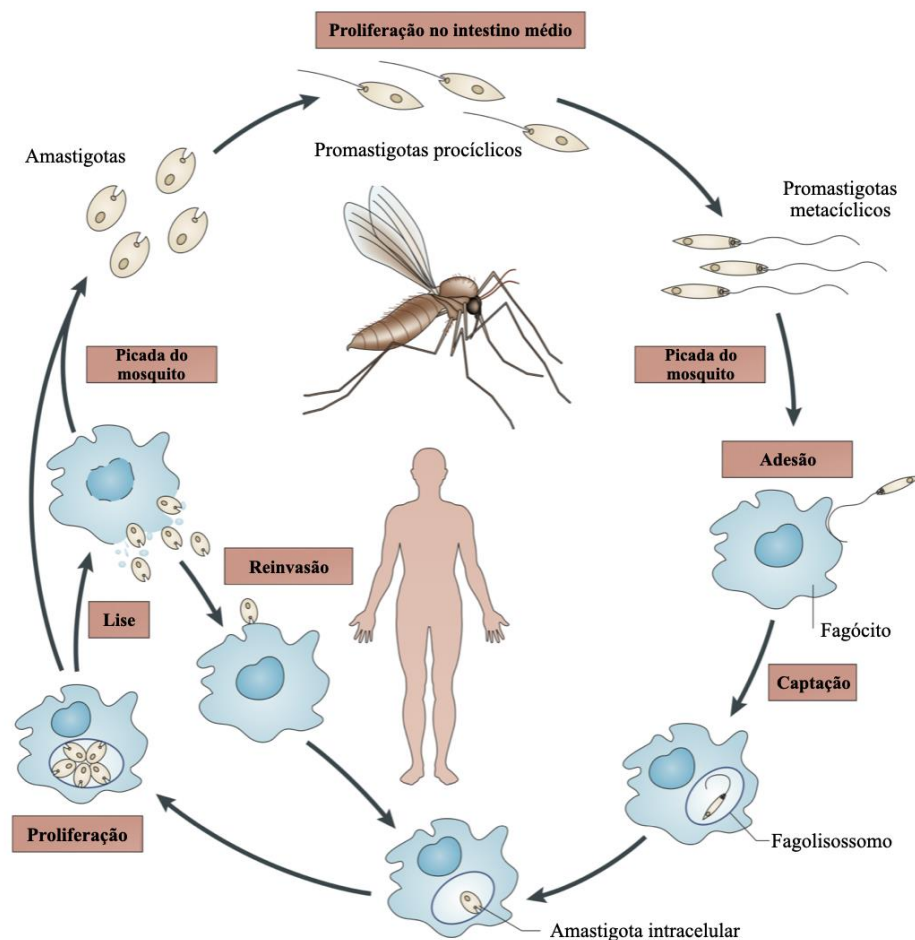


Figura 7. Ciclo biológico de *Leishmania infantum* (adaptado de Kaye e Scott, 2011).

O ciclo no inseto é iniciado quando uma fêmea do flebotomíneo ingere fagócitos infectados com formas amastigotas durante o repasto sanguíneo. No vetor, os amastigotas diferenciam-se em promastigotas procíclicos, que proliferam extracelularmente por divisão binária (Burchmore e Barrett, 2001). Estas formas se deslocam em direção ao esôfago e faringe do flebotomíneo, onde se fixam às células epiteliais. Neste local, um processo crucial denominado metaciclogênese ocorre (Gossage, Rogers e Bates, 2003), resultando na formação das formas promastigotas metacíclicas, caracterizadas por serem infectivas e não replicativas, preparadas para a transmissão ao hospedeiro seguinte.

1.2.3. Manifestações clínicas

Apesar de morfologicamente semelhantes, as diferentes espécies de *Leishmania* causam formas clínicas distintas, dependendo do tipo de células fagocíticas invadidas. Na LC, os parasitos infectam principalmente macrófagos da pele (Steverding, 2017). A LC manifesta-se

inicialmente como uma pápula não supurativa, um tipo de lesão cutânea, no local da picada do mosquito, frequentemente nas áreas expostas do rosto e das extremidades (Mann *et al.*, 2021). Com o tempo, essas pápulas podem evoluir para úlceras indolores, capazes de curar espontaneamente ou deixar cicatrizes desfigurantes (Berman, 1997). O período de incubação varia de 1 a 4 semanas, podendo se estender por vários anos (CDC's Global Health Center, 2017). Recidivas, associadas principalmente à *L. tropica*, manifestam-se como lesões satélites ao redor de cicatrizes antigas, muitas vezes confundidas com tuberculose cutânea (Burza, Croft e Boelaert, 2018).

A LMC representa a forma mais desfigurante da doença, conduzindo a deformidades faciais anos após a resolução dos sintomas cutâneos iniciais. Os pacientes com LMC frequentemente relatam sintomas nasais crônicos, como secreções, dor, sangramento e inflamação evidentes no exame físico (Weller, Durand e Pilch, 2005). As lesões iniciam-se tipicamente na mucosa nasal, expandindo-se para a mucosa oral, faringe, laringe e pele do nariz e lábios (Vera-Izaguirre DS, 2006). A progressão leva a ulcerações superficiais, podendo afetar severamente a úvula, o palato e as amígdalas, com o risco de infecções secundárias e complicações potencialmente fatais devido à destruição do tecido (Torres-Guerrero *et al.*, 2017a).

Por fim, na LV ou calazar, a forma mais letal, os amastigotas liberados se espalham pelo sistema circulatório e provocam uma infecção sistêmica afetando principalmente o fígado, o baço e os sistemas hematogênico e linfático, com um período de incubação de 3 a 8 meses (Scarpini *et al.*, 2022; Steverding, 2017). Os sintomas incluem fadiga, dor abdominal, perda de peso não intencional, febre, linfadenopatia, hepatomegalia, esplenomegalia, palidez, anemia, leucopenia, trombocitopenia, e em crianças, diarreia crônica e retardo de crescimento (Scarpini *et al.*, 2022; Torres-Guerrero *et al.*, 2017a). Estas manifestações podem se desenvolver rapidamente, afetando principalmente crianças, indivíduos imunocomprometidos e desnutridos, levando a um quadro clínico grave e potencialmente fatal. O termo calazar (“kala-azar”), também conhecido como “doença negra”, origina-se da alteração para uma tonalidade acinzentada observada na pele de certos pacientes no Sul da Ásia. Essa mudança cromática é provavelmente decorrente de uma elevação na produção do hormônio adrenocorticotrópico, induzida por citocinas (Kimberlin, 2018).

1.2.4. Tratamento

Os diferentes tipos de leishmanioses são tratados principalmente através de terapias antiparasitárias, mas enfrentam desafios significativos (WHO, 2023c). Os tratamentos atuais incluem antimoniais pentavalentes, anfotericina B, paromomicina, miltefosina, pentamidina e imidazoles/triazoles.

Os antimoniais pentavalentes (como o estiboIFAnato de sódio ou o antimoniato de meglumina) são os principais medicamentos empregados contra a leishmaniose (Torres-Guerrero *et al.*, 2017b). Utilizados há sete décadas, esses compostos agem inibindo as vias glicolíticas e oxidativas dos ácidos graxos nos amastigotas, embora seu mecanismo exato seja desconhecido (Croft, Seifert e Yardley, 2006). Eles podem causar efeitos colaterais como artralgia, mialgia, anorexia, dor de cabeça, febre, vômitos e tontura, e são tóxicos para o coração, rins, fígado e pâncreas, limitando seu uso em grávidas, idosos e pessoas com doenças cardíacas, renais ou hepáticas (Goto e Lindoso, 2010). Além disso, a resistência dos parasitos aos antimoniais exigiu a utilização de medicamentos alternativos, especialmente no subcontinente indiano (Ponte-Sucre *et al.*, 2017).

A anfotericina B (AnB), segunda linha de tratamento utilizada para leishmanioses, é um antibiótico poliênico que tem como alvo o ergosterol na membrana superficial do parasito, levando ao aumento da permeabilidade e ao influxo de íons (Kumari *et al.*, 2022). Sua principal vantagem é a eficácia contra cepas resistentes aos compostos de antimônio. Existem quatro tipos de AnB usados em tratamentos clínicos: o desoxicolato de AnB, a AnB, a forma lipossômica e o complexo lipídico (Goto e Lindoso, 2010). A AnB lipossomal alcança níveis mais elevados no sangue, tem uma meia-vida mais curta no organismo e se concentra mais no fígado e no baço, apresentando menor toxicidade em comparação com as outras formulações. Contudo, a AnB lipossomal ainda pode causar efeitos colaterais graves como febre, calafrios e problemas renais, e seu alto custo pode restringir seu uso em áreas onde a doença é mais comum (Meheus *et al.*, 2010). Nenhuma resistência efetiva à AnB foi relatada até o momento.

A paromomicina, um antibiótico aminoglicosídeo, é usada tanto topicamente para LC quanto sistemicamente para LV. Embora seja menos tóxica que os compostos de antimônio e mais acessível, sua eficácia varia e pode causar irritação local quando usada topicamente (Sundar e Chakravarty, 2008). Seu mecanismo de ação, pouco compreendido, parece influenciar a fluidez da membrana plasmática, perturbar a função dos ribossomos e alterar o potencial da membrana mitocondrial, o que resulta na inibição do processo respiratório celular

(Maarouf *et al.*, 1997). Com relação à sua resistência, esta não é clara, apesar de terem sido desenvolvidos isolados resistentes derivados de laboratório (Hendrickx *et al.*, 2016).

A miltefosina, originalmente desenvolvida para o tratamento de câncer, foi o primeiro medicamento oral para leishmaniose, oferecendo uma opção de tratamento mais conveniente. Seus mecanismos de ação incluem a inibição da biossíntese de fosfolipídios e esteróis, inibição da citocromo C oxidase, afetando funções mitocondriais e, mais recentemente descrito, essa substância também é capaz de afetar os acidocalcissomos, induzindo a rápida alcalinização dessas organelas (Pinto-Martinez *et al.*, 2018). Este medicamento é eficaz contra várias formas de leishmaniose, mas sua teratogenicidade e potenciais efeitos gastrointestinais limitam seu uso em certos grupos de pacientes (Goto e Lindoso, 2010). Adicionalmente, tem-se relatado resistência natural a este medicamento, embora os mecanismos moleculares subjacentes permaneçam desconhecidos (Carnielli *et al.*, 2019).

Por fim, a pentamidina, menos comumente usada, é uma alternativa para casos de LC resistente. Trata-se de uma dibenzamidina que interfere na síntese do DNA de *Leishmania*, afetando o cinetoplasto e a membrana mitocondrial, o que resulta na eliminação do parasito (Goto e Lindoso, 2010). Embora seja menos tóxica que os compostos de antimônio, a pentamidina pode causar hipoglicemia e arritmias cardíacas (Croft, Seifert e Yardley, 2006). Além disso, a resistência emergente à pentamidina foi a principal razão para descontinuar este medicamento na Índia na década de 1990 (Nagle *et al.*, 2014).

Essas limitações destacam a necessidade de novos alvos farmacêuticos no combate contra a leishmaniose. A resistência aos medicamentos, os efeitos colaterais adversos e a inacessibilidade de tratamentos eficazes em regiões endêmicas impulsionam a pesquisa por novas terapias.

1.3. Relevância do estudo de organelas especializadas de tripanossomatídeos

Na biologia celular dos tripanossomatídeos, determinadas organelas e estruturas são objetos de estudo devido às suas funções únicas e essenciais para a fisiologia e sobrevivência do parasito. Essas organelas especializadas, como o glicossomo, o acidocalcissomo, a bolsa flagelar, o flagelo, o reservossomo e o cinetoplasto, desempenham papéis cruciais na sobrevivência e patogenicidade desses parasitos (Figura 8). O estudo dessas organelas é fundamental para compreender a biologia dos tripanossomatídeos e identificar novos alvos terapêuticos (Barros-Alvarez *et al.*, 2014; Quiñones *et al.*, 2020).

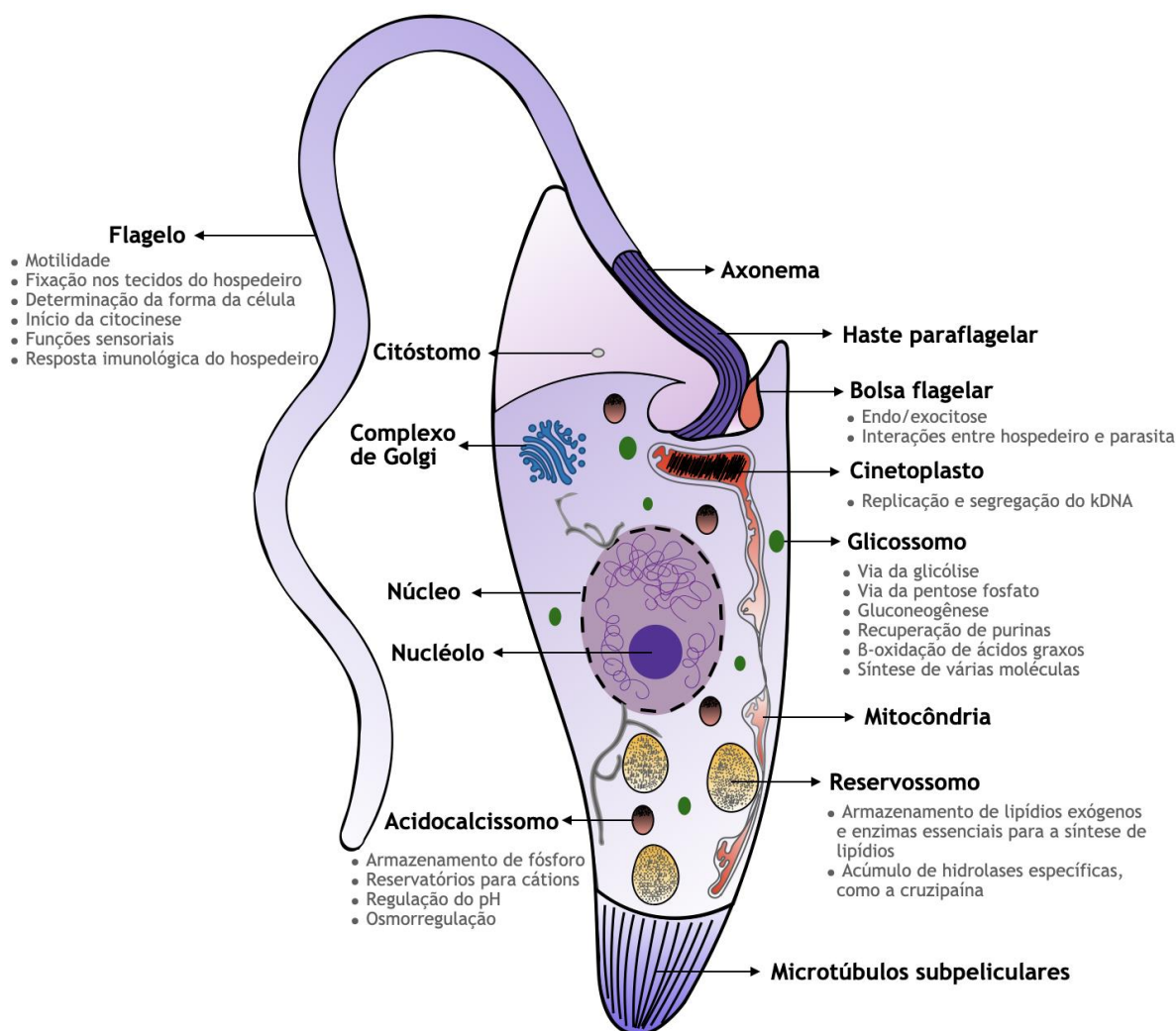


Figura 8. Visão geral e destaques funcionais da forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi*. A ilustração fornece uma visão abrangente das principais organelas e estruturas encontradas em *T. cruzi*. Para as organelas especializadas, cada organela é destacada por suas principais funções (Criada pela autora, 2024).

O **glicossomo**, uma organela que se destaca como um centro metabólico, é fundamental para a segregação de vias vitais que são normalmente citoplasmáticas em outros eucariotos. Sua importância é destacada pela diversidade de seu repertório enzimático, envolvido em processos como glicólise, síntese de pirimidina e vias de salvamento de purinas, tornando-o um alvo promissor para intervenções terapêuticas (Barros-Alvarez *et al.*, 2014). Por exemplo, a interação entre as peroxinas (PEX) PEX5 e PEX14, essencial para a biogênese do glicossomo, surge como um alvo potencial, onde os inibidores dessa interação podem ter um efeito tripanocida significativo (Marciniak *et al.*, 2023).

Os acidocalcissomos, semelhantes aos lisossomos, desempenham um papel crucial na homeostase de íons e na regulação do pH intracelular, contribuindo significativamente para a adaptabilidade e sobrevivência do parasito em condições ambientais flutuantes (Docampo e Huang, 2022). Esta organela desempenha um papel na osmorregulação e na virulência, com enzimas como a V-H+-PPase e a PPase sendo identificadas como possíveis alvos de medicamentos (Docampo e Moreno, 2008).

A bolsa flagelar e o flagelo constituem componentes integrais e elementos chave na adaptação parasitária. O flagelo é essencial na mediação da adesão tecidual ao hospedeiro, facilitando a mobilidade e a infecção, enquanto a bolsa flagelar está mais implicada na evasão imunológica e na aquisição de nutrientes, contribuindo assim para a sobrevivência e adaptação efetiva do parasito no ambiente do hospedeiro (Field e Carrington, 2009). A bolsa flagelar, em particular, também está envolvida em processos como a variação antigênica no *T. brucei*, influenciando diretamente na persistência do parasito no hospedeiro (Manna *et al.*, 2014). As quinases flagelares e a proteína FLAM8 são cruciais para a viabilidade celular e a disseminação do parasito, respectivamente, destacando seu potencial como alvos de medicamentos (Calvo-Álvarez *et al.*, 2021; Calvo-Alvarez *et al.*, 2023; Oberholzer *et al.*, 2011).

Os reservossomos, essenciais para as transições do ciclo de vida do parasito, armazenam nutrientes e enzimas cruciais (Sant’Anna *et al.*, 2009). A cruzipaína, uma cisteína protease localizada nos reservossomos, é vital para a virulência do parasito e representa um alvo quimioterápico potencial (Siqueira-Neto *et al.*, 2018). Compostos como a hinokiflavona foram identificados como possíveis inibidores da cruzipaína, sugerindo novas abordagens terapêuticas (Tripathi, Dey e Das, 2023).

Por fim, **o cinetoplasto**, com sua estrutura complexa de DNA, também é alvo para intervenções terapêuticas. Por exemplo, a topoisomerase II, essencial para a replicação do DNA do cinetoplasto, é um alvo potencial, com a pentamidina identificada como um inibidor eficaz (Das *et al.*, 2004).

Em resumo, as organelas únicas dos tripanossomatídeos representam alvos terapêuticos promissores para o desenvolvimento de medicamentos baseados em proteínas. A especialização dessas estruturas sugere a possibilidade de abordagens farmacológicas novas e específicas. O avanço no entendimento da biologia celular desses parasitos é essencial para a otimização contínua desses alvos farmacológicos.

1.3.1. Os glicosomos

Como visto, o glicosomo, membro relacionado aos peroxissomos, é uma organela identificada em Kinetoplastida e diplomemídeos conhecida por abrigar a maioria das enzimas glicolíticas, desempenhando um papel fundamental na via metabólica central da glicólise (Jamdhade *et al.*, 2015). Entretanto, apesar de conhecido por abrigar parte das enzimas da glicólise, já foi relatada a presença de enzimas relacionadas a outras vias metabólicas nos glicosomos de diversos tripanossomatídeos: via das pentoses-fosfato, gliconeogênese, via de salvamento de purina, β -oxidação de ácidos graxos e biossíntese de éter-lipídios, isoprenóides, esteróis e pirimidinas (Acosta *et al.*, 2019). Devido à presença de enzimas em vias consideradas essenciais para a sobrevivência e nutrição dos diferentes tripanossomatídeos, muitas enzimas glicosomais, como a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, a hexoquinase, a fosfoglicose isomerase e a fosfofrutoquinase, já têm sido alvos promissores para o desenvolvimento de novos fármacos (Barros-Alvarez *et al.*, 2014).

