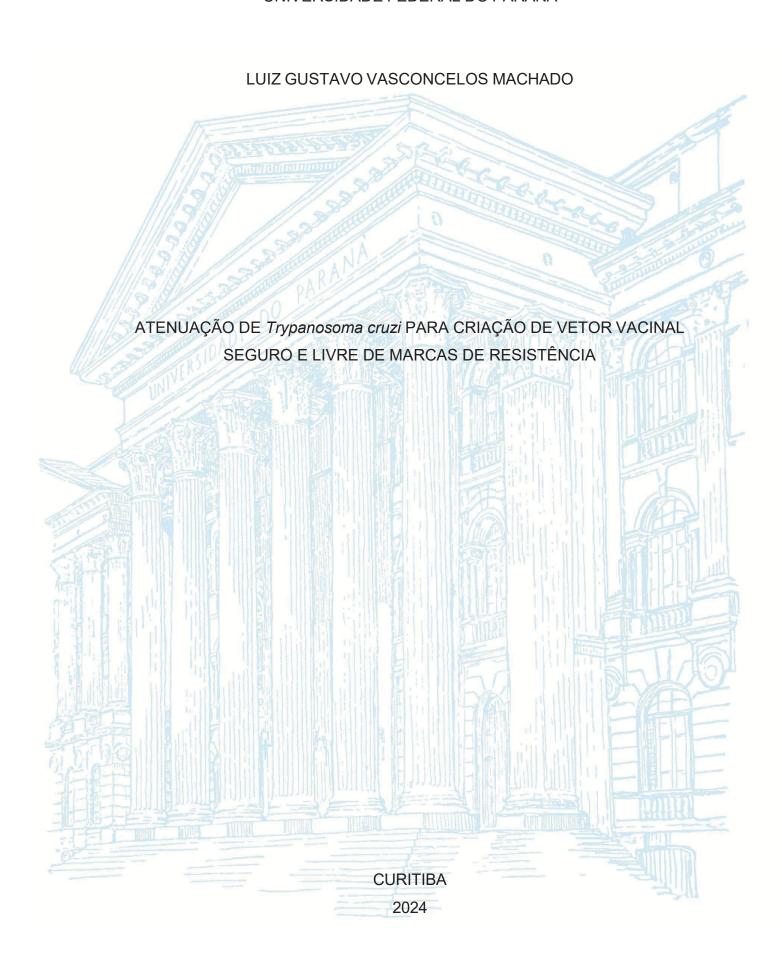
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ



LUIZ GUSTAVO VASCONCELOS MACHADO

ATENUAÇÃO DE *Trypanosoma cruzi* PARA CRIAÇÃO DE VETOR VACINAL SEGURO E LIVRE DE MARCAS DE RESISTÊNCIA

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímicas), Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (Bioquímica).

Orientador: Prof. Dr. Wanderson Duarte da Rocha

Coorientadora: Pesqa. Dra. Lia Carolina A. Soares de Medeiros Kuczera

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Machado, Luiz Gustavo Vasconcelos

Atenuação de uma cepa de *Trypoanosoma cruzi* para criação de vetor vacinal mais seguro e livre de marcas de resistência / Luiz Gustavo Vasconcelos Machado. — Curitiba, 2024. 1 recurso on-line: PDF.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica).

Orientador: Prof. Dr. Wanderson Duarte da Rocha. Coorientadora: Pesqa. Dra. Lia Carolina A. Soares de Medeiros Kuczera.

1. Trypanosoma cruzi. 2. Chagas, Doença de. 4. Edição de genes I. Rocha, Wanderson Duarte da. II. Kuczera, Lia Carolina A. Soares de Medeiros. III Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). IV. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva. CRB-9/1406



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA) - 40001016003P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de LUIZ GUSTAVO VASCONCELOS MACHADO intitulada: ATENUAÇÃO DE *Trypanosoma cruzi* PARA CRIAÇÃO DE VETOR VACINAL SEGURO E LIVRE DE MARCAS DE RESISTÊNCIA, sob orientação do Prof. Dr. WANDERSON DUARTE DA ROCHA, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 04 de Setembro de 2024.