A biogênese dos glicosomos envolve diversos processos, como a transferência de proteínas a partir da matriz, a mobilização de lipídios para a formação das membranas, a incorporação de proteínas à membrana da organela e a divisão desta (Galland e Michels, 2010). Neste processo, 31 membros da família PEX desempenham papéis fundamentais nos diversos estágios de desenvolvimento dessas organelas. A importação de proteínas nos glicosomos ocorre principalmente por meio de duas vias: o sinal de direcionamento de peroxissomos tipo 1 (PTS-1) na extremidade carboxílica e o sinal de direcionamento tipo 2 (PTS-2) na extremidade amino-terminal, embora algumas proteínas possam ser direcionadas aos peroxissomos/glicosomos sem esses sinais (Moyersoer *et al.*, 2004). No citosol, as proteínas com sequências PTS são reconhecidas por receptores específicos, sendo PEX5 para PTS1 e PEX7 para PTS2 (Galland e Michels, 2010). A importação dessas proteínas envolve a circulação dos receptores entre o citosol e as organelas, permitindo múltiplas rodadas de importação. A etapa subsequente é a interação dos receptores carregados com o complexo de acoplamento na membrana peroxissomal/glicosomal, que inclui a PEX13 e a PEX14, e, em alguns organismos, proteínas adicionais como a PEX17 em *S. cerevisiae* (Brennand, Rigden e Michels, 2012; Verplaetse, Rigden e Michels, 2009).

Os estudos sobre a translocação de metabólitos através da membrana dos glicosomos, principalmente em *T. brucei*, revelam a existência de dois grupos principais de transportadores: transportadores ABC e proteínas da família de transportadores mitocondriais (MCF), além de

proteínas formadoras de poros (Gualdrón-López et al., 2013). Acredita-se que estes transportadores sejam responsáveis pela entrada de moléculas de maior tamanho, incluindo ácidos graxos e cofatores tais como ATP e NAD⁺, enquanto as moléculas menores, como os intermediários glicolíticos e íons inorgânicos, atravessam os poros membranares (Gualdrón-López et al., 2013).

Na recente revisão de Quiñones *et al.* (2020) sobre os glicossomos de *T. cruzi*, foi demonstrado que, embora haja uma extensa rede metabólica nessas organelas (Figura 9), para a maioria das vias, apenas segmentos específicos estão presentes, com as enzimas distribuídas tanto nos glicossomos quanto no citosol. Essa organização sugere uma integração do metabolismo glicossômico com o metabolismo geral do parasito. Tal disposição pode representar uma adaptação evolutiva para aprimorar a eficiência e a regulação do metabolismo, visto que essa separação permitiria um controle mais detalhado dos processos metabólicos, facilitando a adaptação do parasito a diferentes condições ambientais e desafios nutricionais.

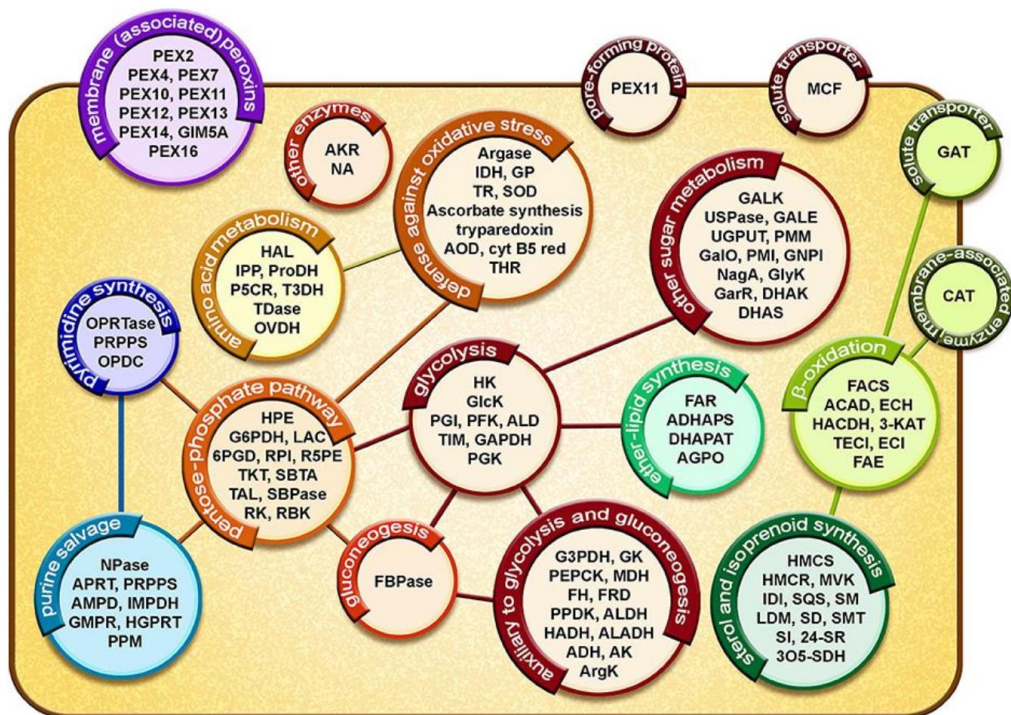


Figura 9. Representação esquemática do proteoma glicossômico de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. As proteínas envolvidas em vias metabólicas, transporte de soluto e biogênese do glicossomo estão representadas em círculos. As linhas representam conexões entre diferentes processos por meio da troca de metabólitos (Quiñones *et al.*, 2020).

O estudo do proteoma dos glicossomos em tripanossomatídeos tem avançado com diversas metodologias de isolamento e purificação das organelas precedendo a análise proteômica. O proteoma dos glicossomos de *T. cruzi* foi recentemente determinado para as organelas purificadas de epimastigotas, pela metodologia convencional de enriquecimento da organela (Acosta *et al.*, 2019). Em estudos realizados em *L. donovani*, utilizando uma fração glicossômica enriquecida através de um gradiente de densidade, os pesquisadores foram capazes de identificar proteínas envolvidas em diversos processos metabólicos, incluindo o metabolismo de carboidratos, lipídeos e ácidos nucleicos (Jamhade *et al.*, 2015). Uma proporção significativa, 41,8%, dessas proteínas foram classificadas como hipotéticas e sem função conhecida até o momento, o que destaca a importância da pesquisa para elucidar a funcionalidade e o potencial terapêutico dos glicossomos em protozoários patogênicos (Jamhade *et al.*, 2015).

Apesar desses e outros avanços no estudo dos glicossomos de tripanossomatídeos, algumas limitações das técnicas de isolamento e purificação da organela precedendo a análise proteômica, como a contaminação potencial com outras organelas, evidencia a necessidade de utilização de métodos mais eficientes para tal análise.

1.3.2. O núcleo

O núcleo dos tripanossomatídeos desempenha funções essenciais na regulação e expressão genética e possui características peculiares quando comparado com os de outros eucariotos. Estes organismos exibem um grande número de genes organizados de forma policistrônica e uma regulação pós-transcricional única, com processamento extensivo de RNA, levando a uma fraca correlação entre mRNA e níveis de proteína (Araújo e Teixeira, 2011).

A composição proteica do núcleo dos tripanossomatídeos é notável por várias proteínas exclusivas ou altamente especializadas. Proteínas associadas à regulação da expressão gênica, como fatores de transcrição e RNA polimerases, apresentam variações significativas em comparação com outros eucariotos (Schenkman, Pascoalino e Nardelli, 2011). Além disso, proteínas envolvidas no processamento do RNA, como as responsáveis pelo splicing alternativo e edição de RNA, são cruciais devido à natureza policistrônica da transcrição (Araújo e Teixeira, 2011). O núcleo dos tripanossomatídeos também possui mecanismos de reparo de DNA e manutenção da integridade genômica que são essenciais para a sobrevivência do

parasito em ambientes hostis, como os encontrados dentro do hospedeiro humano (Schenkman, Pascoalino e Nardelli, 2011).

Os estudos proteômicos do núcleo de tripanossomatídeos também tem avançado. O trabalho de Santos e colaboradores (2015) representou um grande avanço neste campo ao relatar, pela primeira vez, o isolamento e a análise do proteoma da fração nuclear de *T. cruzi*. Nesse estudo, foram identificadas proteínas envolvidas em processos biológicos nucleares vitais: centrinas, histonas, proteínas nucleolares, proteínas de montagem de nucleossomos, proteínas de ribossomos, fatores de transcrição e proteínas nucleares estruturais. No mesmo contexto, Goos *et al.* (2017) forneceram informações valiosas sobre o proteoma nuclear de *T. brucei*, revelando proteínas enriquecidas no núcleo e envolvidas em vários processos do DNA nuclear e metabolismo de RNA, por exemplo, splicing de mRNA, remodelação e transcrição da cromatina. Esse conjunto de dados é útil para desvendar ainda mais os processos nucleares nos tripanossomas (Goos *et al.*, 2017).

Até o momento atual, não foram identificados estudos proteômicos exclusivamente do núcleo de *L. infantum*. Devido à proximidade filogenética entre *T. cruzi* e *L. infantum*, espera-se que eles tenham organização nuclear semelhante, embora sejam notadas diferenças devido a ciclos de vida distintos, organizações celulares e às adaptações específicas para sobreviver em diferentes hospedeiros. Portanto, uma análise proteômica comparativa entre os dois organismos poderia ser útil para desvendar mecanismos de adaptação metabólica entre este grupo.

1.4. Técnicas de marcação dependentes de proximidade em proteômica

As metodologias tradicionais para análise proteômica de compartimentos celulares abrangem o enriquecimento do compartimento-alvo, seguido pela identificação de proteínas por espectrometria de massa. No entanto, a obtenção de organelas puras e intactas costuma ser um desafio com as técnicas de purificação convencionais, o que torna essas avaliações problemáticas (Vélez-Ramírez *et al.*, 2021).

Na última década, a marcação por proximidade (MP) surgiu como uma técnica inovadora na biologia molecular. Esse método se baseia em enzimas que geram um radical reativo de curta duração, que marca covalentemente as proteínas vizinhas. Em seguida, as proteínas biotinizadas podem ser purificadas usando estreptavidina, ou anticorpos anti-biotina, e analisadas por espectrometria de massa e bioinformática. Na MP, o gene que codifica a enzima de marcação é fusionado com uma proteína de isca para estudar as interações proteína-

proteína ou com um peptídeo de sinal para direcionar a proteína para um compartimento celular específico, permitindo a análise de proteínas parceiras em interação ou o mapeamento de proteínas em regiões subcelulares específicas, respectivamente (Trinkle-Mulcahy, 2019).

As enzimas MP podem ser amplamente categorizadas em duas famílias: biotina ligases e peroxidases. O método pioneiro BioID, introduzido em 2012, surgiu da família da biotina ligase, utilizando uma forma mutante da enzima biotina ligase BirA de *Escherichia coli* (BirA*), para permitir a biotinilação dependente de proximidade de proteínas em células eucarióticas (Roux *et al.*, 2012). Na presença de ATP e biotina, a BirA* biotinila as proteínas catalisando a conversão da biotina em um radical reativo, o biotinil-5'-AMP, que marca especificamente as aminas primárias expostas dos resíduos de lisina (Choi-Rhee, Schulman e Cronan, 2004). Embora eficaz, a BioID tem suas limitações, incluindo a cinética lenta que exige durações prolongadas de marcação, às vezes até 24 horas, tornando-a menos adequada para o estudo da dinâmica celular rápida (Choi-Rhee, Schulman e Cronan, 2004; Uezu *et al.*, 2016). A BioID2 foi introduzida em 2016, apresentando uma ligase mais compacta que é mais seletiva, eficiente e adaptável no raio de biotinilação (Kim *et al.*, 2016). As inovações subsequentes, TurboID e miniTurbo, evoluíram para otimizar a MP, reduzindo o tempo de marcação para apenas 10 minutos e aumentando a adaptabilidade em vários organismos (Branon *et al.*, 2018). No entanto, a TurboID, embora rápida, pode mostrar atividade basal devido à biotina endógena (Kreis *et al.*, 2023).

A família da peroxidase introduziu métodos como a APEX em 2013, uma peroxidase de ascorbato que catalisa a oxidação de biotina-fenol para o radical biotina-fenoxil de vida curta (<1 ms) com a resolução temporal de 1 minuto para marcação de proteínas (Rhee *et al.*, 2013). Este radical fenólico gerado pode se ligar covalentemente a aminoácidos ricos em elétrons em proteínas endógenas próximas (Figura 10). Uma versão melhorada da APEX, chamada APEX2, possui mutações adicionais, substituições de aminoácidos específicos, que permitem uma maior atividade e sensibilidade para marcação, além da melhora da estabilidade das proteínas marcadas com APEX2 (Huang *et al.*, 2019; Lam *et al.*, 2015). Células que expressam a APEX são incubadas com biotina-fenol por 30 minutos a 1 hora, seguidas da exposição ao H₂O₂ por 1 minuto para induzir a biotinilação. A principal vantagem da APEX sobre a BioID é a cinética de marcação significativamente mais rápida (minutos x horas). Isso permite uma maior precisão na identificação das proteínas, visto que uma menor taxa de difusão de biotina pode levar a uma menor marcação cruzada de proteínas distantes. Além disso, essa taxa de marcação mais rápida

permite a captura de interações proteicas transitórias ou de curta duração, o que é especialmente útil para investigar interações dinâmicas ou eventos rápidos nas células (Trinkle-Mulcahy, 2019). Ademais, APEX não atua na biotina endógena. Portanto, a APEX oferece uma abordagem mais precisa e dinâmica para investigar as interações proteicas à nível subcelular.

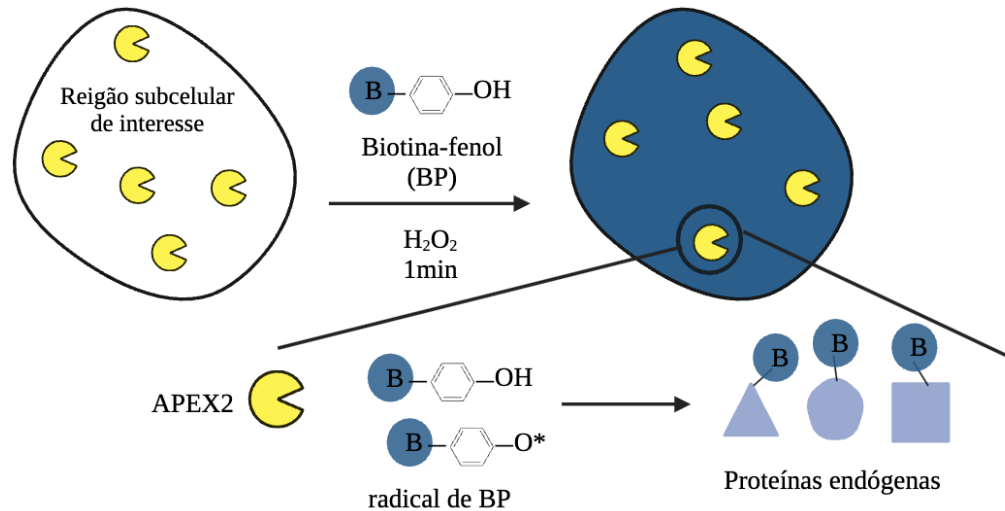


Figura 10. Esquema mostrando a biotilação catalisada por APEX2. Este exemplo mostra a APEX2 (*Pac-Man* amarelo) direcionada a alguma região subcelular de interesse (Criada pela autora, 2023).

Em 2023, a implementação da APEX3 (Becker, Auerbach e Harris, 2023) foi introduzida com o intuito de superar uma limitação da APEX2, caracterizada por uma tendência na localização citosólica. A APEX2 apresentava um sinal de exportação nuclear (NES) no carboxi-terminal. A inovação da APEX3 envolveu a alteração do NES, culminando em uma metodologia de MP que assegura uma distribuição mais uniforme de proteínas-alvo na célula (Becker, Auerbach e Harris, 2023).

Embora a rapidez da APEX seja benéfica para a detecção de interações moleculares rápidas, sua dependência de H₂O₂, um composto citotóxico, pode ser problemática em condições específicas. A seleção de um método de MP adequado é complexa, muitas vezes dependendo do compartimento subcelular específico ou dos processos celulares que estão sendo estudados. Isso pode exigir que os pesquisadores realizem avaliações empíricas para identificar a enzima mais adequada às suas necessidades de pesquisa. Fatores como a dinâmica da organela, a possível citotoxicidade e a escala de tempo das interações em questão devem ser levados em conta.

1.4.1. Aplicação das técnicas de marcação por proximidade para mapeamento subcelular de tripanossomatídeos

Em relação aos estudos que empregaram técnicas de MP para o mapeamento subcelular em tripanossomatídeos, o primeiro uso da abordagem BioID para mapear proteínas em uma estrutura não caracterizada de tripanossomatídeo foi relatado em 2013 (Morriswood *et al.*, 2013). Esse método foi efetivamente utilizado para identificar novos componentes do bilobo, uma estrutura do citoesqueleto em *T. brucei*, e marcou um avanço significativo na compreensão desta estrutura, demonstrando a utilidade da BioID na exploração de constituintes estruturais pouco explorados (Morriswood *et al.*, 2013). Posteriormente, outra pesquisa expandiu essa abordagem para investigar os componentes do corpo basal de *T. brucei*, uma estrutura crucial na montagem do axonema flagelar (Dang *et al.*, 2017). Em 2020, um estudo explorou ainda mais a região flagelar de *T. brucei* usando BioID (An *et al.*, 2020). A identificação de certas proteínas e suas interações proteicas, além da sua função na morfogênese celular, destacou a importância do domínio da zona de aderência do flagelo na manutenção da morfologia celular (An *et al.*, 2020). Vélez-Ramírez *et al.* (2021) inovaram ao introduzir a APEX2, pela primeira vez em um tripanossomatídeo, para resolver subdomínios de flagelo em *T. brucei*. Ao diferenciar as proteínas em vários subdomínios flagelares, esse estudo forneceu uma visão mais profunda da composição proteica dessas estruturas, incluindo a identificação de proteínas específicas da ponta do flagelo (Vélez-Ramírez *et al.*, 2021). Mais recentemente, Won e colaboradores utilizaram BioID para identificar proteínas flagelares no parasito *T. cruzi*. Esse estudo marcou o primeiro uso desse método em *T. cruzi* (Won, Baublis e Burleigh, 2023). O conjunto de dados proteômicos gerados neste trabalho ofereceu uma base essencial para a investigação do flagelo de *T. cruzi* e sua função na mediação de interações com diversos ambientes do hospedeiro (Won, Baublis e Burleigh, 2023).

Coletivamente, esses estudos enfatizam a eficiência das técnicas de marcação por proximidade, como BioID e APEX2, na elucidação das características dos compartimentos subcelulares em tripanossomatídeos. Esses estudos contribuem significativamente para uma compreensão mais detalhada da estrutura celular desses organismos.

2. JUSTIFICATIVA

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs), entre as quais se destacam a doença de Chagas e as leishmanioses, constituem um desafio significativo para a saúde pública mundial. De acordo com estimativas recentes da OMS, cerca de 1,7 bilhão de indivíduos são afetados por DTNs, com especial atenção para as patologias provocadas pelos parasitos da família Trypanosomatidae. A crescente resistência parasitária aos tratamentos atuais, os efeitos colaterais adversos e a ineficácia dos medicamentos na fase crônica das doenças ressaltam a urgência por novas terapias. Tal necessidade é exacerbada pela alocação insuficiente de recursos a nível global para o combate às DTNs.

A análise proteômica de compartimentos subcelulares emerge como um método promissor para aprofundar o entendimento da biologia celular dos tripanossomatídeos. A especialização das organelas desses organismos, como os glicossomos e o núcleo, representa potenciais alvos terapêuticos para o desenvolvimento de fármacos baseados em proteínas. A metodologia de marcação proteica baseada em APEX2 representa uma abordagem inovadora e precisa para o mapeamento proteico dessas organelas, realizando-se experimentos *in vivo* que preservam o contexto fisiológico dos organismos. A aplicação desta técnica, no entanto, ainda não foi explorada em glicossomos ou núcleos de tripanossomatídeos. A utilização da APEX2 para a investigação dessas organelas em *T. cruzi* e *L. infantum* poderia, portanto, oferecer uma contribuição significativa à compreensão da biologia desses parasitos e à identificação de novos alvos terapêuticos.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho pretendeu implementar e explorar o sistema de marcação por proximidade baseado em APEX2 para revelar as proteínas de dois compartimentos subcelulares em *L. infantum* e *T. cruzi*: o glicossomo e o núcleo.