Assinatura Eletrônica 05/09/2024 15:41:48.0 WANDERSON DUARTE DA ROCHA Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica 05/09/2024 21:03:54.0 LISANDRO ALFONSO PACHECO LUGO Avaliador Externo (UNIVERSIDAD SIMON BOLIVAR) Assinatura Eletrônica 05/09/2024 15:10:53.0 BRENO CASTELLO BRANCO BEIRÃO Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ -UFPR)

Assinatura Eletrônica 05/09/2024 14:58:55.0 SHEILA MARIA BROCHADO WINNISCHOFER Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)





RESUMO

A doença de Chagas é considerada a terceira maior doença parasitária, tem como tratamento os medicamentos Nifurtimox e o Benzonidazol, que possuem alta toxicidade e causam diversos efeitos colaterais, tendo assim uma necessidade de buscar novos meios de prevenção, como o desenvolvimento de vacinas. Esse trabalho tem como objetivo gerar parasitas atenuados por meio da edição de gene essencial para o desenvolvimento de formas infectivas no hospedeiro mamífero. Para isto, escolhemos os genes de Centrina 4 e PFR2 de Trypanosoma cruzi (TcCTN4 e TcPFR2) utilizando a técnica de CRISPR/Cas9, a fim de obter um vetor vacinal mais seguro. A partir do gene de Centrina 4 de Leishmania foi possível identificar os ortólogos em tripanosomatídeos (identidade superior a 89%). TcCTN4 apresenta 91,95% de identidade com o ortólogo em L. major, que já foi nocauteado e que tem sido utilizado como vacina. Para as edições gênicas, transfectamos com o complexo de sgRNA e SaCas9, e o DNA doador simples fita em epimastigotas de T. cruzi da cepa Colombiana superexpressando os genes repórteres tdTomato e Luciferase. Após a confirmação da edição, clonamos os parasitas por diluição limitante e identificamos vários clones com a edição completa para Centrina 4 ou de PFR2. Na tentativa de obter parasitos duplo mutantes, o clone TcCTN4 -/- foi transfectado para editação do gene TcPFR2. Contudo após a clonagem, não encontramos nenhum clone nocaute completo de TcPFR2, apenas com a interrupção de Centrina 4. Diversas tentativas foram feitas, e não foi possível conseguir um clone com o nocaute de ambos os genes. Epimastigotas TcCTN4 -/apresentaram diversas alterações morfológicas e redução significativa na taxa de crescimento após sete dias. Na diferenciação in vitro, TcCTN4 -/- exibiu uma menor proporção de formas metacíclicas. Em células VERO infectadas, os parasitas TcCTN4 -/- apresentaram uma baixa taxa de infecção (1,35% comparado a 6,39% dos TcCTN4 +/+). Amastigotas TcCTN4 -/- tiveram uma taxa de replicação significativamente reduzida e não se transformaram em tripomastigotas. Em camundongos infectados. parasitas +/+ apenas TcCTN4 bioluminescência, indicando maior infectividade. Análises de sangue revelaram uma resposta imune específica apenas em camundongos infectados com TcCTN4 +/+. Animais infectados com TcCTN4 -/- não apresentaram inflamação visível no local da infecção e tiveram baixa parasitemia, sugerindo uma redução significativa na virulência. Este estudo demonstra que a interrupção dos genes *Tc*CTN4 e *Tc*PFR2 afeta negativamente a morfologia, a taxa de crescimento, a diferenciação e a infectividade dos parasitas. Esses resultados destacam a importância dessas proteínas no ciclo de vida e na patogenicidade do *T. cruzi*, sugerindo que a edição gênica pode ser uma abordagem eficaz para reduzir a virulência e a capacidade infecciosa do parasita.

Palavras-chave: Trypanosoma cruzi; CRISPR/Cas9; centrina 4; edição genômica.