Para isso, as seguintes etapas foram propostas:

- 1) Produzir transfectantes que expressem as proteínas APEX2 e mNeonGreen fusionadas aos peptídeos sinais de endereçamento ao glicossomo e ao núcleo;

- 2) Avaliar a expressão das proteínas por *Western blot* e análises de imunofluorescência nos clones transfectados;
- 3) Realizar o ensaio de biotilação de proximidade baseado em APEX2 em células vivas;
- 4) Confirmar, por meio de *Western blot* e imunofluorescência, o ensaio de biotilação baseado em APEX2.

A figura 11 mostra o conjunto de experimentos que foram conduzidos para *L. infantum* e *T. cruzi*.

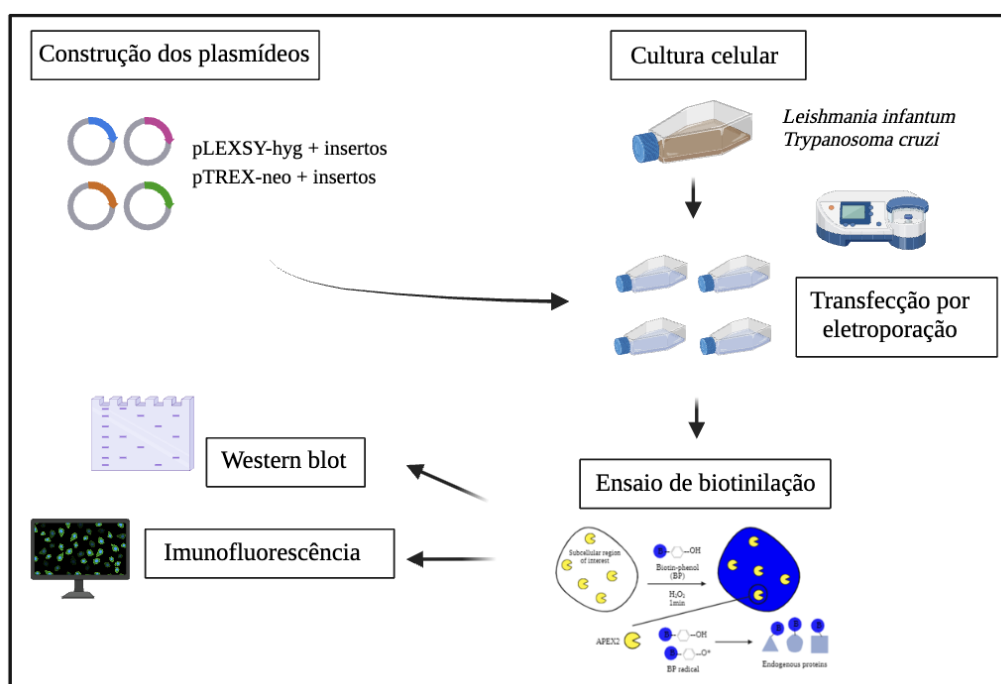


Figura 11. Fluxograma do conjunto de experimentos conduzidos no projeto.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Cultura celular de *L. infantum* e *T. cruzi*

Formas promastigotas de *L. infantum* selvagem foram cultivadas em meio de inseto Schneider (Sigma Aldrich) suplementado com 50 µg/mL de gentamicina, penicilina\estreptomicina e 10% (v/v) de soro fetal bovino (SBF) inativado, a 27 °C. Os parasitos transfectados com cassetes contendo o gene HygR (gene que confere resistência à higromicina) foram cultivados no meio acima descrito acrescido de 100 µg/mL de higromicina

B (Sigma Aldrich). A passagem das culturas era realizada a cada dois dias para manutenção dos clones.

Formas epimastigotas de *T. cruzi*, da cepa CL-Brener, foram cultivados em meio Liver Infusion Triptose (LIT) suplementado com 5% (v/v) de SBF adicionado de penicilina\estreptomicina, a 27 °C. Os parasitos transfectados com os cassetes contendo o gene que confere resistência à neomicina foram cultivados no meio acima descrito acrescido de 200 µg/mL de G416. A passagem das culturas era realizada uma vez por semana.

4.2. Construção dos plasmídeos de expressão episomal

A construção dos insertos (Tabelas 1 e 2 do Apêndice) foi realizada baseada na fusão dos peptídeos sinais (PSs) com a sequência da APEX2 ou mNeonGreen. Os PSs foram utilizados para direcionar as proteínas a duas organelas específicas: núcleo (NLS) e glicosomo (PTS1) (Durrani *et al.*, 2020). Os PSs foram fusionados *downstream* à sequência da APEX2 ou mNeonGreen. Para cada construção foi igualmente adicionada uma *tag* de 3 hemaglutininas (HA) na região N-terminal, antes do PS, para facilitar a confirmação da expressão da proteína pelo parasito na respectiva organela por *Western blot* e imunofluorescência. Os insertos foram sintetizados (Genone), e clonados em vetores comerciais pUC57, flanqueados por *BglIII* e *NotI*.

Para o procedimento de sub-clonagem, as enzimas de restrição *BglIII* (*New England Biolabs Inc.*) e *NotI* (*New England Biolabs Inc.*) foram utilizadas, conforme instruções do fabricante. Após a digestão dos vetores pUC57, os insertos foram analisados em gel de agarose 1%, com a excisão manual dos mesmos. Após a excisão, as bandas do gel contendo os insertos foram extraídos com o uso do kit de purificação *MinElute Gel Extraction Kit* (QIAGEN).

A fim de obter as construções APEX2-HA-PTS1-pLEXSY-hyg2, APEX2-HA-NLS-pLEXSY-hyg2, mNeonGreen-HA-PTS1-pLEXSY-hyg2 e mNeonGreen-HA-NLS-pLEXSY-hyg2, o plasmídeo pLEXSY-hyg2 (Figura 12) contendo seu *stuffer* foi previamente digerido com as enzimas de restrição *BglIII* e *NotI* (Jena Bioscience). Os plasmídeos digeridos foram excisados do gel de agarose 1% (m/v) e purificados com o kit *MinElute Gel Extraction Kit* (QIAGEN) conforme recomendação do fabricante. Os insertos foram amplificados por PCR com iniciadores contendo as sequências dos sítios de restrição *BglIII* e *NotI* (Tabela 1). A ligação dos insertos ao vetor pLEXSY foi realizada com o uso da enzima T4 DNA ligase (EUROMEDEX), conforme instruções do fabricante. Foram utilizados 80 ng de vetor digerido

e 24 ng de inserto purificado em uma reação final de 20 μ L incubada a 22 °C por 10 min ou 16 h a 4 °C.

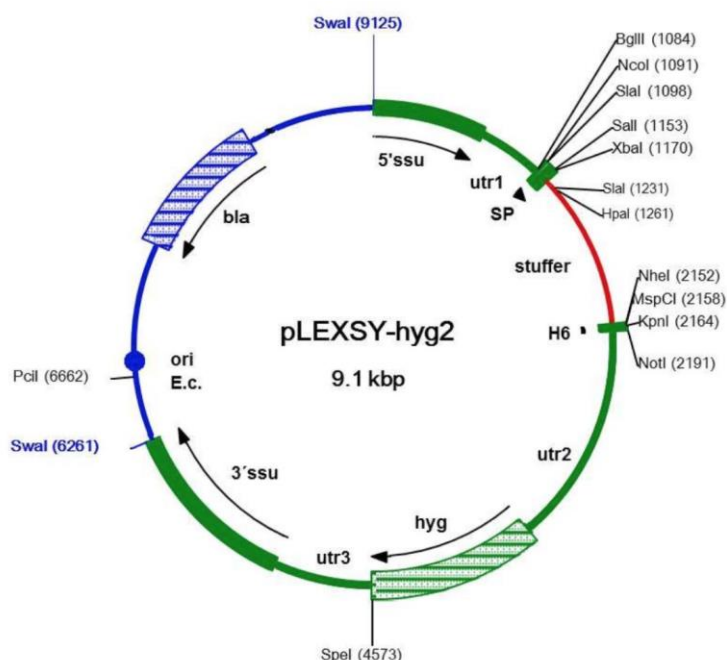


Figura 12. Mapa do vetor pLEXSY-hyg2 utilizado nas etapas de clonagem molecular para expressão epissomal em *Leishmania infantum*. O plasmídeo contém a marca de seleção hyg, que confere resistência à droga higromicina. Imagem retirada do site da JENA Bioscience (<https://www.jenabioscience.com/lexsy-expression/lexsy-configurations/vectors/ege-272-plexsy-hyg2-1>).

Tabela 1. Iniciadores utilizados para amplificação dos genes APEX2-HA-NLS, APEX2-HA-PTS1, mNeonGreen-HA-PTS1 e mNeonGreen-HA-NLS para subsequente ligação no vetor pLEXSY-hyg2.

Iniciador	Sequência
APEX2PTS1 forward	5'- tacataAGATCTGCCATGGGCAAGTCGTATCCGAC – 3' a, b, c
APEXPTS1 e mNeonGreenPTS1 reverse	5' – atatacGCGGCCGCTACAGTTACTA – 3' d, e
APEX2NLS forward	5'- tacataAGATCTGCCATGGGGAAGTCATATCCGACCGTC – 3' a, b, c
APEX2NLS e mNeonGreenNLS reverse	5'- atatacGCGGCCGCTAGACTTTCC – 3' d, f
mNeonGreenPTS1 forward	5' – tacataAGATCTGCCATGGTGAGTAAGGGCGAGG – 3' a, b, g
mNeonGreenNLS forward	5'- tacataAGATCTGCCATGGTTTCAAAGGGGGAAGAGGATA – 3' a, b, g

- ^a A sequência sublinhada indica o sítio de restrição de BglIII.
^b A sequência em itálico indica o consenso triplet pré-ATG (GCC).
^c A sequência em negrito indica o início do gene da APEX2.
^d A sequência sublinhada indica o sítio de restrição de NotI
^e A sequência em negrito indica o fim da sequência gênica HA + PTS1 (fusionado *downstream* à sequência da APEX2 ou mNeonGreen).
^f A sequência em negrito indica o fim da sequência NLS (fusionado downstream à sequência da APEX2 ou mNeonGreen).
^g A sequência em negrito indica o início do gene da mNeonGreen.

Para construção dos plasmídeos pTREX-neo (Figura 13), os insertos obtidos pela subclonagem do vetor pUC57 foram amplificados com iniciadores contendo as sequências dos sítios de restrição das enzimas *XhoI* e *XbaI*, enzimas presentes no vetor pTREX-neo (Tabela 2). A fim de obter as construções APEX2-HA-PTS1-pTREX-neo, APEX2-HA-NLS-pTREX-neo, mNeonGreen-HA-PTS1-pTREX e mNeonGreen-HA-NLS-pTREX-neo, o plasmídeo pTREX-neo-tomato foi previamente digerido com as enzimas de restrição *XhoI* e *XbaI*. A banda maior correspondendo ao pTREX-neo sem o *stuffer* Tomato foi extraída do gel e a clonagem se deu pelo mesmo protocolo descrito anteriormente para pLEXSY-hyg.

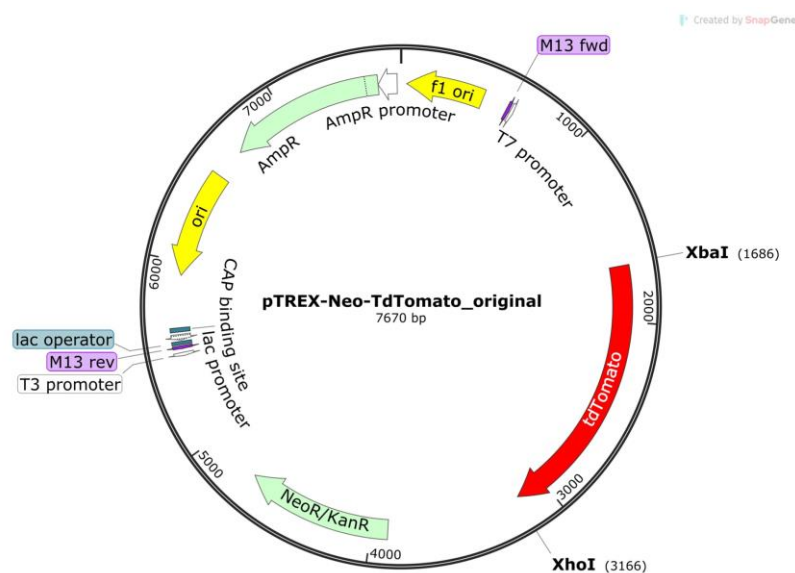


Figura 13. Mapa do vetor pTREX-neo utilizado nas etapas de clonagem molecular para expressão episomal em *Trypanosoma cruzi*. O plasmídeo contém a marca de seleção neo, que confere resistência à droga neomicina. Imagem gerada pelo software SnapGene.

Tabela 2. Iniciadores utilizados para amplificação dos genes APEX-HA-NLS, APEX-HA-PTS1, mNeonGreen-HA-PTS1 e mNeonGreen-HA-NLS para subsequente ligação no vetor pTRES-neo.

Iniciador	Sequência
APEX2PTS1 forward	5'- tacata <u>TCTAGA</u> AATGGGCAAGTCGTATCCGACA – 3' ^{a, b}
APEXPTS1 e mNeonGreenPTS1 reverse	5' – atatac <u>CTCGAG</u> CTACAGTTTACTAGCATAGTCCG – 3' ^{c, d}
APEXNLS forward	5' – tacata <u>TCTAGA</u> AATGGGGAAGTCATATCCGACCGTC – 3' ^{a, b}
APEXNLS e mNeonGreenNLS reverse	5' – atatac <u>CTCGAG</u> CTAGACTTTCCGCTTCTTCTTC – 3' ^{c, e}
mNeonGreenPTS1 forward	5' – tacata <u>TCTAGA</u> AATGGTGAGTAAGGGCGAGGAA – 3' ^{a, f}
mNeonGreen NLS forward	5' – tacata <u>TCTAGA</u> AATGGTTTCAAAGGGGGAAGAGGATA – 3' ^{a, f}

^a A sequência sublinhada indica o sítio de restrição de XbaI.

^b A sequência em negrito indica o início do gene da APEX2.

^c A sequência sublinhada indica o sítio de restrição de XhoI.

^d A sequência em negrito indica o fim da sequência gênica (HA-PTS1) fusionada downstream à sequência da APEX2 ou mNeonGreen.

^e A sequência em negrito indica o fim da sequência NLS (fusionada downstream à sequência da APEX2 ou mNeonGreen).

^f A sequência em negrito indica o início do gene da mNeonGreen.

4.3. Transformação bacteriana

Após a ligação, bactérias *E. coli* NovaBlue competentes foram transformadas por choque térmico a 42 °C por 30 segundos com 2,5 µL das ligações descritas anteriormente seguidas de incubação no gelo por 2 min. Em seguida, as bactérias cresceram em estufa biológica, em meio Luria-Bertani (LB) a 37°C por 1 h com agitação constante. Posteriormente, as bactérias foram plaqueadas em meio LB ágar com 100 µg/mL carbenicilina. As placas foram incubadas a 37 °C por 16 h em estufa biológica.

No dia seguinte, cinco colônias de cada construção foram selecionadas para confirmação da clonagem por PCR de colônia. Brevemente, uma mínima fração de cada colônia selecionada foi adicionada a um microtubo contendo *Thermo Scientific PCR Master Mix* e os iniciadores que flanqueiam o inserto ou o plasmídeo a 1 µM. A reação de PCR foi programada da seguinte forma: 95 °C por 5 minutos para desnaturação inicial, 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 68 °C por 30 segundos para anelamento dos iniciadores e 72 °C para extensão dos produtos de PCR e, por fim, 72 °C por 7 min para a extensão final. Para análise dos clones positivos, 2 µL de cada reação de PCR foi carregada em um gel de agarose 1 % (m/v).

Uma colônia positiva de cada construção foi inoculada em 20 mL de meio LB com 100 µg/mL carbenicilina e crescidas a 37 °C por 16 h com agitação constante de 200 rpm.

4.4. Preparação plasmidial

A extração do DNA plasmidial a partir da cultura de cada colônia positiva inoculada foi realizada a partir do kit *QIAprep Spin Miniprep Kit* da QIAGEN. Brevemente, 5mL da cultura bacteriana foi centrifugada a 7.000 g por 10 minutos à temperatura ambiente. Após centrifugação, o pellet bacteriano foi ressuscitado em 250 µL do tampão P1 e transferido à um tubo de microcentrífuga. 250 µL do tampão P2 foi posteriormente adicionado e misturado completamente invertendo o tubo 6 vezes até a solução se tornar clara. Após essa reação, 350 µL do tampão N3 foi adicionado e a solução misturada invertendo o tubo. Em seguida, o tubo foi centrifugado por 10 minutos, 17.900 g, à temperatura ambiente. O sobrenadante da etapa anterior foi aplicado à coluna *QIAprep spin* por decantação e centrifugado por 60 segundos. O *flow-through* foi descartado e a coluna foi lavada 2 vezes. A primeira lavagem foi realizada com 0,5 mL do tampão PB e a segunda lavagem com 0,75 mL do tampão PE. Finalmente, as colunas foram posicionadas com um microtubo de 1,5 mL e o DNA eluído com 50 µL de tampão EB (10mM Tris-HCl, pH 8.5). As minipreparações foram digeridas com *Bgl*II e *Not*I para uma segunda confirmação da clonagem.

As sequências também foram confirmadas por sequenciamento realizado pela empresa *Eurofins Genomics*.

4.5. Transfecção em *L. infantum* e *T. cruzi*

Todas as construções plasmídicas foram utilizadas de forma episomal para transfecção, não sendo necessária a digestão do plasmídeo para integração genômica. Imediatamente antes da transfecção, 8 µg de DNA de cada construção plasmidial foram pasteurizados a 65 °C em banho seco por 30 minutos.

Para transfecção do tipo nucleofecção, foi utilizado o kit de transfecção *Human T Cell Nucleofector™* da Lonza. Brevemente, foram utilizados 1×10^7 formas promastigotas de *L. infantum* e 1×10^7 formas epimastigotas de *T. cruzi* em fase exponencial, por condição. Os parasitos foram centrifugados a 2.000 g por 1 minuto e o pellet foi ressuscitado em 82 µL da Solução 1, 18 µL da solução suplemento 1 e 10 µL do plasmídeo (correspondendo a 8 µg). O conteúdo do microtubo foi transferido para uma cubeta específica do kit, que foi submetida

posteriormente a um pulso através do sistema de eletroporação Lonza Nucleofector™ Transfection 2b Device (com o programa U-033). Após o pulso, os parasitos foram transferidos para 10 mL de meio Schneider suplementado com 20% de SBF (formas promastigotas de *L. infantum*) ou meio LIT suplementado com 10% de SBF (formas epimastigotas de *T. cruzi*) e incubados a 27 °C por 24 h. Em seguida os parasitos *L. infantum* foram selecionados com 100 µg/mL higromicina B (Sigma Aldrich) e os parasitos *T. cruzi* com 200 µg/mL de G418. Para as formas promastigotas de *L. infantum*, após a morte do controle negativo (transfectado apenas com os tampões, sem plasmídeo), aproximadamente duas semanas, os parasitos transfectados foram clonados por diluição exaustiva em placas de 96 poços. Dois clones de cada construção foram recuperados, mantidos sob pressão antibiótica e submetidos às análises posteriores. As formas epimastigotas de *T. cruzi*, após transfectadas, não foram clonadas. A figura 14 mostra o protocolo de transfecção utilizado.

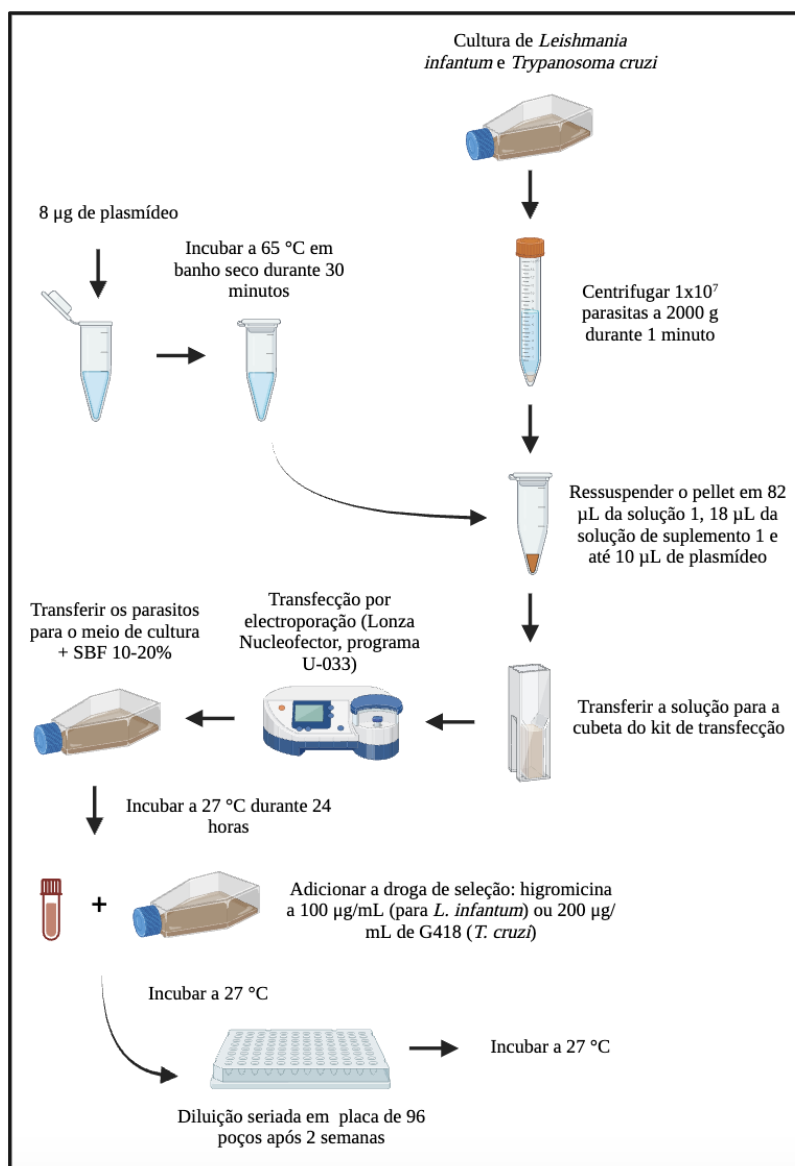


Figura 14. Fluxograma do protocolo de transfecção utilizado para *Leishmania infantum* e *Trypanosoma cruzi* a partir do kit de transfecção “Human T Cell Nucleofector® - Lonza”. Solução 1 e solução de suplemento 1 referem-se às soluções disponibilizadas no kit.

4.6. Ensaio de biotinição

Para cada condição foram utilizados 1×10^8 parasitos. As culturas dos parasitos transfectados foram centrifugadas a 2.000 g por 5 minutos e ressuspendidas em 5 mL de meio Schneider ou LIT, seguida pela adição do substrato da APEX2, biotina-fenol (Sigma Aldrich) a 5 mM, e incubação por 1 h a 27 °C em uma estufa biológica. Posteriormente, foi adicionado o agente oxidante/catalisador da reação, H_2O_2 (Sigma Aldrich), a 1mM para que a biotinição das proteínas organelares fosse realizada. Para interromper a reação de biotinição, as células foram lavadas 2 vezes com uma solução quencher (10 mM de azida de sódio, 10 mM de

ascorbato de sódio e 5 mM de Trolox) em PBS. Duas condições foram utilizadas para analisar a expressão da APEX2-HA e a potencial biotinylação dos compartimentos celulares: ausência de biotina-fenol/presença de H₂O₂ (BP-/H₂O₂+); e presença de biotina-fenol/presença de H₂O₂ (BP+/H₂O₂+). Foi realizado, em paralelo, um ensaio com extratos de parasitos lisados após ciclos de congelamento e descongelamento, para confirmação da atividade da APEX2 presente fora do compartimento subcelular. As mesmas condições citadas acima foram utilizadas para este ensaio.

Após a reação de biotinylação, parte dos parasitos mutantes foram preparados para que as proteínas fossem analisadas por *Western blot* e *estreptavidina-blot*, e outra parte foi utilizada para os ensaios de imunofluorescência (IFA). A figura 15 representa o protocolo utilizado para este ensaio.

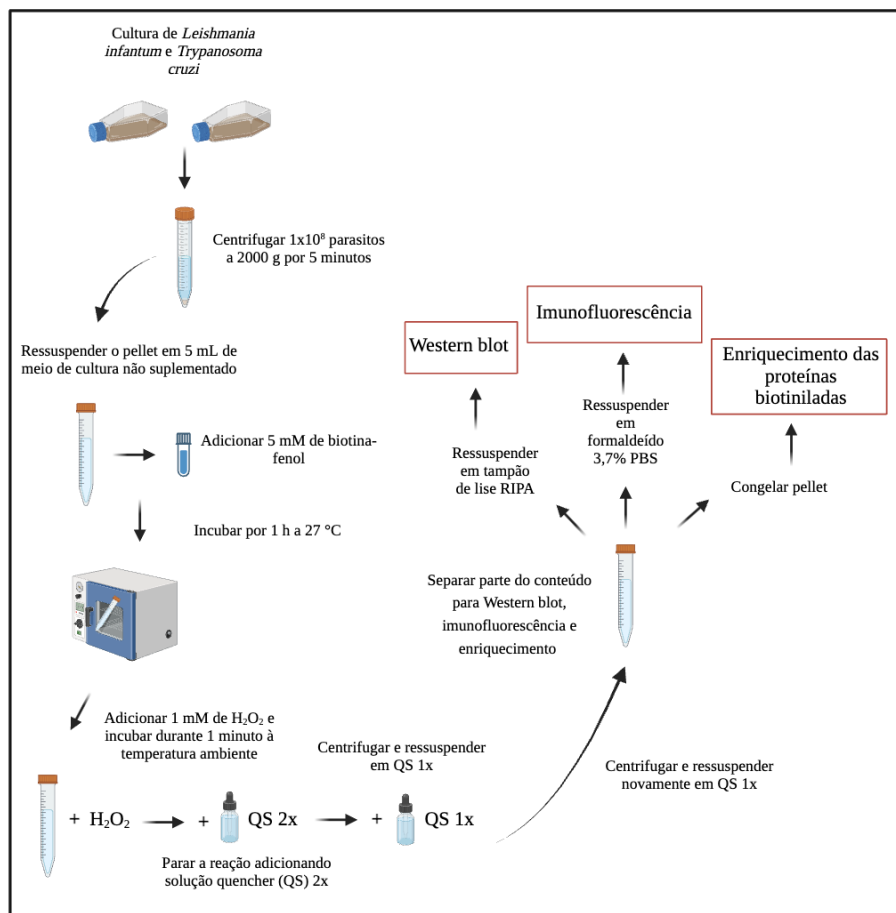


Figura 15. Fluxograma ilustrando o protocolo utilizado para o ensaio de biotinylação realizado em extratos de parasitos *Leishmania infantum*.

4.7. Western blot e estreptavidina-blot

Para confirmação da expressão dos mutantes epissomais e biotinição das proteínas organelares, os parasitos foram ressuspensos em tampão de lise RIPA [50 mM de Tris-HCl pH 7,0, 150 mM de NaCl, 0,1% (m/v) de SDS, 0,5% (m/v) de deoxicolato de sódio, 1% (v/v) de Triton X-100, 1 pastilha de inibidor de protease (cOmplete™, EDTA-free protease inhibitor cocktail, Roche), 10 mM de azida de sódio, 10 mM de ascorbato de sódio e 5 mM de Trolox] logo após o ensaio de biotinição, na proporção de 4 volumes da solução RIPA para 1 volume de pellet de parasitos. As amostras foram vortexadas, incubadas no gelo por 5 min e centrifugadas a 12.000 g por 10 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram transferidos a novos microtubos. Os extratos proteicos foram analisados por SDS-PAGE, transferidos para membranas de nitrocelulose e corados com 0,1% (m/v) Ponceau S em 5% (v/v) de ácido acético.

Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com leite 5% em PBS. Para análise da expressão da proteína APEX2, utilizou-se o anticorpo α -HA conjugado com a HRP (*horseradish peroxidase*) (Invitrogen™, referência: 2-2.2.14) na diluição 1:7.500. Para verificação das proteínas organelares biotiniladas, foi utilizada a estreptavidina-HRP (Merck Millipore, referência: 18-152) na diluição 1:30.000. Após as devidas incubações, todas as membranas de nitrocelulose foram incubadas por 1 min com os substratos ECL (Bio-rad) e/ou *Clarity Max* ECL (Bio-rad) e expostas no filtro de quimioluminescência e colorimétrico do equipamento ChemiDoc (Bio-rad) ou L-PIX CHEMI (Loccus), para a obtenção das imagens.

4.8. Ensaio de imunofluorescência

Além de validar a expressão das proteínas APEX2-HA-NLS e APEX2-HA-PTS1 nas diferentes linhagens, parasitos *L. infantum* foram submetidos à análise de microscopia de fluorescência para confirmar o direcionamento correto das proteínas para as organelas de interesse (núcleo ou glicossomo). O mesmo IFA foi usado para analisar as proteínas biotiniladas após o ensaio de biotinição. A preparação dos parasitos para IFA foi realizada da seguinte forma: inicialmente, os parasitos foram suspensos em formaldeído a 3,7% em PBS. Em seguida, eles foram centrifugados a 500 g por 4 minutos, suspensos em Triton X-100 a 0,1% e incubados no gelo por 10 minutos. Posteriormente, foi adicionada glicina 0,1 M e novamente incubados por 10 minutos no gelo. Foi usado um total de 2×10^6 parasitos por poço em cada lâmina de poli-lisina de montagem. O bloqueio das lâminas foi realizado com 5% de leite em PBS com a adição de 0,05% de NP-40. Para o contraste da imagem dos compartimentos devidamente

marcados e analisados em *L. infantum*, o anticorpo primário α -HA monoclonal (Invitrogen, referência: 26183) foi usado em uma diluição de 1:3.000 e o anticorpo secundário GAM IgG (H+L) AF488 (ThermoFisher) em uma diluição de 1:300. A estreptavidina conjugada com FITC foi usada em uma diluição de 1:100 para detectar proteínas biotinizadas. Após as incubações apropriadas, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS. DAPI (ThermoFisher, referência: 62248) foi usado a 2 μ g/mL para a coloração nuclear. O uso do agente de montagem *anti-fading ProLong™ Diamond Antifade* (Invitrogen) também foi empregado. As imagens foram adquiridas usando uma câmera Olympus DP72 acoplada a um microscópio motorizado Olympus BX63 com o software cellSens Dimension (v 1.9).

5. RESULTADOS

5.1. Clonagens dos genes APEX2 e mNeonGreen nos vetores pLEXSY-hyg2 e pTREX-neo

O vetor pLEXSY-hyg2, escolhido para expressão em *L. infantum*, e pTREX-neo, para expressão em *T. cruzi*, foram digeridos para posterior ligação aos fragmentos APEX2-HA-NLS, APEX2-HA-PTS1, mNeonGreen-HA-NLS e mNeonGreen-HA-PTS1. O plasmídeo pLEXSY-hyg2 foi digerido com as enzimas de restrição *Bgl*III e *Not*I, liberando uma sequência de 1.107 pb (*stuffer*) e o vetor linearizado de 8.026 pb. O plasmídeo original pTREX-neo-tomato foi digerido com as enzimas de restrição *Xho*I e *Xba*I, liberando uma sequência de 1.464 pb (*stuffer* - tomato) e o vetor linearizado (6.206 pb).

Após realização da ligação dos fragmentos amplificados aos seus respectivos plasmídeos linearizados, os vetores foram utilizados para transformação de bactérias *Escherichia coli* na cepa K12 strain (NovaBlue) e selecionados com 100 μ g/mL carbenicilina. Para confirmação da clonagem no vetor pLEXSY-hyg, algumas colônias foram submetidas à PCR para amplificação do gene de interesse. De 5 colônias testadas para cada construção, foram obtidas 5 colônias positivas para a clonagem do APEX2-HA-PTS1-pLEXSY-hyg2, APEX2-HA-NLS-pLEXSY-hyg2 e mNeonGreen-HA-NLS-pLEXSY-hyg2 e 4 colônias positivas para mNeonGreen-HA-PTS1-pLEXSY-hyg2 (Figura 16A). Para uma segunda confirmação da clonagem, minipreparações plasmidiais foram realizadas a partir de 1 colônia de cada construção e submetida à análise de restrição. As enzimas *Bgl*III e *Not*I foram novamente

utilizadas (Figura 16B), liberando o vetor linearizado (8.033 pb) e uma sequência de 801 pb – 876 pb correspondente aos insertos (ver apêndice). A análise do sequenciamento confirmou que os produtos foram clonados no vetor com sucesso.

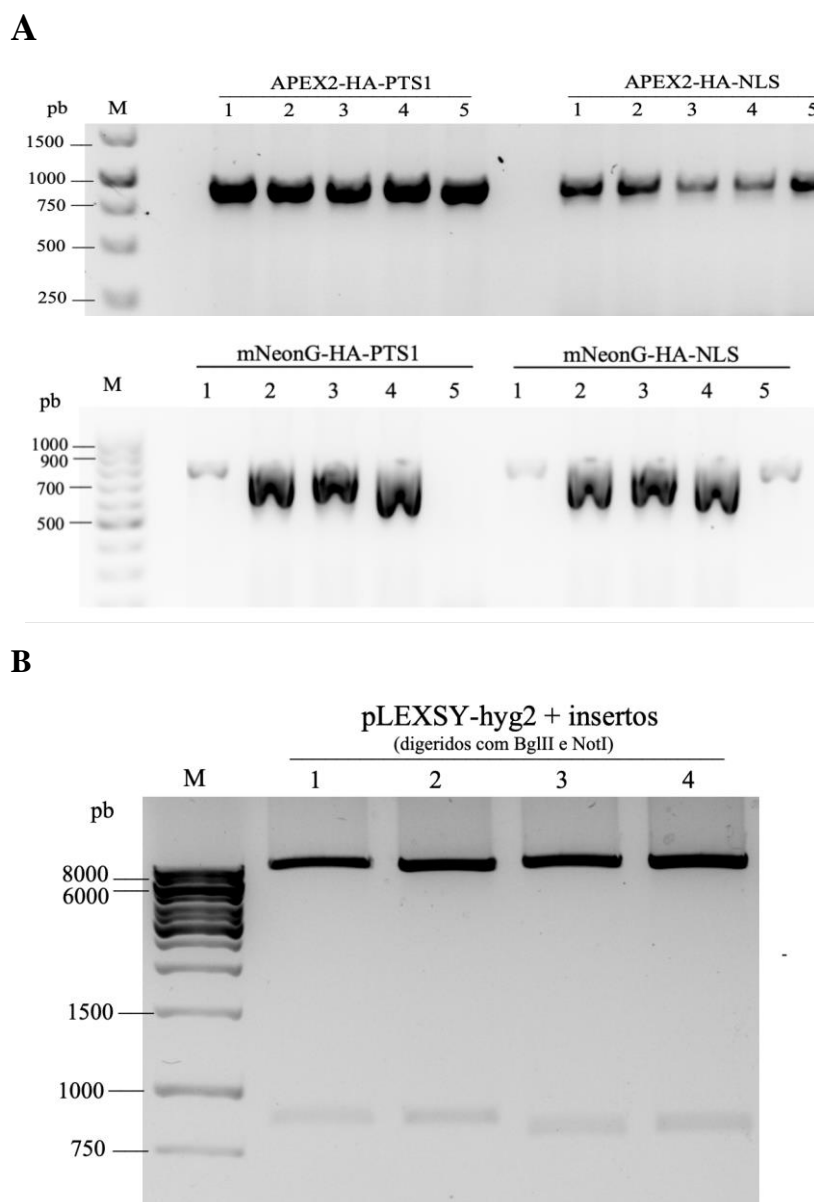
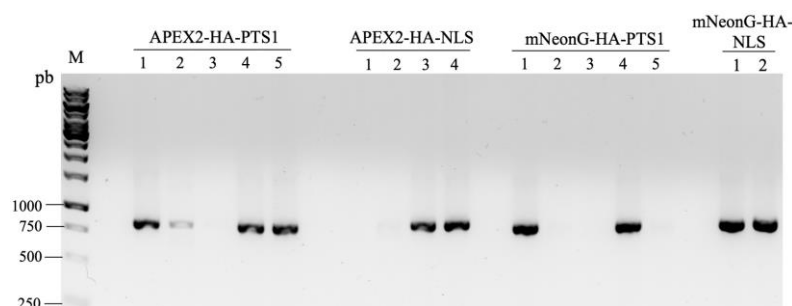


Figura 16. Confirmação da clonagem dos insertos no vetor pLEXY-hyg2. **A**, amplificação dos genes APEX-HA-PTS1, APEX2-HA-NLS, mNeonGreen-HA-PTS1 e mNeonGreen-HA-NLS por meio de PCR de colônias da bactéria *E. coli* transformadas com a ligação vetor/inserto e selecionada com 100 µg/mL carbenicilina. Uma porção de cada colônia foi submetida à PCR utilizando iniciadores específicos para cada gene de interesse. **B**, análise de restrição do plasmídeo pLEXY-hyg2-inserto (1- APEX-HA-PTS1; 2- APEX2-HA-NLS; 3- mNeonGreen-HA-PTS1; 4- mNeonGreen-HA-NLS) digerido com *Bgl*III e *Not*I. M, marcador 1 kb DNA ladder.

De forma semelhante, para confirmação da clonagem dos insertos no vetor pTREX-neo, algumas colônias foram submetidas à PCR de colônia para amplificação do gene de interesse. De 5 colônias testadas para as construções APEX2-HA-PTS1-pTREX-neo e mNeonGreen-HA-PTS1-pTREX-neo, foram obtidas 4 colônias positivas para a primeira construção e 2 colônias positivas para a segunda construção. De 4 colônias testadas para a construção APEX2-HA-NLS-pTREX-neo, foram obtidas 2 colônias positivas. Por fim, de 2 colônias testadas para a construção mNeonGreen-HA-NLS-pTREX-neo, foram obtidas 2 colônias positivas (Figura 17A). Para uma segunda confirmação da clonagem, minipreparações plasmidiais foram realizadas a partir de 1 colônia de cada construção e submetida à análise de restrição. As enzimas *Xho*I e *Xba*I foram utilizadas (Figura 17B) liberando o vetor linearizado (6.204 pb) e uma sequência de 801 pb – 876 pb correspondente aos insertos (ver apêndice). A análise do sequenciamento também revelou que os produtos foram clonados no vetor com sucesso.

A



B

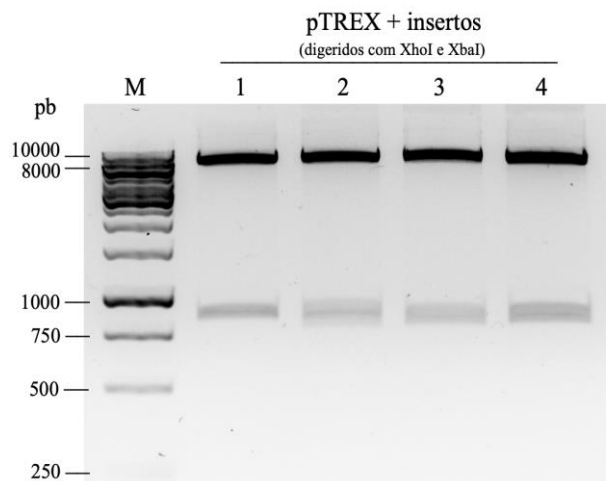


Figura 17. Confirmação da clonagem dos insertos no vetor pTREX-neo. A, amplificação dos genes APEX2-PTS1-HA, APEX2-NLS-HA, mNeonGreen-PTS1-HA e mNeonGreen-NLS-HA por meio de PCR de colônias da

bactéria *E. coli* transformadas com a ligação vetor/inserto e selecionada com 100 µg/mL carbenicilina. Uma porção de cada colônia foi submetida à PCR utilizando iniciadores específicos para cada gene de interesse. **B**, análise por eletroforese do plasmídeo pTREX-neo-inserto (1- APEX-HA-PTS1; 2- APEX2-HA-NLS; 3- mNeonGreen-HA-PTS1; 4- mNeonGreen-HA-NLS) digerido com *Xho*I e *Xba*I. M, marcador 1 kb DNA *ladder*.