ABSTRACT

Chagas disease is considered the third largest parasitic disease and is currently treated with the drugs Nifurtimox and Benznidazole, both of which have high toxicity and cause various side effects. This creates a need to explore new preventive measures, such as the development of vaccines. This work aims to generate attenuated parasites through the editing of essential genes required for the development of infective forms in mammalian hosts. To achieve this, we selected the Centrin 4 of Trypanosoma cruzi (TcCTN4) as target gene to create a safer vaccine vector using the CRISPR/Cas9 system. Based on the Centrin 4 gene from Leishmania, we identified orthologs in trypanosomatids (with over 89% identity). TcCTN4 shares 91.95% identity with its ortholog in L. major, which has already been knocked out and used as a vaccine. In addition to TcCTN4, we also edited the paraflagellar rod protein 2 (PFR-2) genes, based on previously published data. For gene editing, we transfected *T. cruzi* Colombiana strain epimastigotes, which express tdTomato and luciferase, with a complex of sgRNA and SaCas9, along with singlestranded donor DNA. After confirming the gene editing in the parasite population, the parasites were cloned through limiting dilution, and several clones were identified with complete editing of Centrin 4 or TcPFR2. The TcCTN4 -/- clone was transfected to edit the PFR2 gene. After genotyping several clones for gene editing, we did not identify any mutant clone containing both genes edited. TcCTN4 -/- epimastigotes exhibited various morphological changes and a significant reduction in growth rate. In in vitro differentiation, TcCTN4 -/- showed a lower proportion of metacyclic forms. TcCTN4 -/- parasites display lower infection rate of VERO cells (1.35% compared to 6.39% for TcCTN4 +/+), and TcCTN4 -/- amastigotes show a dramatic reduction on replication rate and do not transform into trypomastigotes. When mice were infected mice, only TcCTN4 +/+ parasites showed bioluminescence, indicating higher infectivity. Blood analyses revealed a specific immune response only in mice infected with TcCTN4 +/+. Animals infected with TcCTN4 -/- did not exhibit visible inflammation at the infection site and had low parasitemia, suggesting a significant reduction in virulence. This study demonstrates that the disruption of the Centrin 4 and PFR2 genes in *T. cruzi* negatively affects the parasite's morphology, growth rate, differentiation, and infectivity. These results underscore the importance of these proteins in the life cycle and pathogenicity of *T. cruzi*, suggesting that gene editing could be an effective approach to reduce the virulence of this parasite.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; CRISPR/Cas9; centrin 4; genomic editing.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - CICLO DE VIDA DE Trypanosoma cruzi	17
FIGURA 2 - DIAGRAMA COM A REPRESENTAÇÃO CLÍNICA DA DOENÇA DE	
CHAGAS	. 18
FIGURA 3 - ESTRUTURA QUÍMICA DO BENZIDAZOL E NIFURTIMOX	20
FIGURA 4 - LOCALIZAÇÃO E INTERAÇÕES DAS CENTRINAS	26
FIGURA 5 - ESTRUTURA E DOMÍNIOS DAS CENTRINAS	. 27
FIGURA 6 - MODELO DESCREVENDO OS EFEITOS DO SILENCIAMENTO DE	
TbCentrin2 E TbCentrin4	.30
FIGURA 7 - IMUNIDADE MEDIADA PELA IMUNIZAÇÃO COM O MUTANTE DE	
LdCen-/	.31
FIGURA 8 - IMUNIDADE MEDIADA PELA IMUNIZAÇÃO COM O MUTANTE DE	
LmCen-/- E LmexCen-/	.33
FIGURA 9 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DO AXONEMA E PFR EM T. brucei E	E L.
mexicana	35
FIGURA 10 - FILOGENIA E IDENTIDADE ENTRE AS SEQUÊNCIAS DE	
CENTRINA 4 DE DIFERENTES TRIPANOSSOMATÍDEOS	
	47
FIGURA 11 - ESTRUTURA PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA DA PROTEÍNA CENTRII	NΑ
4	48
FIGURA 12 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS DOMÍNIOS E ESTRUTURA	
TERCIÁRIA DA CENTRINA 4	48
FIGURA 13 - LOCALIZAÇÃO DOS PRIMERS E SGRNA PARA EDIÇÃO	
	50
FIGURA 14 - GENOTIPAGEM DE CLONES OBTIDOS APÓS PROTOCOLO DE	
EDIÇÃO GENÔMICA	52
FIGURA 15 - PORCENTAGEM DE CLONES OBTIDOS APÓS EDIÇÃO GENÔMI	CA
DE TcCTN4 E TcPFR2	53
FIGURA 16 - PORCENTAGEM DE CLONES OBTIDOS APÓS EDIÇÃO DE Tc CT	N4
EM UM CLONE TcPFR2-/	.54
FIGURA 17 - FREQUÊNCIA DE CLONES OBTIDOS APÓS TENTATIVA DE	
EDIÇÃO GENÔMICA DE CEPA SELVAGEM DE COLOMBIANA PARA OS GENE	S