5.2. Confirmação da expressão das proteínas por *Western blot*

Como explicado anteriormente, os cassetes possuem os genes APEX2 ou mNeonGreen fusionados à uma sequência de códons para três hemaglutininas, além do peptídeo sinal. Dessa forma, após transfecção e seleção dos parasitos *L. infantum* com higromicina B e dos parasitos *T. cruzi* com G418, análises por *Western blot* foram conduzidas para detectar a presença das proteínas fusionadas aos peptídeos a partir da marcação com o anticorpo α -HA.

As culturas de *L. infantum* transfectadas foram clonadas por diluição exaustiva em placas de 96 poços e 2 clones de cada construção foram recuperados e expandidos. Para *T. cruzi*, a clonagem por diluição exaustiva não foi realizada, mas o extrato total de cada cultura foi analisado. Os resultados apresentados na Figura 18 demonstram que as proteínas APEX2, com um peso molecular aproximado de 36 kDa, estão abundantemente expressas nos extratos proteicos de ambos os parasitos que foram transfectados com o cassete, APEX2-HA-PTS1 (clone F9), APEX2-HA-NLS (clone G9). Não houve marcação do anticorpo α -HA no extrato dos parasitos selvagens (controle negativo). Isso indica de forma efetiva o êxito na transfecção e na expressão das proteínas em questão.

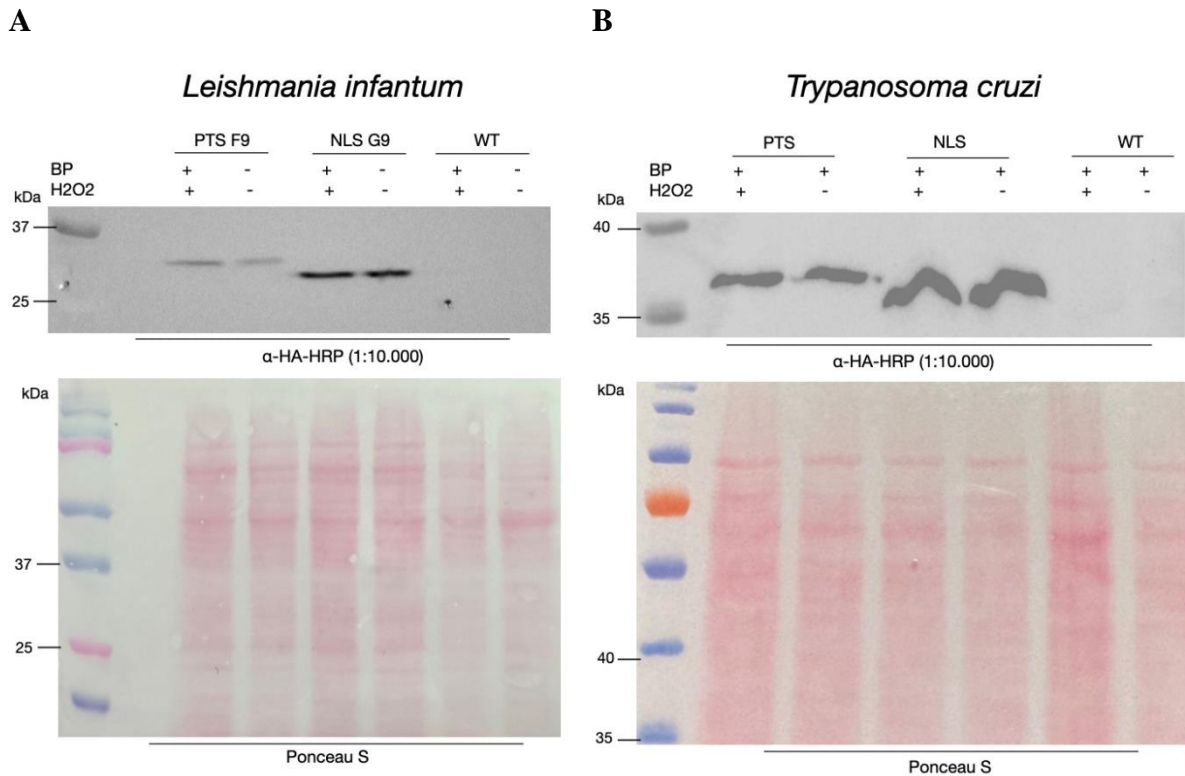


Figura 18. Detecção das proteínas APEX2 por Western blot. **A**, Extratos de parasitos *L. infantum* clonados APEX2-HA-PTS1 (clone F9), APEX2-HA-NLS (clone G9) e parasitos selvagens (WT), utilizados como controle negativo; **B**, Extratos de parasitos *T. cruzi* transfectados, APEX2-HA-PTS1 e APEX2-HA-NLS, e parasitos selvagens (WT), utilizados como controle negativo. Ambas as membranas foram marcadas com anticorpos α -HA (1:10.000) para detecção da proteína APEX2. Uma banda correspondente a aproximadamente 36 kDa é observada para as proteínas.

Com relação às proteínas mNeonGreen expressas em *L. infantum*, essas demonstraram baixa expressão no extrato proteico analisado, com exceção do clone H7 da mNeonGreen-HA-NLS que não houve expressão (Figura 19). Considerando que, para esta análise por *Western blot* envolvendo a proteína mNeonGreen, utilizamos o mesmo intervalo de exposição disponível para as proteínas APEX2, é importante ressaltar que não houve detecção do anticorpo α -HA na membrana com e o mesmo substrato para revelação (ECL, Bio-rad). A detecção das proteínas só foi revelada após incubação com o substrato *Clarity Max ECL* (Bio-rad), sujeita a um período de exposição mais prolongado para a obtenção desse resultado (Figura 19). Da mesma forma, as proteínas mNeonGreen expressas em *T. cruzi* também demonstraram baixa expressão (imagem não mostrada).

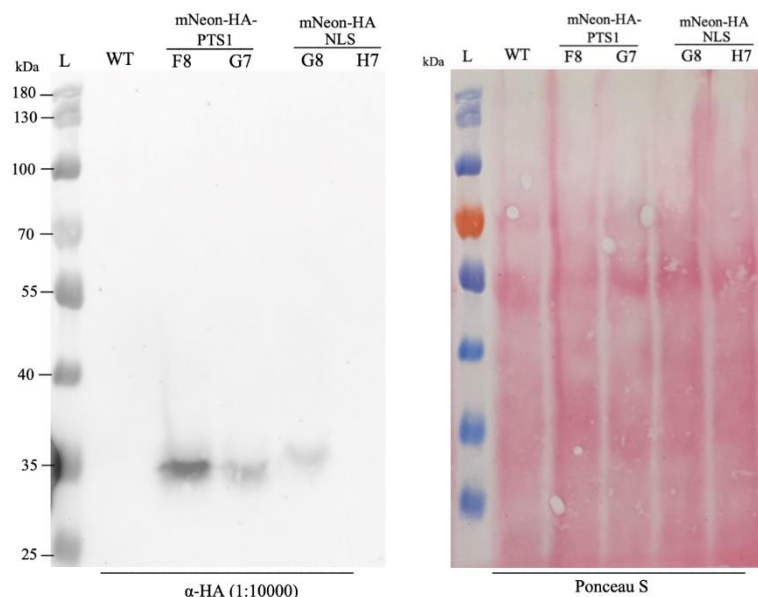


Figura 19. Detecção das proteínas mNeonGreen de *Leishmania infantum* por Western blot. Extratos de parasitos clonados mNeonGreen-HA-PTS1 (F8 e G7) e mNeonGreen-HA-NLS (G8 e H7) e parasitos selvagens (WT) foram marcados com anticorpos α -HA (1:10000). Uma banda correspondente a aproximadamente 35 kDa é observada para as proteínas.

5.3. Confirmação da biotinição das proteínas organelares

Para avaliar se o ensaio de biotinição com base em APEX2 foi eficaz para promover a modificação química pós-traducional em proteínas presentes no glicossomo ou núcleo dos parasitos, duas condições, com ou sem substrato de biotina-fenol (BP), foram empregadas aos parasitos transfectados: (i) BP+ / H₂O₂+, (ii) BP- / H₂O₂+. Após o ensaio de biotinição, as proteínas solúveis do parasito foram obtidas por tratamento com RIPA e separadas por SDS-PAGE. Foi realizada uma análise de *blot* de estreptavidina-HRP sondando as proteínas biotiniladas das condições analisadas.

Para os parasitos *T. cruzi*, a confirmação da expressão das proteínas APEX2 foi realizada, como visto anteriormente. No entanto, o ensaio de biotinição com estes parasitos foi realizado utilizando-se um peróxido de hidrogênio de baixa pureza, devido à indisponibilidade de outro reagente no momento do ensaio. Ao tentar reproduzir os experimentos posteriormente, os parasitos transfectados *T. cruzi* já não expressavam a proteína APEX2. Outra transfecção foi realizada, mas os parasitos tranfectados, até o presente momento, ainda não expressam a proteína. Futuros experimentos estão planejados para confirmar o ensaio de biotinição por APEX2 no ambiente bioquímico de *T. cruzi*. Dessa forma, os resultados mostrados a seguir são referentes apenas aos ensaios de biotinição realizados em *L. infantum*.

Como resultado do ensaio de biotilação em *L. infantum*, foi possível observar no estreptavidina-*blot* (Figura 20) várias bandas detectadas em todas as condições, inclusive nos dois poços do controle negativo - parasitos transfectados com o plasmídeo vazio. Tal observação possivelmente corresponda à presença de proteínas potencialmente biotiniladas de forma natural ou um *background* da metodologia. Entretanto, considerando que a mesma quantidade de parasitos foi submetida ao ensaio de biotilação e a mesma quantidade de proteína de cada amostra foi aplicada ao gel, uma maior detecção de proteínas biotiniladas foi detectada na presença de biotina-fenol e peróxido de hidrogênio em todos os clones APEX2, indicando o potencial de sucesso da reação (Figura 20).

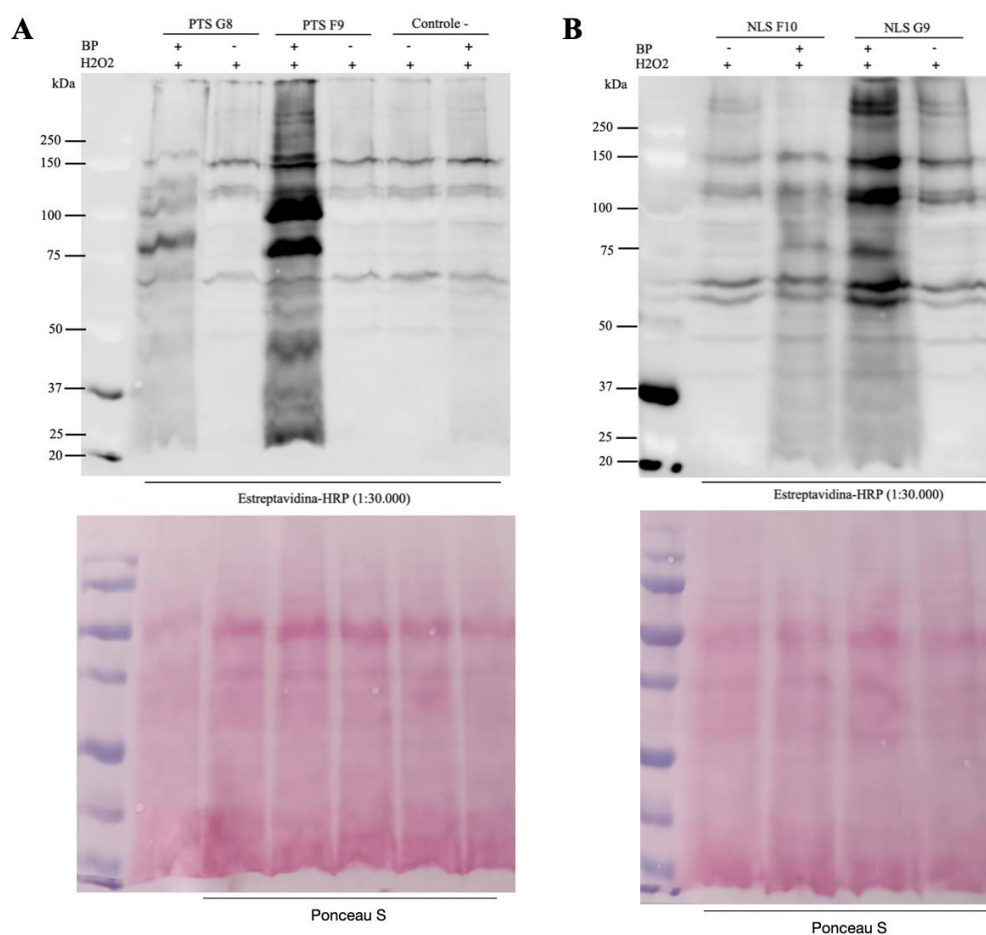


Figura 20. Confirmação do ensaio de biotilação, realizado *in vivo*, por estreptavidina-*blot* em *Leishmania infantum*. **A**, Extratos de parasitos clonados APEX-HA-PTS1 e controle negativo (parasitos transfectados com o plasmídeo vazio, sem a sequência APEX2) após ensaio de biotilação e ressuspensão em tampão RIPA. **B**, Extrato de parasitos clonados APEX-HA-NLS. Duas condições, com ou sem substrato de biotina-fenol (BP), foram empregadas aos parasitos transfectados: BP+ / H₂O₂+ e BP- / H₂O₂+.

Além do ensaio de biotinição realizado *in vivo*, conduzimos, um ensaio de biotinição após a lise por congelamento e descongelamento dos parasitos, de forma que pudéssemos confirmar a atividade da proteína APEX2. O resultado, apresentado na figura 21, indica a ocorrência de biotinição das proteínas após a lise dos parasitos, confirmando que a proteína também é ativa quando liberada no extrato de células após a lise.

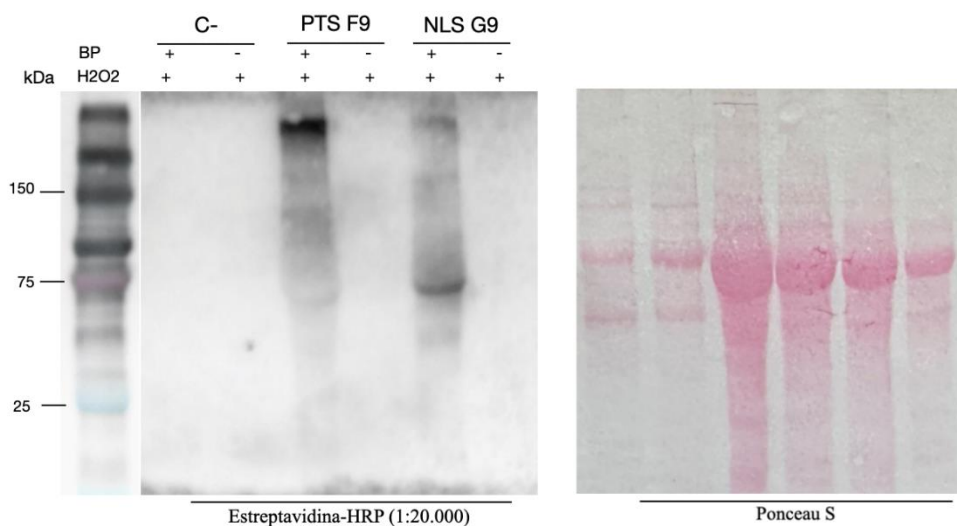


Figura 21. Confirmação do ensaio de biotinição, após a lise dos parasitos, por estreptavidina-blot em parasitos *Leishmania infantum*. Extratos de parasitos clonados PTS F9, NLS G9 e controle negativo (parasitos transfectedados com o plasmídeo vazio) foram submetidos à marcação com estreptavidina-HRP (1:20.000) após o ensaio de biotinição, que foi realizado após lise por ciclos de congelamento e descongelamento dos parasitos. Duas condições, com ou sem substrato de biotina-fenol (BP), foram empregadas aos parasitos transfectedados: BP+ / H₂O₂+ e BP- / H₂O₂+

5.4. Análise de imagens por imunofluorescência

Para validar o direcionamento das proteínas para suas respectivas organelas por meio do peptídeo sinal, foram criados os transfectantes mNeonGreen-HA-PTS1 e mNeonGreen-HA-NLS. Fizemos várias tentativas para observar a expressão de proteínas fluorescentes nas organelas-alvo, conduzindo análises de microscopia de fluorescência em intervalos de 48 horas, 4 dias, 7 dias e até 2 semanas após a transfecção. A fluorescência foi detectada em alguns casos após a fixação da célula na lâmina de vidro, mas, infelizmente, o sinal fluorescente era efêmero, sem tempo para tirar uma foto, o que poderia ser um problema de fotodegradação rápida.

Com relação aos transfectantes APEX-HA-PTS1 e APEX-HA-NLS de *L. infantum*, também foi empregada microscopia de fluorescência para avaliar seu direcionamento para os glicossomos e o núcleo, respectivamente. Por meio do IFA usando o anticorpo monoclonal α -HA, juntamente com um anticorpo secundário de *goat anti-mouse* IgG acoplado ao fluoróforo

Alexa Fluor 488 (GAM IgG AF488), foi possível verificar o direcionamento de ambas as proteínas de forma preliminar, tendo em vista que o uso de um marcador para co-localização é necessário para confirmação (Figura 22). A proteína APEX-HA-PTS1 (clone G8, Figura 22) foi claramente localizada apenas em estruturas pontuadas no citoplasma do parasito, sugerindo que ela pode estar localizada dentro dos glicossomos. A proteína APEX-HA-NLS (clone G9, Figura 22) apresentou um sinal difuso, mas com um sinal mais forte no meio do núcleo da célula, o que sugere que pode estar localizada principalmente no núcleo e na região do retículo endoplasmático (RE) do parasito unicelular. No entanto, nossas tentativas de realizar a marcação nuclear usando DAPI não foram bem-sucedidas (não mostrado) e não podemos afirmar que a proteína esteja localizada no núcleo/RE. Entretanto, as duas marcações possuem padrões bastante diferentes, o que indicam que com o PTS1, a proteína APEX2 foi endereçada em compartimentos de aparência vesicular diferentes que com o NLS.

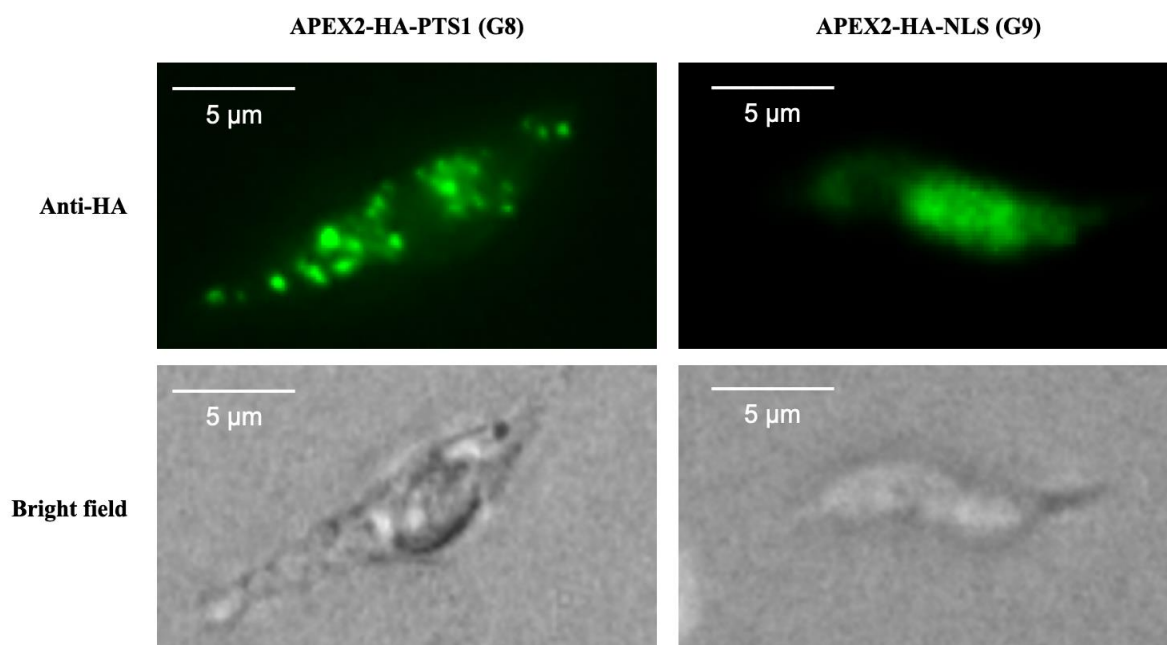


Figura 22. Imunofluorescência da proteína APEX2-HA-PTS1 e APEX-HA-NLS expressa em *Leishmania infantum*. A imunofluorescência foi realizada com anticorpos α -HA (1:3000) e anticorpo *goat anti-mouse IgG* conjugado com Alexa Fluor 488 (1:300).