TcCTN4 E TcPFR2 EM CONJUNTO	55
FIGURA 18 - SEQUENCIAMENTO DE CLONE <i>Tc</i> CTN4-/-	
	56
FIGURA 19 - CURVA DE CRESCIMENTO COMPARATIVA ENTRE A CEPA	
SELVAGEM E OS CLONES EDITADOS, MOSTRANDO A VARIAÇÃO NA	
DENSIDADE CELULAR AO LONGO DO TEMPO	57
FIGURA 20 - ANÁLISE MORFOLÓGICA DE EPIMASTIGOTAS EDITADOS POF	₹
MICROSCOPIA CONFOCAL	58
FIGURA 21 - A EDIÇÃO DE <i>Tc</i> CTN4 INTERFERE COM A EFICIÊNCIA DE	
DIFERENCIAÇÃO DE FORMAS EPIMASTIGOTAS EM FORMAS	
TRIPOMASTIGOTAS METACÍCLICAS	59
FIGURA 22 - TAXA DE INFECÇÃO <i>IN VITRO</i> DE CÉLULAS VERO POR	
PARASITOS TcCTN4-/	60
FIGURA 23 - A INTERRUPÇÃO DE Tc CTN4 LEVA AO COMPROMETIMENTO D)A
LIBERAÇÃO DE <i>TcTS</i> EM ENSAIOS DE INFECÇÃO <i>IN VITRO</i>	
	61
FIGURA 24 - NÚMERO DE AMASTIGOTA POR CÉLULA EM ENSAIO DE	
INFECÇÃO IN VITRO	62
FIGURA 25 - MULTIPLICAÇÃO DE FORMAS AMASTIGOTA SELVAGENS EM U	JMA
MESMA CÉLULA – TcCTN4+/+	63
FIGURA 26 - A INTERRUPÇÃO DE Tc CTN4 COMPROMETE A MULTIPLICAÇÃ	O
DE FORMAS INTRACELULARES	64
FIGURA 27 - MICROSCOPIA CONFOCAL DE AMASTIGOTAS EM CÉLULAS	
VERO INFECTADAS	66
FIGURA 28 - ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE TDTOMATO NO SÍTIO DE INFECÇ	ίÃΟ
	67
FIGURA 29 - BIOLUMINESCÊNCIA EM CAMUNDONGOS INFECTADOS	68
FIGURA 30 - ANÁLISE DAS CÉLULAS T CD8 TSKB20+ POR CITOMETRIA DE	
FLUXO COM 10 DPI	69
FIGURA 31 - ANÁLISE DAS CÉLULAS T CD8 TSKB20+ POR CITOMETRIA DE	
FLUXO COM 15 DPI	70
FIGURA 32 - ANÁLISE DAS CÉLULAS T CD8 TSKB20+ POR CITOMETRIA DE	
FLUXO DE CAMUNDONGOS COM 60 DPI	71

FIGURA 33 - FOTOS DO LOCAL DE INFECÇÃO EM 16 DPI	72
FIGURA 34 - PARASITEMIA EM CAMUNDONGOS IFN-y KO INFECTADOS	73

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

Cas9: Proteína 9 associada a CRISPR.