Após o ensaio de biotilação, procedemos à análise de imunofluorescência usando estreptavidina-FITC dos mutantes que expressam APEX-HA-PTS1 e APEX-HA-NLS em duas condições: BP-/H₂O₂+ e BP+/H₂O₂+. Para revelar as proteínas biotinizadas, após várias otimizações do ensaio de biotilação baseado em APEX2, foi possível observar estruturas

pontuadas, sugerindo que as proteínas vizinhas à APEX-HA-PTS1 podem estar localizadas nos glicossomos (Figura 23). Entretanto, apesar de nossos esforços, para os clones APEX-HA-NLS, não foi possível observar uma marcação duradora e evidente usando estreptavidina-FITC (imagem não obtida).

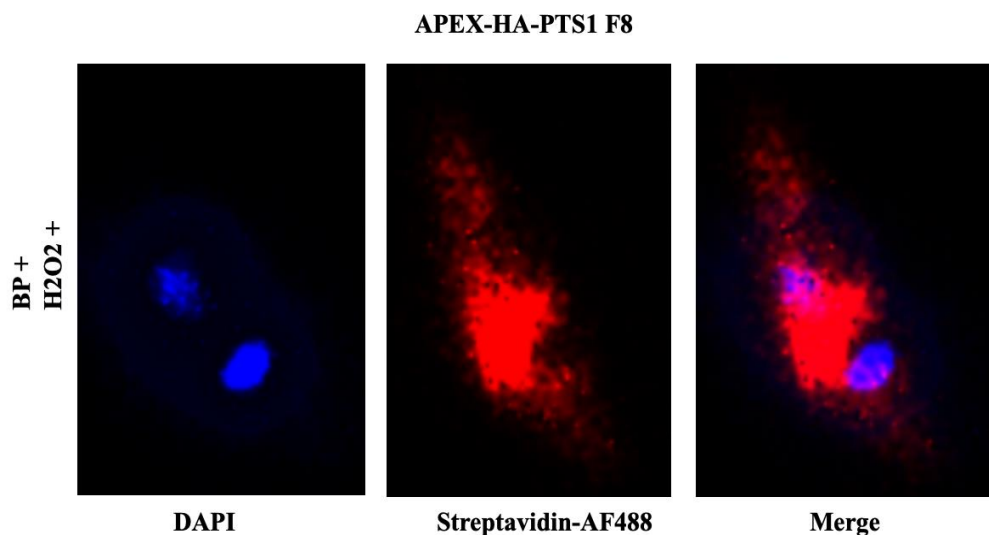


Figura 23. Imunofluorescência das proteínas biotiniladas vizinhas à proteína APEX2-HA-PTS1 de *Leishmania infantum*. A imunofluorescência foi realizada com estreptavidina conjugada a FITC (1:100). O DNA genômico e o cinetoplasto (azul) são marcados com DAPI.

Os resultados apresentados acima são preliminares e, para assegurar a consistência dos dados, planejamos repetir os experimentos de imunofluorescência utilizando novos reagentes, como DAPI e estreptavidina, em diferentes concentrações, além de realizar ensaios de co-localização.

6. DISCUSSÃO

As proteínas e enzimas presentes nos glicossomos e núcleo de tripanossomatídeos vem sendo exploradas como importantes alvos para desenvolvimento de novos medicamentos. Apesar de os glicossomos serem conhecidos por abrigar a maioria das enzimas da via glicolítica, vias adicionais consideradas essenciais para a sobrevivência e nutrição dos parasitos foram especificamente identificadas dentro dos glicossomos (Allmann e Bringaud, 2017). Nesse contexto, estudos proteômicos que visam o mapeamento destas organelas em

tripanosomatídeos, tornam-se interessantes para a melhor compreensão da função dessas no metabolismo do parasito e na busca por novos alvos terapêuticos.

Em estudos recentes, a técnica de MP baseada em APEX2 foi utilizada para investigar proteínas e interações proteicas em diferentes organelas de parasitos protozoários, revelando informações valiosas sobre sua biologia. Pan *et al.* empregaram essa técnica em *Toxoplasma gondii*, identificando 17 proteínas nos grânulos secretores densos (Pan *et al.*, 2018). No mesmo ano, Seidi e colegas utilizaram BioID e APEX2 para explorar o proteoma da matriz mitocondrial de *T. gondii*, descobrindo 161 proteínas mitocondriais previamente não anotadas como tendo uma função mitocondrial potencial (Seidi *et al.*, 2018). Em 2021, Vélez-Ramírez e colaboradores aplicaram a técnica APEX2 em *T. brucei* para identificar proteínas adjacentes ao flagelo (Vélez-Ramírez *et al.*, 2021). Este estudo resultou na descrição de 346 novas proteínas dentro do proteoma flagelar, que não haviam sido identificadas em pesquisas anteriores, e representa, até o momento, a única publicação da aplicação da APEX2 em tripanossomatídeos. No mesmo ano, a utilização das técnicas de APEX2 e CRISPR-Cas9 em *Plasmodium falciparum* revelou interações proteicas cruciais para a virulência do parasito, incluindo proteínas envolvidas na aderência ao endotélio humano (Lucas Silva de Oliveira, 2021). A abordagem permitiu a identificação de proteínas exportadas pelo parasito, potenciais alvos para novos tratamentos antimaláricos. Esses estudos em conjunto destacam a eficácia da APEX2 no estudo de interações proteicas e mapeamento proteico de organelas específicas desses organismos.

Nesse sentido, o presente trabalho se concentrou na aplicação da técnica APEX2 no contexto bioquímico dos parasitos *L. infantum* e *T. cruzi*, com o objetivo de mapear as proteínas dos glicossomos e núcleo desses organismos. Um dos objetivos iniciais consistia em conduzir análises proteômicas preliminares das proteínas biotinizadas encontradas nos compartimentos subcelulares mencionados, de ambos os parasitos. No entanto, as amostras ainda estão em estágio de preparação e ajuste de protocolos para prosseguir com as análises proteômicas, planejadas para um futuro próximo.

Para a construção dos cassetes contendo APEX2 e mNeonGreen, o vetor pLEXY-hyg (Figura 12) foi escolhido para expressão episomal em *L. infantum*. O vetor de expressão pTREX-neo (Figura 13) foi utilizado para a construção dos cassetes de expressão episomal *T. cruzi*. As figuras 16 e 17 mostram o processo de clonagem molecular para obtenção dos

plasmídeos de expressão e confirmam a ligação dos insertos nos vetores esperados. As análises de sequenciamento também confirmaram a correta ligação dos insertos aos respectivos vetores.

Após transfecção e seleção dos clones, os parasitos contendo os cassetes foram avaliados quanto a sua expressão proteica por *Western blot* e por imunofluorescência. O *Western blot* dos extratos de parasitos clonados mostra claramente a expressão de APEX2-HA e a especificidade do anticorpo α -HA, já que não há reatividade cruzada com nenhuma proteína no extrato de *L. infantum* e *T. cruzi*, uma vez que a banda de aproximadamente 36 kDa (tamanho esperado das proteínas APEX2 com a *tag* de HA e o peptídeo sinal) está ausente em parasitos de tipo selvagem (Figura 18). Contudo, para os parasitos clonados com mNeonGreen, a expressão da proteína foi relativamente baixa (Figura 19). Mesmo com o uso da solução *ClarityMax ECL*, utilizado para detecção e um tempo de exposição de imagem prolongado, não conseguimos a mesma intensidade observada nos clones APEX2. A baixa expressão proteica da mNeonGreen, embora não seja totalmente compreendida, poderia explicar a fluorescência muito baixa ou até mesmo a ausência de fluorescência nas observações desses clones usando a microscopia de fluorescência. A utilização de outra proteína fluorescente ou marcadores moleculares específicos para as organelas-alvo pode ser pensada para experimentos futuros.

Por meio da microscopia de fluorescência, observamos, de forma preliminar, o direcionamento das proteínas APEX2 para os glicossomos (PTS1) ou para o núcleo (NLS) de *L. infantum* através do anticorpo monoclonal α -HA, juntamente com um anticorpo secundário de *goat anti-mouse* IgG acoplado ao fluoróforo Alexa Fluor 488. Na Figura 22, para o clone APEX2-HA-PTS1, observam-se inúmeras vesículas pontilhadas, possivelmente correspondentes aos glicossomos, contrastando com o padrão observado para o mutante APEX-HA-NLS, em que a proteína é distribuída de forma difusa, mas fortemente na região nuclear/RE. Tais resultados necessitam ser confirmados com experimentos de colocalização por IFA.

Para determinar a localização das proteínas biotinizadas, recorreu-se novamente à microscopia de fluorescência, conforme ilustrado na Figura 23. Através desta imagem, identificamos marcações em estruturas pontuadas, características dos glicossomos. Isso sugere que as proteínas adjacentes à APEX-HA-PTS1 possam estar presentes nesta organela específica. Contudo, existe a possibilidade de que o sinal detectado seja artefactual, decorrente de limitações inerentes à técnica utilizada. Para confirmar a localização exata destas proteínas, serão necessários ensaios adicionais.

Com relação ao ensaio de biotilação em *L. infantum*, embora tenha ocorrido uma marcante intensificação da marcação de proteínas biotinizadas na condição BP+/H₂O₂+ em todos os clones analisados (Figura 20), a quantidade de proteínas biotinizadas nos grupos de controle negativo (BP-/H₂O₂+) e nos parasitos transfectados com o plasmídeo vazio, controle negativo, não estava prevista. Isso porque em estudos anteriores recentes utilizando APEX2 o número de proteínas biotinizadas no controle negativo era muitas vezes menor que nas condições do ensaio (Rim e Nusse, 2023; Tran *et al.*, 2021). Nesse contexto, nos questionávamos sobre a frequência de biotilação natural de proteínas em *L. infantum*. A proteína ligase de biotina desempenha o papel de adicionar seletivamente a biotina a uma lisina específica no sítio ativo das enzimas recém-sintetizadas (Chapman-Smith e Cronan, 1999). Em *Leishmania*, três enzimas mitocondriais, acetil-CoA carboxilase, 3-metilcrotonil-CoA carboxilase e propionil-CoA carboxilase, dependem dessa biotinação para sua atividade (Rajak *et al.*, 2021). A acetil-CoA carboxilase (241 kDa) é um heterohexâmero de proteína transportadora de biotina carboxila (17 kDa), biotina carboxilase (55 kDa) e duas subunidades não idênticas de carboxil transferase (alfa e beta) com peso molecular não encontrado. A 3-metilcrotonil-CoA carboxilase consiste em uma subunidade alfa (75 kDa) e uma subunidade beta (62 kDa) montadas em um dodecâmero. A propionil-CoA carboxilase (PCC) é uma enzima grande (~770 kDa) composta por 6 subunidades α (73 kDa) e 6 subunidades β (53 kDa) (informações retiradas do portal de bioinformática *Protein Data Bank Japan*). No entanto, embora a presença destas proteínas naturalmente biotinizadas possa explicar parte das proteínas detectadas nos controles negativos da Figura 20, essa explicação não englobaria todas as proteínas observadas. Portanto, é provável que algumas das proteínas detectadas possam ser proteínas naturalmente biotinizadas específicas de *L. infantum* ou possam estar sujeitas a uma marcação não específica da estreptavidina. Será necessário realizar novos ensaios para confirmar a presença ou ausência de falsos positivos e esclarecer essa questão com mais precisão.

Apesar de não ter sido possível a realização da parte proteômica do projeto, conseguimos validar a metodologia de marcação por proximidade baseada na APEX2 no contexto bioquímico de *L. infantum* (Figuras 20 e 21). Esta validação é significativa, considerando que a abordagem APEX2 pode ser potencialmente inviável para certos microrganismos devido à toxicidade do peróxido de hidrogênio e ao potencial de alteração do ambiente intracelular (Hananya *et al.*, 2023). No que se refere à aplicação da APEX2 em *T.*

cruzi, não foram encontrados estudos prévios que empregaram essa técnica nesse organismo. Atualmente, nosso grupo está conduzindo pesquisas para aplicar essa abordagem em *T. cruzi*.

Embora a APEX2 ainda não tenha sido utilizada em estudos de mapeamento proteico dos glicosomos em tripanossomatídeos, vários estudos têm se concentrado na caracterização dessas proteínas. No estudo das proteínas glicosomais de *Leishmania*, progressos significativos foram feitos para entender a composição e função dessas organelas. O estudo de Colasante e colaboradores (2013) em *L. tarentolae* identificou 464 proteínas em uma preparação de membrana glicosômica, das quais 258 foram classificadas como proteínas glicosômicas, incluindo 40 enzimas. Também se destacou a identificação de importantes transportadores, como GAT1 e GAT3, e de homólogos de proteínas de membrana peroxissomal, como PEX11, GIM5A, GIM5B, PXMP4, PEX2 e PEX16 (Colasante *et al.*, 2013). Posteriormente, Jamhade *et al.*, em seu estudo sobre *L. donovani*, identificaram 1355 proteínas, incluindo várias não detectadas em pesquisas anteriores, como a orotidina-5-fosfato descarboxilase/orotato fósforo-ribosiltransferase e enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos, lipídios, tiol, purina e pirimidina (Jamdhade *et al.*, 2015). Em um estudo mais recente, Sanchiz e colegas analisaram o proteoma experimental de *L. infantum*, identificando proteínas glicosômicas essenciais, como as peroxinas PEX5 e PEX7, e destacando a presença de proteínas em vias metabólicas conhecidas (Sanchiz *et al.*, 2020). Este estudo também comparou os achados com os estudos anteriores, encontrando ortólogos para 165 (64%) das proteínas glicosômicas de *L. tarentolae* e 853 das proteínas de *L. donovani*. A identificação de todas as 13 enzimas da via de salvamento de purina em *L. infantum*, em contraste com sua presença limitada em *L. tarentolae* e *L. donovani*, enfatizou a diversidade metabólica entre essas espécies (Sanchiz *et al.*, 2020). Além disso, a maioria das enzimas da via de biossíntese de novo de pirimidina encontrada em *L. infantum* contrasta com a detecção de apenas uma enzima desta via em *L. donovani* (Sanchiz *et al.*, 2020). Esses estudos coletivamente realçam a complexidade e especificidade das funções glicosômicas nas diferentes espécies de *Leishmania*, mostrando a importância dessas organelas na biologia parasitária e fornecendo *insights* sobre adaptações metabólicas deste gênero.

O proteoma dos glicosomos de *T. cruzi* também tem sido alvo de estudos, apesar de que abordagens por MP ainda não tenham sido realizadas. O estudo proteômico de Acosta *et al.* (2019), realizado a partir de glicosomos de epimastigotas de *T. cruzi*, revelou a presença de muitas enzimas anteriormente identificadas em *Leishmania spp.* As enzimas encontradas estão

envolvidas em diversas vias metabólicas, incluindo glicólise, gliconeogênese, biossíntese de nucleotídeos, purinas, pirimidinas, esteróis e éter-lípidos, além da β -oxidação de ácidos graxos e desintoxicação de radicais de oxigênio. O estudo também identificou enzimas para duas novas rotas potenciais de reoxidação do NADH produzido glicoliticamente: uma rota envolvendo a 2-hidroxiácido desidrogenase (HADH) e a segunda rota um sistema composto por aldeído desidrogenase (ALDH) e oxidoredutase (álcool desidrogenase, ADH) (Acosta *et al.*, 2019). Adicionalmente, Acosta e colaboradores caracterizaram enzimas específicas de *T. cruzi*, como a glicoquinase (GlcK), galactoquinase (GALK) e fosfoglicerato quinase (PAS-PGK). O estudo também confirmou a importância da síntese de esteróis, processo metabólico essencial em *T. cruzi* e *Leishmania spp.*, destacando a presença de várias enzimas relacionadas nos glicossomos (Acosta *et al.*, 2019). Para aprimorar o entendimento da composição e biogênese dos glicossomos, bem como revelar funções ainda não conhecidas e proteínas com potencial terapêutico, essa análise do proteoma glicossomal é essencial. E a comparação entre organismos será mais relevante se for realizada pela mesma metodologia em todos eles.

O proteoma nuclear de *T. cruzi* foi igualmente analisado por Santos e colaboradores (2015) a partir do fracionamento celular utilizando etapas de centrifugação em gradiente de densidade de sacarose. O estudo forneceu *insights* importantes sobre a organização nuclear e a regulação da replicação do DNA neste organismo, contribuindo para um entendimento mais aprofundado da biologia celular dos tripanossomatídeos e na definição de um panorama mais completo do proteoma do parasito (Santos Júnior *et al.*, 2015). Embora análises proteômicas detalhadas do núcleo de *L. infantum* ainda não tenham sido conduzidas, a relação filogenética com *T. cruzi* sugere uma organização nuclear semelhante. No entanto, para obter uma compreensão mais aprofundada sobre os mecanismos únicos de adaptação metabólica presentes neste grupo, é altamente recomendável realizar uma investigação proteômica comparativa entre os dois organismos. Isso proporcionaria *insights* valiosos e detalhados sobre as diferenças e semelhanças nas vias metabólicas desses organismos.

Embora os estudos mencionados acima tenham contribuído para o campo da proteômica organelar de tripanossomas, os autores reconhecem a limitação de suas técnicas de enriquecimento da organela, afetadas principalmente pela contaminação de outros compartimentos celulares. Abordagens de MP poderiam ser mais eficazes no mapeamento subcelular de organelas. O nosso estudo é o primeiro passo e marca um avanço ao introduzir,

pela primeira vez, a técnica APEX2 para o estudo dos glicossomos e núcleo de tripanossomatídeos.

7. CONCLUSÕES

Por fim, o presente trabalho permitiu concluir que:

- Os parasitos *L. infantum* transfectados expressam as proteínas APEX2-HA-PTS1 e APEX2-HA-NLS em altos níveis; mas as proteínas mNeonGreen-HA-PTS1 e mNeonGreen-HA-NLS não são expressas em níveis suficientes para sua observação por microscopia de fluorescência. Caso não seja observada fluorescência em novas tentativas, novas alternativas poderão ser pensadas e implementadas, como a utilização de outra proteína fluorescente ou utilização de algum marcador molecular das organelas-alvo;
- Os parasitos *T. cruzi* transfectados expressavam as proteínas APEX2-HA-PTS1 e APEX-HA-NLS, mas uma nova transfecção é necessária para que futuros ensaios de biotinylação possam ser realizados;
- A análise de imunofluorescência usando anticorpo α -HA, permitiu determinar, de forma preliminar, que as proteínas APEX2-HA-PTS1 e APEX-HA-NLS expressas por *L. infantum* foram direcionadas para as organelas-alvo, glicossomo ou núcleo;
- Os ensaios de biotinylação realizados com os clones de *L. infantum*, confirmados por estreptavidina-*blot*, permitiram concluir que a marcação de proximidade APEX2 pode ser implementada no ambiente bioquímico de *L. infantum*;
- A análise de imunofluorescência utilizando estreptavidina-FITC forneceu resultados preliminares indicativos de que a biotinylação ocorreu nos glicossomos dos clones de *L. infantum* transfectados com APEX-HA-PTS1. Isso foi evidenciado pela observação de fluorescência em estruturas pontuadas, sugerindo que as proteínas adjacentes à APEX-HA-PTS1 possivelmente estejam localizadas nos glicossomos.

8. PERSPECTIVAS

Em vista das perspectivas futuras, planejamos repetir os ensaios de biotilação em *L. infantum* e aplicá-los a *T. cruzi*. Nosso objetivo é enriquecer as proteínas biotiniladas desses organismos para avançar na análise proteômica. Através da combinação dos dados proteômicos obtidos de ambas as espécies, pretendemos realizar uma análise comparativa detalhada dos glicossomos e núcleo. Esta estratégia permitirá oferecer dados importantes sobre as adaptações metabólicas deste grupo de organismos. Além disso, essa pesquisa amplia o entendimento das interações proteicas vitais para a sobrevivência do parasito, contribuindo com a busca por novos alvos terapêuticos contra doenças associadas a tripanossomatídeos.

APÊNDICE

Tabela 1. Sequências gênicas das proteínas APEX2 e mNeonGreen para transfeção em *L. infantum* a partir da clonagem com o vetor de expressão pLEXSY-hyg. Legenda:

Sítio de restrição *Bgl*I; PTS1 (peptídeo sinal de direcionamento ao glicosomo); NLS (sinal de localização nuclear); APEX2; mNeonGreen; 3 x HA; Stop códon; Sítio de restrição *Not*I

Gene	Sequência
APEX2-HA-PTS1 (843 pb)	<p>AGATCTATGGGCAAGTCGTATCCGACAGTGTCGGCTGATTATCAGG ATGCTGTCGAAAAAGCGAAGAAAAAACTGCGTGGGTTTATAGCCGA AAAGAGGTGTGCTCCGCTGATGTTGAGGCTCGCGTTCCTACTCAGCA GGAACCTTTGATAAGGGAACAAAAACGGGGGGTCTTTTCGGAACCA TCAAGCACCCCGCTGAGCTGGCTCACTCGGCGAACAACGGACTCG ACATAGCGGTTCCGGCTCCTGGAGCCGTTGAAGGCGGAATTTCTAT TTTGAGTTACGCGGATTTCTACCAGCTTGCAGGAGTGGTGGCCGTT GAGGTCACGGGTGGGCCTAAAGTGCCTTTCCATCCGGGACGAGAA GATAAGCCGGAGCCACCCCTGAAGGACGGCTTCTGATCCTACGA AAGGTAGTGACCATCTGCGGGACGTGTTTGGCAAGGCCATGGGCTT GACAGACCAAGACATCGTGGCGCTCTCAGGTGGTCACACTATTGGA GCAGCCCATAAAGAGCGTTCAGGGTTCGAGGGTCTTGGACGTCCA ACCCTCTCATATTCGATAACAGTTATTTACAGAACTGTTGTCAGGT GAGAAGGAGGGGCTCTCCAATTGCCATCTGATAAAGCTCTGCTTT CCGATCCCGTCTTTCGTCCGCTTGTGACAAATATGCTGCGGATGAA GACGCTTTCTTTCGAGACTACGCCGAAGCGCACCAGAAGCTCTCTG AATTGGGGTTTGCTGATGCATATCCGTACGATGTCCTCAGACTACGCT TATCCGTACGACGTGCCTGATTACGTTACCCCTATGATGTTCCGGA CTATGCTAGTAAACTGTAGGCGGCCGC</p>
APEX2-HA-NLS (876 pb)	<p>AGATCTATGCCGAAGAAGAAGCGGAAAGTCGGGAAGTCATATCCGA CCGTCTCGGCTGATTACCAGGATGCCGTGGAAAAAGCAAAGAAAA GCTTAGGGGGTTTATTGCTGAAAAGAGGTGCGCACCGTTGATGCTC CGCTTGGCTTTTCACTCGGCTGGTACATTCGACAAAGGAACAAAGA CAGGCGGCCCATTTGGTACAATTAAGCATCCTGCCGAACCTGCACA CAGCGCCAACAATGGCCTCGACATCGCGGTTCCGGCTTCTTGAACCG CTCAAAGCAGAAATTTCCGATCTTGTCTTATGCCGATTTTACCAGCT CGCGGGGGTCTGGCGGTTGAAGTGACCGGAGGGCCAAAAGTCCC GTTTCACCCCGGACGAGAGGATAAGCCGGAACCTCCCCCTGAAGG CAGGCTCCCTGATCCAATAAAGGGAGCGACCATCTTCGTGATGTT TTTGAAAAGCAATGGGGCTCACCGATCAGGACATCGTCGCACTTA GTGGAGGTCATACGATCGGTGCGGCACACAAGGAGCGGTCCGGAT TTGAGGGGCCATGGACTTCAAACCCACTTATTTTGAACAACCTACATC TTCACGGAATTGCTCTCAGGGGAAAAGGAAGGGCTTCTTCAACTGC CATCCGATAAGGCGTTGCTTAGCGACCCTGTCTTTCGCCCTCTGGT CGATAAATATGCAGCCGATGAAGATGCCTTCTTTCGCCGATTACGCAG AAGCCCACAAAAGTTGTGAGAATTGGGGTTCGCGGATGCGTATCC GTACGATGTCCTCAGACTACGCTTATCCGTACGACGTGCCTGATTAC GCTTACCCCTATGATGTTCCGGACTATGCTCCGAAGAAGAAGCGGA AAGTCTAGGCGGCCGC</p>

<p>mNeonGreen- HA-PTS1 (801 pb)</p>	<pre> AGATCTATGGTGAGTAAGGGCGAGGAAGACAACATGGCATCCCTTC CAGCAACGCATGAACCTCCATATTTTGGGTCAATCAATGGTGTGCGAT TTCGACATGGTTGGTCAAGGGACCGGCAACCCCAACGATGGCTATG AGGAATTGAACCTCAAATCAACAAAAGGGGATTTGCAGTTCTCTCCA TGGATTCTGGTTCCCCACATAGGCTATGGATTCCATCAATACTTGCC ATACCCTGACGGGATGTCCCCGTTTCAGGCAGCCATGGTCGACGG CTCAGGGTATCAAGTGCATCGGACGATGCAGTTTGAGGATGGCGCT TCTTTGACTGTGAACTATCGTTACACGTATGAAGGGTCGCACATAAA AGGTGAAGCTCAAGTTAAGGGGACCGGATTCCCTGCCGACGGGCC TGTTATGACGAATCACTGACAGCAGCCGACTGGTGCAGGAGCAAAA AAGACTTACCCCAACGATAAAACAATCATCAGTACATTTAAATGGTC ATATACTGAGGAAACGGTAAGCGCTATAGGAGCACAGCGAGGACT ACTTACACTTTCGCTAAGCCCATGGCGGCCAATTACTTGAAGAATCA GCCGATGTACGTCTTCAGGAAAACCGAACTCAAGCACTCCAAAACC GAGCTCAATTTCAAAGAATGGCAGAAAGCGTTCACCGACGTTATGG GGATGGATGAACTGTATAAATATCCGTACGATGTCCCAGACTACGCT TATCCGTACGACGTGCCTGATTACGCTTACCCCTATGATGTTCCGGA CTATGCTAGTAAACTGTAGGCGGCCGC </pre>
<p>mNeonGreen- HA-NLS (834 pb)</p>	<pre> AGATCTATGCCGAAGAAGAAGCGGAAAGTCGTTTCAAAGGGGGAAG AGGATAATATGGCCTCGCTTCCAGCGACCCATGAGCTCCACATCTT CGGATCTATAAATGGCGTTGATTTGACATGGTCGGGCAGGGTACA GGTAATCCGAATGATGGCTATGAGGAATTGAATCTTAAATCTACCAA GGGCGATCTTCAATTTCTCCTTGATCCTCGTGCCGCACATCGGAT ACGGATTTACCAGTATTTGCCTTACCCTGACGGAATGTGCGCCGTT CAAGCTGCGATGGTCGATGGGTCCGGGTATCAGGTTTATAGGACTA TGCAGTTCGAAGATGGAGCCTCCCTTACCGTGAATTATCGCTATACC TACGAGGGAAGCCACATTAAGGCGAGGCGCAAGTTAAGGGTACG GGATTTCCGGCTGATGGTCCTGTTATGACCAATAGTCTGACCGCGG CTGACTGGTGCAGGTCAAAGAAAACCTACCCAAATGACAAAACATA ATAAGCACATTTAAGTGGAGCTACACGACCGGAAATGGGAAACGGT ATCGAAGCACGGCACGAACTACATACACTTTCGCCAAACCGATGGC AGCTAACTATTTGAAAAATCAGCCTATGTACGTCTTTCGTAAGACAG AGCTGAAGCATTCAAAGACAGAGCTGAATTTCAAGGAGTGGCAGAA GGCGTTTACTGACGTTATGGGAATGGATGAGCTGTATAAGTATCCGT ACGATGTCCCAGACTACGCTTATCCGTACGACGTGCCTGATTACGC TTACCCCTATGATGTTCCGGACTATGCTCCGAAGAAGAAGCGGAAA GTCAGGCGGCCGC </pre>

Tabela 2. Sequências gênicas das proteínas APEX2 e mNeonGreen para transfecção em *T. cruzi* a partir da clonagem com o vetor de expressão pTREX-neo. Legenda: Sítio de restrição *Xba*I; PTS1; NLS; APEX2; mNeonGreen; 3 x HÁ; Stop códon; Sítio de restrição *Xho*I

Gene	Sequência
<p>APEX2-HA- PTS1 (843 pb)</p>	<pre> TCTAGAATGGGCAAGTCGTATCCGACAGTGTCCGCTGATTATCAGG ATGCTGTGCAAAAAGCGAAGAAAAAACTGCGTGGGTTTATAGCCGA AAAGAGGTGTGCTCCGCTGATGTTGAGGCTCGCGTTCCTCAGCA </pre>

	<p>GGAACCTTTGATAAGGGAACAAAAACGGGGGGTCTTTTCGGAACCA TCAAGCACCCCGCTGAGCTGGCTCACTCGGCGAACAAACGGACTCG ACATAGCGGTTCCGGCTCCTGGAGCCGTTGAAGGCGGAATTTCTAT TTTGAGTTACGCGGATTTCTACCAGCTTGCAGGAGTGGTGGCCGTT GAGGTCACGGGTGGGCTAAAGTGCCTTTCCATCCGGGACGAGAA GATAAGCCGGAGCCACCCCTGAAGGACGGCTTCTGATCCTACGA AAGGTAGTGACCATCTGCGGGACGTGTTGGCAAGGCCATGGGCTT GACAGACCAAGACATCGTGGCGCTCTCAGGTGGTCACACTATTGGA GCAGCCCATAAAGAGCGTTCAGGGTTCGAGGGTCTTGGACGTCCA ACCCTCTCATATTCGATAACAGTTATTTACAGAACTGTTGTCAGGT GAGAAGGAGGGGCTCCTCCAATTGCCATCTGATAAAGCTCTGCTTT CCGATCCCGTCTTTCGTCGCTTGTGACAAATATGCTGCGGATGAA GACGCTTTCTTTCGAGACTACGCCGAAGCGCACCAGAAGCTCTCTG AATTGGGGTTTGCTGATGCATATCCGTACGATGTCCAGACTACGCT TATCCGTACGACGTGCCTGATTACGCTTACCCTATGATGTTCCGGA CTATGCTAGTAAACTGTAGCTCGAG</p>
<p>APEX2-HA- NLS (876 pb)</p>	<p>TCTAGAATGCCGAAGAAGAAGCGGAAAGTCGGGAAGTCATATCCGA CCGTCTCGGCTGATTACCAGGATGCCGTGGA AAAAGCAAAGAAAA GCTTAGGGGGTTTATTGCTGAAAAGAGGTGCGCACCGTTGATGCTC CGCTTGGCTTTTCACTCGGCTGGTACATTCGACAAAAGGAACAAAGA CAGGCGGCCCATTTGGTACAATTAAGCATCCTGCCGA ACTTGCACA CAGCGCCAACAATGGCCTCGACATCGCGGTTCCGGCTTCTGAACCG CTCAAAGCAGAAATTTCCGATCTTGTCTTATGCCGATTTTACCAGCT CGCGGGGGTCTGGCGGTTGAAGTGACCGGAGGGCCAAAAGTCCC GTTTCACCCCGGACGAGAGGATAAGCCGGAACCTCCCCCTGAAGG CAGGCTCCCTGATCCA ACTAAAGGGAGCGACCATCTTCGTGATGTT TTTGGAAAAGCAATGGGGCTCACCGATCAGGACATCGTGCACCTTA GTGGAGGTCATACGATCGGTGCGGCACACAAGGAGCGGTCCGGAT TTGAGGGGCCATGGACTTCAAACCCACTTATTTTGGACA ACTCATA TTCACGGAATTGCTCTCAGGGGAAAAGGAAGGGCTTCTTCAACTGC CATCCGATAAGGCGTTGCTTAGCGACCCTGTCTTTCGCCCTCTGGT CGATAAATATGCAGCCGATGAAGATGCCTTCTTGGCCGATTACGCAG AAGCCACCAAAGTTGTCAGAATTGGGGTTCGCGGATGCGTATCC GTACGATGTCCAGACTACGCTTATCCGTACGACGTGCCTGATTAC GCTTACCCTATGATGTTCCGGACTATGCTCCGAAGAAGAAGCGGA AAGTCTAGCTCGAG</p>
<p>mNeonGreen- HA-PTS1 (801 pb)</p>	<p>TCTAGAATGGTGAGTAAGGGCGAGGAAGACAACATGGCATCCCTTC CAGCAACGCATGAACTCCATATTTTGGGTCAATCAATGGTGTGCGAT TTCGACATGGTTGGTCAAGGGACCGGCAACCCCAACGATGGCTATG AGGAATTGAACCTCAAATCAACAAAAGGGGATTTGCAGTTCTCTCCA TGGATTCTGGTTCCCCACATAGGCTATGGATTCCATCAATACTTGCC ATACCCTGACGGGATGTCCCGTTTCAGGCAGCCATGGTCGACGG CTCAGGGTATCAAGTGCATCGGACGATGCAGTTTGAGGATGGCGCT TCTTTGACTGTGAACTATCGTTACACGTATGAAGGGTCGCACATAAA AGGTGAAGCTCAAGTTAAGGGGACCGGATTCCCTGCCGACGGGCC TGTTATGACGAATTCAGTACAGCAGCCGACTGGTGCAGGAGCAAAA AAGACTTACCCCAACGATAAAACAATCATCAGTACATTTAAATGGTC ATATACTACTGGGAACGGTAAGCGCTATAGGAGCACAGCGAGGACT ACTTACACTTTCGCTAAGCCCATGGCGGCCAATTACTTGAAGAATCA GCCGATGTACGTCTCAGGAAAACCGAACTCAAGCACTCCAAAACC</p>

	<p>GAGCTCAATTTCAAAGAATGGCAGAAAGCGTTCACCGACGTTATGG GGATGGATGAACTGTATAAATATCCGTACGATGTCCCAGACTACGCT TATCCGTACGACGTGCCTGATTACGCTTACCCCTATGATGTTCCGGA CTATGCTAGTAAACTGTAGCTCGAG</p>
mNeonGreen- HA-NLS (834 pb)	<p>TCTAGAATTCATGCCGAAGAAGAAGCGGAAAGTCGTTTCAAAGGGG GAAGAGGATAATATGGCCTCGCTTCCAGCGACCCATGAGCTCCACA TCTTCGGATCTATAAATGGCGTTGATTTGACATGGTCGGGCAGGG TACAGGTAATCCGAATGATGGCTATGAGGAATTGAATCTTAAATCTA CCAAGGGCGATCTTCAATTTTCTCCTTGGATCCTCGTGCCGCACATC GGATACGGATTTACCAGTATTTGCCTTACCCTGACGGAATGTCGC CGTTCCAAGCTGCGATGGTCGATGGGTCCGGGTATCAGGTTCATAG GACTATGCAGTTCGAAGATGGAGCCTCCCTTACCGTGAATTATCGCT ATACCTACGAGGGAAGCCACATTAAGGCGAGGCGCAAGTTAAGGG TACGGGATTCCCGGCTGATGGTCCTGTTATGACCAATAGTCTGACC GCGGCTGACTGGTGCAGGTCAAAGAAAACCTACCCAAATGACAAAA CTATAATAAGCACATTTAAGTGGAGCTACACGACCGGAAATGGGAAA CGGTATCGAAGCACGGCACGAACACTACATACACTTTCGCCAAACCGA TGGCAGCTAACTATTTGAAAAATCAGCCTATGTACGTCTTTCGTAAG ACAGAGCTGAAGCATTCAAAGACAGAGCTGAATTTCAAGGAGTGGC AGAAGGCGTTTACTGACGTTATGGGAATGGATGAGCTGTATAAGTAT CCGTACGATGTCCCAGACTACGCTTATCCGTACGACGTGCCTGATT ACGCTTACCCCTATGATGTTCCGGACTATGCTCCGAAGAAGAAGCG GAAAGTCTAGCTCGAG</p>

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, H. *et al.* Proteomic analysis of glycosomes from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 229, p. 62–74, abr. 2019.

ALLMANN, S.; BRINGAUD, F. Glycosomes: A comprehensive view of their metabolic roles in *T. brucei*. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 85, p. 85–90, abr. 2017.

ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35671, 31 maio 2012.

ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 12, p. 552–557, dez. 2006.

AN, T. *et al.* FAZ27 cooperates with FLAM3 and ClpGM6 to maintain cell morphology in *Trypanosoma brucei*. **Journal of Cell Science**, 1 jan. 2020.

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

BARROS-ALVAREZ, X. *et al.* Glycosomal Targets for Anti-Trypanosomatid Drug Discovery. **Current Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 15, p. 1679–1706, 31 abr. 2014.

BECKER, J. T.; AUERBACH, A. A.; HARRIS, R. S. APEX3 – An Optimized Tool for Rapid and Unbiased Proximity Labeling. **Journal of Molecular Biology**, v. 435, n. 13, p. 168145, jul. 2023.

BENZIGER, C. P.; CARMO, G. A. L. DO; RIBEIRO, A. L. P. Chagas Cardiomyopathy. **Cardiology Clinics**, v. 35, n. 1, p. 31–47, fev. 2017.

BERMAN, J. D. Human Leishmaniasis: Clinical, Diagnostic, and Chemotherapeutic Developments in the Last 10 Years. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, n. 4, p. 684–703, 1 abr. 1997.

BONNEY, K. M. *et al.* Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 14, n. 1, p. 421–447, 24 jan. 2019.

BRANON, T. C. *et al.* Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. **Nature Biotechnology**, v. 36, n. 9, p. 880–887, 1 out. 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Situação epidemiológica da Leishmaniose Visceral**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/situacao-epidemiologica-da-leishmaniose-visceral>>. Acesso em: 15 nov. 2023a.

_____. **Distribuição da Leishmaniose Tegumentar.** Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/lt/situacao-epidemiologica>>. Acesso em: 16 nov. 2023b.

BRENNAND, A.; RIGDEN, D. J.; MICHELS, P. A. M. Trypanosomes contain two highly different isoforms of peroxin PEX13 involved in glycosome biogenesis. **FEBS Letters**, v. 586, n. 13, p. 1765–1771, 21 jun. 2012.

BURCHMORE, R. J. S.; BARRETT, M. P. Life in vacuoles – nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 12, p. 1311–1320, out. 2001.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, set. 2018.

CALVO-ÁLVAREZ, E. *et al.* Redistribution of <sc>FLAgellar</sc> Member 8 during the trypanosome life cycle: Consequences for cell fate prediction. **Cellular Microbiology**, v. 23, n. 9, 14 set. 2021.

CALVO-ALVAREZ, E. *et al.* FLaGellum Member 8 modulates extravascular distribution of African trypanosomes. **PLOS Pathogens**, v. 19, n. 12, p. e1011220, 21 dez. 2023.

CAMPOS, M. C. *et al.* Genome-wide mutagenesis and multi-drug resistance in American trypanosomes induced by the front-line drug benznidazole. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 14407, 31 out. 2017.

CAMPOS, M. C. O. *et al.* Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi*: Evidence that distinct mechanisms can act in concert. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 193, n. 1, p. 17–19, jan. 2014.