CRISPR: Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente espaçadas.

crRNA: Do inglês CRISPR RNA.

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole.

KO: Do inglês "Knock-out".

mRNA: RNA mensageiro.

MTs: Tripomastigotas metacíclicos.

NHEJ: Reparo de DNA sem homologia.

PAM: Do inglês motivo adjacente protoespaçador.

Pb: Pares de bases.

PBS: Tampão de fosfato salino.

PCR: Reação em cadeia da polimerase.

RFLP: Do inglês polimorfismos de comprimentos de fragmentos de restrição.

sgRNA: Do inglês guia único de RNA.

TS: Transialidase.

CTN4: Centrina 4

PFR2: Proteina paraflagelar 2

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 JUSTIFICATIVA	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 DOENÇA DE CHAGAS	16
2.2 TRATAMENTOS PARA DOENÇA DE CHAGAS	20
2.3 VACINAS	22
2.4 CRISPR/CAS	24
2.5 CENTRINAS	27
2.6 CENTRINAS EM TRYPANOSOMATIDEOS	30
2.7 PFR	36
3 OBJETIVOS	39
3.1 OBJETIVOS GERAL	39
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 ANÁLISES IN SÍLICO	40
4.2 CONFECÇÃO DO SGRNA PARA EDIÇÃO GENÔMICA UTILIZANDO	
CRISPR/CAS9	40
4.3 COMPLEXO RNP E ELETROPORAÇÃO	42
4.4 MANUTENÇÃO DOS PARASITAS E CURVA DE CRESCIMENTO	43
4.5 METACICLOGÊNESIS	43
4.6 INFECÇÃO IN VITRO	44
4.7 EXPANSÃO E MICROSCOPIA CONFOCAL	44
4.8 INFECÇÃO IN VIVO	45
4.9 FENOTIPAGEM CÉLULAS T	46
4.10 PARASITEMIA	46
5 RESULTADOS	48
5.1 ANÁLISES <i>IN SILICO</i> DE CENTRINA 4	48
5.2 EDIÇÃO GENÔMICA DE <i>TC</i> CTN4	51
5.3 EDIÇÃO GENÔMICA DE TC CTN4 E TC PFR2 NO MESMO PARASITA	54
5.4 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE PARASITOS EDITADOS	57
5.5 A INTERRUPÇÃO DE TCCTN4 INTERFERE COMA VIRULÊNCIA DE T. C	RUZI.

5.6 ANÁLISE MORFOLÓGICA DE FORMAS INTRACELULARES DE T CCTN4 -/ 0	36
5.7 A EDIÇÃO DE <i>TC</i> CTN4 CAUSA UMA ATENUAÇÃO DRÁSTICA DA	
VIRULÊNCIA EM ENSAIOS DE INFECÇÃO <i>IN VIVO</i>	68
6 DISCUSSÃO	.74
7 PERSPECTIVAS	.79
REFERÊNCIAS	.80
APÊNDICE 1 – LISTA DE OLIGOS	.92
APÊNDICE 2 – SEQUÊNCIAS FILOGENIA	.93

1 INTRODUÇÃO

As Doenças Tropicais Negligenciadas são um grupo de doenças tropicais endêmicas que atingem aproximadamente 1 bilhão de pessoas. Dentre essas doenças temos a leishmaniose, que afeta mais de 200 mil pessoas por ano, e a doença de chagas com mais de 6 milhões de pessoas infectadas no mundo (ALVAR et al., 2012; WHO, 2022; NUNES et al., 2013). Embora muitos esforços se concentrem no controle do inseto-vetor, a persistência e disseminação dessas doenças ainda continuam, o que indica a necessidade de intervenções adicionais. Nesse contexto, o desenvolvimento de uma vacina seria uma boa opção como método preventivo para ambas as doenças.

Com o avanço da engenharia genética, muitas tecnologias de manipulação genética têm se demonstrado de grande interesse para a geração de diferentes tipos de vacinas. Dentre essas tecnologias, a técnica CRISPR/Cas9 tem se demonstrado de grande eficiência para a geração de células e modelos animais geneticamente modificados (ZHANG et al., 2017). Além de gerar organismos patogênicos geneticamente modificados para terem sua virulência reduzida e serem utilizados para a obtenção de vacinas (TANG et al., 2017). Como exemplo, TANG e colaboradores (2018) utilizaram essa ferramenta para gerar um vírus de importância veterinária, *Pseudorabies vírus*, com a interrupção de três genes, diminuindo a virulência do vírus e demonstrando que esse vírus recombinante é seguro para ratos e porcos, podendo ser utilizado no desenvolvimento de uma vacina.

Atualmente existem vários trabalhos em *Trypanosoma* relatando os efeitos causados pela deleção de diferentes genes. Silva-Gomes e colaboradores (2020) observaram que parasitas *Trypanosoma cruzi* do gene *Tc*NTPDase-1 continuaram viáveis, porém tiveram uma redução na sua taxa infectiva, e com a super expressão de *Tc*NTPDase-1 eles tiveram sua taxa infectiva aumentada. O nocaute do gene codificante para a *TcZ*C3H31 (*T. cruzi* CCCH ZnF protein), molécula importante para a diferenciação do parasita, não altera a proliferação em epimastigotas, porém os parasitas nocaute não são capazes de se diferenciar para a sua forma tripomastigotas metacíclicos tanto *in vitro* quanto *in vivo* (ALCANTARA *et al.*, 2018). As proteínas Trypanina, KHARON-1, GP72 e PAR-2, são proteínas cruciais do citoesqueleto responsáveis principalmente pelo movimento flagelar, cuja deleção diminui a motilidade e replicação do parasita (SANCHEZ *et al.*, 2016; LACOUNT *et*

al., 2002; LANDER et al., 2015). A Tripanina, uma proteína associada ao citoesqueleto de *T. brucei* cuja deleção causa problemas no movimento do flagelo tanto em *T. brucei* (HUTCHINGS et al., 2002) quanto *T. cruzi* (Saenz-Garcia et al 2021). Estudos utilizando *Leishmania donovani* com o nocaute para o gene p27 demonstraram que essa cepa modificada proporciona uma forte resposta das células T CD4+ e CD8+ em camundongos e garante proteção contra diferentes espécies de *Leishmania*. Essa cepa modificada também se apresentou segura para o uso, pois possui pouco tempo de infecção e não causa a patogenicidade da doença em camundongos (Dey et al., 2013).

Uma proteína que tem se dado atenção para criação de parasitas atenuados é a Centrina 4. Centrinas são proteínas pequenas (aproximadamente 20 kDa) com capacidade de se ligar ao cálcio, que pertencem à superfamília EF-hand (SALISBURY et al., 1986). Ela está presente em todos os eucariotos, mas o número de isoformas de centrinas é variável entre os organismos como algas e leveduras com apenas uma isoforma, enquanto eucariotos superiores possuem diversas isoformas. Centrinas de diversas espécies geralmente possuem uma alta homologia nas sequências (55-85%) (PARK et al., 2006) possuindo quatro hélice-loop-hélice em sua estrutura secundária (SCHIEBEL & BORNES, 1995). Nos seres humanos, existem três centrinas (FRIEDBERG, 2006) e há uma isoforma suplementar em rato (Centrina 4) (GAVET et al., 2003). A centrina é uma proteína ubíqua associada a centríolos/corpos basais, centrômeros e polos do fuso mitótico em células de diversas linhagens evolutivas, incluindo células de algas, plantas superiores, invertebrados e mamíferos (BARON & SALISBURY, 1988; KOUTOULIS et al., 1988; MELKONIAN et al., 1988; HÖHFELD et al., 1988). Foi demonstrado em estudos utilizando S. cerevisia e Chlamydomonas que a centrina desempenha um papel na posição e orientação do centrômero, na segregação do fuso mitótico e na ruptura de microtúbulos (SALISBURY, 1995).