CARNIELLI, J. B. T. *et al.* Natural Resistance of *Leishmania infantum* to Miltefosine Contributes to the Low Efficacy in the Treatment of Visceral Leishmaniasis in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 4, p. 789–794, 2 out. 2019.

CDC'S GLOBAL HEALTH CENTER. **Leishmaniasis.** Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>>. Acesso em: 17 nov. 2023.

_____. **American Trypanosomiasis.** Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>>. Acesso em: 17 nov. 2023.

CHALGHAF, B. *et al.* Ecological niche modeling predicting the potential distribution of *Leishmania* vectors in the Mediterranean basin: impact of climate change. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 461, 9 dez. 2018.

- CHAPMAN-SMITH, A.; CRONAN, J. E. The enzymatic biotinylation of proteins: a post-translational modification of exceptional specificity. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 24, n. 9, p. 359–363, set. 1999.
- CHOI-RHEE, E.; SCHULMAN, H.; CRONAN, J. E. Promiscuous protein biotinylation by *Escherichia coli* biotin protein ligase. **Protein Science**, v. 13, n. 11, p. 3043–3050, 29 nov. 2004.
- COLASANTE, C. *et al.* Proteins and lipids of glycosomal membranes from *Leishmania tarentolae* and *Trypanosoma brucei*. **F1000Research**, v. 2, p. 27, 29 jan. 2013.
- CRESPILLO-ANDÚJAR, C. *et al.* Use of benznidazole to treat chronic Chagas disease: An updated systematic review with a meta-analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 5, p. e0010386, 16 maio 2022.
- CROFT, S. L.; SEIFERT, K.; YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **The Indian journal of medical research**, v. 123, n. 3, p. 399–410, mar. 2006.
- D. W. KIMBERLIN. **Red Book: 2018-2021 report of the committee on infectious diseases**. 31. ed. [s.l.: s.n.].
- DAHAL, P. *et al.* Visceral Leishmaniasis in pregnancy and vertical transmission: A systematic literature review on the therapeutic orphans. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 8, p. e0009650, 10 ago. 2021.
- DAMASCENO, R. F. *et al.* Failure to use health services by people with Chagas disease: Multilevel analysis of endemic area in Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 9, p. e0010785, 19 set. 2022.
- DANG, H. Q. *et al.* Proximity Interactions among Basal Body Components in *Trypanosoma brucei* Identify Novel Regulators of Basal Body Biogenesis and Inheritance. **mBio**, v. 8, n. 1, 8 mar. 2017.
- DAS, A. *et al.* Topoisomerases of kinetoplastid parasites as potential chemotherapeutic targets. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 8, p. 381–387, ago. 2004.
- DOCAMPO, R.; HUANG, G. New insights into the role of acidocalcisomes in trypanosomatids. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 69, n. 6, 8 nov. 2022.
- DOCAMPO, R.; MORENO, S. The Acidocalcisome as a Target for Chemotherapeutic Agents in Protozoan Parasites. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n. 9, p. 882–888, 1 mar. 2008.
- DURRANI, H. *et al.* A Global Analysis of Enzyme Compartmentalization to Glycosomes. **Pathogens**, v. 9, n. 4, p. 281, 12 abr. 2020.

FERNANDES, M. C.; ANDREWS, N. W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* : a unique strategy that promotes persistence. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 3, p. 734–747, maio 2012.

FERRAZ, L. R. M. *et al.* Drug associations as alternative and complementary therapy for neglected tropical diseases. **Acta Tropica**, v. 225, p. 106210, jan. 2022.

FERREIRA, A. Z. L. *et al.* Metacyclogenesis as the Starting Point of Chagas Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 1, p. 117, 21 dez. 2023.

FERREIRA, M. U. **Parasitologia Contemporânea**. 2. ed. [s.l: s.n.].

FIDALGO, A. S. O. DE B. V. *et al.* Seroprevalence and risk factors of Chagas disease in a rural population of the Quixeré municipality, Ceará, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 54, 2021.

FIELD, M. C.; CARRINGTON, M. The trypanosome flagellar pocket. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 775–786, 6 nov. 2009.

FLOWER, C. The Imaging of Tropical Diseases. **European Journal of Radiology**, v. 46, n. 2, p. 161, maio 2003.

FRANCISCO, A. F. *et al.* Biological factors that impinge on Chagas disease drug development. **Parasitology**, v. 144, n. 14, p. 1871–1880, 23 dez. 2017.

GALLAND, N.; MICHELS, P. A. M. Comparison of the peroxisomal matrix protein import system of different organisms. Exploration of possibilities for developing inhibitors of the import system of trypanosomatids for anti-parasite chemotherapy. **European Journal of Cell Biology**, v. 89, n. 9, p. 621–637, set. 2010.

GARCÍA-HUERTAS, P. *et al.* Prostaglandin F₂ α synthase in *Trypanosoma cruzi* plays critical roles in oxidative stress and susceptibility to benznidazole. **Royal Society Open Science**, v. 4, n. 9, p. 170773, 20 set. 2017.

GONZALEZ-MARTIN, G. *et al.* Characterization and Trypanocidal Activity of Nifurtimox-containing and Empty Nanoparticles of Polyethylc y anoacrylates. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 50, n. 1, p. 29–35, 12 abr. 2011.

GOOS, C. *et al.* The nuclear proteome of *Trypanosoma brucei*. **PLOS ONE**, v. 12, n. 7, p. e0181884, 20 jul. 2017.

GOSSAGE, S. M.; ROGERS, M. E.; BATES, P. A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 10, p. 1027–1034, set. 2003.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 8, n. 4, p. 419–433, 10 abr. 2010.

GUALDRÓN-LÓPEZ, M. *et al.* Translocation of solutes and proteins across the glycosomal membrane of trypanosomes; possibilities and limitations for targeting with trypanocidal drugs. **Parasitology**, v. 140, n. 1, p. 1–20, 23 jan. 2013.

HALL, B. S.; WILKINSON, S. R. Activation of Benznidazole by Trypanosomal Type I Nitroreductases Results in Glyoxal Formation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 1, p. 115–123, jan. 2012.

HANANYA, N. *et al.* A genetically encoded photoproximity labeling approach for mapping protein territories. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 120, n. 16, 18 abr. 2023.

HASSLOCHER-MORENO, A. M. *et al.* Temporal changes in the clinical-epidemiological profile of patients with Chagas disease at a referral center in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 54, 2021.

HENDRICKX, S. *et al.* Evidence of a drug-specific impact of experimentally selected paromomycin and miltefosine resistance on parasite fitness in *Leishmania infantum*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 7, p. 1914–1921, jul. 2016.

HUANG, M. *et al.* The cysteine-free single mutant C32S of APEX2 is a highly expressed and active fusion tag for proximity labeling applications. **Protein Science**, v. 28, n. 9, p. 1703–1712, 6 set. 2019.

JABARI, S. *et al.* Chagasic megacolon: enteric neurons and related structures. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 142, n. 3, p. 235–244, 25 set. 2014.

JACKSON, Y.; WYSSA, B.; CHAPPUIS, F. Tolerance to nifurtimox and benznidazole in adult patients with chronic Chagas' disease. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 3, p. 690–696, 1 mar. 2020.

JAMDHADE, M. D. *et al.* Comprehensive Proteomics Analysis of Glycosomes from *Leishmania donovani*. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, v. 19, n. 3, p. 157–170, mar. 2015.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 11 ago. 2011.

KESSLER, R. L. *et al.* Recently differentiated epimastigotes from *Trypanosoma cruzi* are infective to the mammalian host. **Molecular Microbiology**, v. 104, n. 5, p. 712–736, 9 jun. 2017.

- KIM, D. I. *et al.* An improved smaller biotin ligase for BioID proximity labeling. **Molecular Biology of the Cell**, v. 27, n. 8, p. 1188–1196, 15 abr. 2016.
- KREIS, E. *et al.* TurboID reveals the proximiomes of *Chlamydomonas* proteins involved in thylakoid biogenesis and stress response. **Plant Physiology**, v. 193, n. 3, p. 1772–1796, 26 out. 2023.
- KUMARI, S. *et al.* Amphotericin B: A drug of choice for Visceral Leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 235, p. 106661, nov. 2022.
- KURUP, S. P.; TARLETON, R. L. The Trypanosoma cruzi Flagellum Is Discarded via Asymmetric Cell Division following Invasion and Provides Early Targets for Protective CD8+ T Cells. **Cell Host & Microbe**, v. 16, n. 4, p. 439–449, out. 2014.
- LAINSON, R.; RANGEL, E. F. Lutzomyia longipalpis and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811–827, dez. 2005.
- LAM, S. S. *et al.* Directed evolution of APEX2 for electron microscopy and proximity labeling. **Nature Methods**, v. 12, n. 1, p. 51–54, 24 jan. 2015.
- LEWIS, M. D.; KELLY, J. M. Putting Infection Dynamics at the Heart of Chagas Disease. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 11, p. 899–911, nov. 2016.
- LUCAS SILVA DE OLIVEIRA. **Enriquecimento de proteínas parceiras de KAHRP e mapeamento de proteínas organelares de Plasmodium falciparum utilizando CRISPR-Cas9, APEX2 e proteômica**. Brasília : Universidade de Brasília, 2021.
- MAAROUF, M. *et al.* In Vivo Interference of Paromomycin with Mitochondrial Activity of Leishmania. **Experimental Cell Research**, v. 232, n. 2, p. 339–348, maio 1997.
- MANN, S. *et al.* A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 8, n. 2, p. 121–132, 17 jun. 2021.
- MANNA, P. T. *et al.* Life and times: synthesis, trafficking, and evolution of VSG. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 5, p. 251–258, maio 2014.
- MARCINIAK, M. *et al.* Development of novel PEX5-PEX14 protein-protein interaction (PPI) inhibitors based on an oxopiperazine template. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 258, p. 115587, out. 2023.
- MARKUS, M. B. Dormancy in mammalian malaria. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 2, p. 39–45, fev. 2012.

- MARTÍN-ESCOLANO, J. *et al.* An Updated View of the *Trypanosoma cruzi* Life Cycle: Intervention Points for an Effective Treatment. **ACS Infectious Diseases**, v. 8, n. 6, p. 1107–1115, 10 jun. 2022.
- 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, dez. 2009.
- MAYA, J. D. *et al.* Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, n. 4, p. 601–620, abr. 2007.
- MEHEUS, F. *et al.* Cost-Effectiveness Analysis of Combination Therapies for Visceral Leishmaniasis in the Indian Subcontinent. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 9, p. e818, 7 set. 2010.
- MEJIA, A. M. *et al.* Benznidazole-Resistance in *Trypanosoma cruzi* Is a Readily Acquired Trait That Can Arise Independently in a Single Population. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 206, n. 2, p. 220–228, 15 jul. 2012.
- MEYMANDI, S. *et al.* Treatment of Chagas Disease in the United States. **Current Treatment Options in Infectious Diseases**, v. 10, n. 3, p. 373–388, 26 set. 2018.
- MIRANDA-ARBOLEDA, A. F. *et al.* Roadblocks in Chagas disease care in endemic and nonendemic countries: Argentina, Colombia, Spain, and the United States. The NET-Heart project. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 12, p. e0009954, 30 dez. 2021.
- MOHEBALI, M.; MORADI-ASL, E.; RASSI, Y. Geographic distribution and spatial analysis of *Leishmania infantum* infection in domestic and wild animal reservoir hosts of zoonotic visceral leishmaniasis in Iran: A systematic review. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 55, n. 3, p. 173, 2018.
- MORRISWOOD, B. *et al.* Novel Bilobe Components in *Trypanosoma brucei* Identified Using Proximity-Dependent Biotinylation. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 2, p. 356–367, fev. 2013.
- MOYERSON, J. *et al.* Biogenesis of peroxisomes and glycosomes: trypanosomatid glycosome assembly is a promising new drug target. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, n. 5, p. 603–643, nov. 2004.
- MURTA, S. M. F. *et al.* Deletion of copies of the gene encoding old yellow enzyme (TcOYE), a NAD(P)H flavin oxidoreductase, associates with in vitro-induced benznidazole resistance in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 146, n. 2, p. 151–162, abr. 2006.
- NAGLE, A. S. *et al.* Recent Developments in Drug Discovery for Leishmaniasis and Human African Trypanosomiasis. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 22, p. 11305–11347, 26 nov. 2014.

NEVES, D. P. *et al.* **Parasitologia Humana**. 13. ed. [s.l: s.n.].

OBERHOLZER, M. *et al.* Independent Analysis of the Flagellum Surface and Matrix Proteomes Provides Insight into Flagellum Signaling in Mammalian-infectious Trypanosoma brucei. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 10, n. 10, p. M111.010538, out. 2011.

OKWOR, I.; UZONNA, J. Social and Economic Burden of Human Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 3, p. 489–493, 2 mar. 2016.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). **Chagas disease**. Disponível em: <<https://www.paho.org/en/topics/chagas-disease#5>>. Acesso em: 19 nov. 2023.

PAN, M. *et al.* Identification of Novel Dense-Granule Proteins in *Toxoplasma gondii* by Two Proximity-Based Biotinylation Approaches. **Journal of Proteome Research**, p. acs.jproteome.8b00626, 26 out. 2018.

PEDRA-REZENDE, Y.; BOMBAÇA, A. C. S.; MENNA-BARRETO, R. F. S. Is the mitochondrion a promising drug target in trypanosomatids? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 117, 2022.

PETRAVICIUS, P. O. *et al.* Mapping benznidazole resistance in trypanosomatids and exploring evolutionary histories of nitroreductases and ABCG transporter protein sequences. **Acta Tropica**, v. 200, p. 105161, dez. 2019.

PINTO-MARTINEZ, A. K. *et al.* Mechanism of Action of Miltefosine on Leishmania donovani Involves the Impairment of Acidocalcisome Function and the Activation of the Sphingosine-Dependent Plasma Membrane Ca²⁺ Channel. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 1, jan. 2018.

PONTE-SUCRE, A. *et al.* Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 12, p. e0006052, 14 dez. 2017.

QUIÑONES, W. *et al.* Structure, Properties, and Function of Glycosomes in Trypanosoma cruzi. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 31 jan. 2020.

RAJAK, M. K. *et al.* Leishmania major biotin protein ligase forms a unique cross-handshake dimer. **Acta Crystallographica Section D Structural Biology**, v. 77, n. 4, p. 510–521, 1 abr. 2021.

REINALDO SALOMÃO. **Infectologia - Bases Clínicas e Tratamento**. 2/2023 ed. [s.l: s.n.].

RHEE, H.-W. *et al.* Proteomic Mapping of Mitochondria in Living Cells via Spatially Restricted Enzymatic Tagging. **Science**, v. 339, n. 6125, p. 1328–1331, 15 mar. 2013.

- RIM, E. Y.; NUSSE, R. APEX2-Mediated Proximity Labeling of Wnt Receptor Interactors Upon Pathway Activation. **microPublication biology**, v. 2023, 2023.
- ROUX, K. J. *et al.* A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. **Journal of Cell Biology**, v. 196, n. 6, p. 801–810, 19 mar. 2012.
- SÁNCHEZ-VALDÉZ, F. J. *et al.* Spontaneous dormancy protects *Trypanosoma cruzi* during extended drug exposure. **eLife**, v. 7, 26 mar. 2018.
- SANCHIZ, Á. *et al.* The Experimental Proteome of *Leishmania infantum* Promastigote and Its Usefulness for Improving Gene Annotations. **Genes**, v. 11, n. 9, p. 1036, 2 set. 2020.
- SANT’ANNA, C. *et al.* Subcellular proteomics of *Trypanosoma cruzi* reservosomes. **PROTEOMICS**, v. 9, n. 7, p. 1782–1794, 30 abr. 2009.
- SANTOS JÚNIOR, A. DE C. M. DOS *et al.* Unveiling the *Trypanosoma cruzi* Nuclear Proteome. **PLOS ONE**, v. 10, n. 9, p. e0138667, 18 set. 2015.
- SCARPINI, S. *et al.* Visceral Leishmaniasis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment Regimens in Different Geographical Areas with a Focus on Pediatrics. **Microorganisms**, v. 10, n. 10, p. 1887, 21 set. 2022.
- SCHENKMAN, S.; PASCOALINO, B. DOS S.; NARDELLI, S. C. Nuclear Structure of *Trypanosoma cruzi*. *Em: [s.l: s.n.]*. p. 251–283.
- SEIDI, A. *et al.* Elucidating the mitochondrial proteome of *Toxoplasma gondii* reveals the presence of a divergent cytochrome c oxidase. **eLife**, v. 7, 11 set. 2018.
- SIQUEIRA-NETO, J. L. *et al.* Cysteine proteases in protozoan parasites. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 8, p. e0006512, 23 ago. 2018.
- SOUZA, W. DE. Special organelles of some pathogenic protozoa. **Parasitology Research**, v. 88, n. 12, p. 1013–1025, 1 dez. 2002.
- STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 82, 15 dez. 2017.
- SUÁREZ, C. *et al.* Diagnosis and Clinical Management of Chagas Disease: An Increasing Challenge in Non-Endemic Areas. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v. Volume 13, p. 25–40, jul. 2022.
- SULLIVAN, W. J.; JEFFERS, V. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 3, p. 717–733, maio 2012.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Paromomycin in the treatment of leishmaniasis. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 17, n. 5, p. 787–794, 30 maio 2008.

TANOWITZ, H. B. *et al.* Chagas' disease. **Clinical microbiology reviews**, v. 5, n. 4, p. 400–19, out. 1992.

TEIXEIRA, D. E. *et al.* The Cell Biology of Leishmania: How to Teach Using Animations. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 10, p. e1003594, 10 out. 2013.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. Microevolution and subspecific taxonomy of *Trypanosoma cruzi*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 103, p. 105344, set. 2022.

TORRES-GUERRERO, E. *et al.* Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, p. 750, 26 maio 2017a.

_____. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, p. 750, 26 maio 2017b.

TRAN, J. R. *et al.* An APEX2 proximity ligation method for mapping interactions with the nuclear lamina. **Journal of Cell Biology**, v. 220, n. 1, 4 jan. 2021.

TRINKLE-MULCAHY, L. Recent advances in proximity-based labeling methods for interactome mapping. **F1000Research**, v. 8, p. 135, 31 jan. 2019.

TRIPATHI, R. K. P.; DEY, R.; DAS, N. Identification of natural lead molecules as potential *Trypanosoma cruzi* cruzipain inhibitors and decoding the interaction mechanism for the treatment of Chagas disease: a computational biology analysis. **Natural Product Research**, p. 1–5, 7 set. 2023.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 5–6, p. 472–481, maio 2001.

UEZU, A. *et al.* Identification of an elaborate complex mediating postsynaptic inhibition. **Science**, v. 353, n. 6304, p. 1123–1129, 9 set. 2016.

VÉLEZ-RAMÍREZ, D. E. *et al.* APEX2 Proximity Proteomics Resolves Flagellum Subdomains and Identifies Flagellum Tip-Specific Proteins in *Trypanosoma brucei*. **mSphere**, v. 6, n. 1, 24 fev. 2021.

VERA-IZAGUIRRE DS, V.-M. E. Q.-C. M. ET AL. Leishmaniasis. A review. **Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica**, v. 4, n. 4, p. 252–260, 2006.

VERPLAETSE, E.; RIGDEN, D. J.; MICHELS, P. A. M. Identification, characterization and essentiality of the unusual peroxin 13 from *Trypanosoma brucei*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1793, n. 3, p. 516–527, mar. 2009.

WELLER, P. F.; DURAND, M. L.; PILCH, B. Z. Case 4-2005. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 6, p. 609–615, 10 fev. 2005.

WON, M. M.; BAUBLIS, A.; BURLEIGH, B. A. Proximity-Dependent Biotinylation and Identification of Flagellar Proteins in *Trypanosoma cruzi*. **mSphere**, v. 8, n. 3, 22 jun. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Neglected tropical diseases (NTDs)**. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases#tab=tab_2>. Acesso em: 20 nov. 2023a.

_____. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_1>. Acesso em: 19 nov. 2023b.

_____. **Leishmaniasis**. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1>. Acesso em: 19 nov. 2023c.

ZAIDEL, E. J.; SOSA LIPRANDI, Á. Neglected of the neglected: Crude reality of Chagas disease. **Medicina**, v. 81, n. 4, p. 675–676, 2021.