Em *Leishmania*, ZHANG e colaboradores (2020) criaram uma vacina utilizando o parasita atenuado *Leishmania major* modificado para um não expressar a proteína centrina. Os autores observaram que a vacina com os parasitas modificados é segura e protege camundongos contra infecção de *L. major* selvagem. Análises utilizando *L. major* e *L. mexicana*, ambos com nocaute para Centrina, revelaram que as diferentes cepas alteram diferentes vias metabólicas relacionadas a proteção imunológica. Enquanto *L major* altera todas as vias do catabolismo do

triptofano, em *L. mexicana* foca na via de pentose fosfato (OLJUSKIN *et al.*, 2023). Cães imunizados com parasitas *L. major* nocaute para Centrina possuem a capacidade de produzir altos níveis de IFN-y e IL-23 e baixos níveis de IL-10 antes e depois do desafio com *L. infantum* (ZAREI *et al.*, 2023). Cães vacinados com *L. donovani* nocaute para centrina induzem alta produção de IFN-y e IL-12, além de baixos níveis de IL-10 e IL-4 (VIANA *et al.*, 2016). Além disso, essa imunização também pode induzir um aumento significativo em diversas citocinas (IFN-y, IL-2 e TNF) em camundongos (BANERJEE *et al.*, 2001; SELVAPANDIYAN *et al.*, 2009).

Em *T. brucei* foram identificadas 5 isoformas da Centrina (BERRIMAN *et al.*, 2005). *Tb*Centrin1 e *Tb*Centrin2 são localizadas no corpo basal e são essenciais para a sua duplicação (SELVAPANDIYAN *et al.*, 2001; HE *et al.*, 2005). *Tb*Centrin3 está localizada no flagelo e é essencial para a sua motilidade (WEI *et al.*, 2014). *Tb*Centrin4 é localizada nos corpos basais e sua estrutura está relacionada com a segregação de organelas e a coordenação entre citocinese e cariocinese (SHI *et al.*, 2008). *Tb*Centrin5 está localizada no citosol, núcleo e no flagelo e possui potencial de formar complexos com *Tb*Centrin1, *Tb*Centrin3 e *Tb*Centrin4 para auxiliar no processo biológico de outras centrinas (SHAN *et al.*, 2019). Atualmente não há trabalhos estudando as diferentes isoformas de centrina em *T. cruzi*.

Utilizando a cepa *T. cruzi* CL14 de baixa virulência, ALMEIDA e colaboradores (2018) modificaram o parasita para produzir a proteína amastigota 2 (A2), uma proteína essencial para a sobrevivência de *Leishmania* nos órgãos viscerais, que também serve como epítopo para uma resposta imunológica contra leishmania visceral. A vacinação utilizando esse parasita geneticamente modificado apresentou uma forte resposta imune mediado pelos linfócitos T e garantiu imunização contra cepas virulentas de *T. cruzi* e *L. Infantum* nos modelos animais utilizados. Esses resultados sugerem o potencial de *T. cruzi* na indução de uma proteção cruzada a multi patógenos. Além disso, um parasita atenuado também pode ser utilizado como vetor para entrega de antígenos de várias outras doenças, garantindo uma imunidade para mais de uma doença devido a capacidade desse parasita de provocar uma resposta imunológica mediada por células T.

1.1 JUSTIFICATIVA

O uso de parasitas atenuados como vacina é eficaz porque imita a infecção natural, induzindo uma resposta imunológica abrangente, tanto humoral quanto celular. Isso promove a formação de uma memória imunológica robusta, essencial para combater patógenos complexos como *Trypanosoma cruzi*. Além disso, parasitas atenuados apresentam um amplo espectro de antígenos, aumentando a eficácia e durabilidade da proteção, e podem proteger contra múltiplas variantes do patógeno, tornando essa estratégia de vacinação mais eficiente e abrangente.

A proteína Centrina tem se destacado como alvo para a criação de parasitas atenuados. Estudos demonstraram que a falta de Centrina em *Leishmania major* resultou em uma vacina segura que protege camundongos contra infecções (ZHANG *et al.*, 2020). No contexto de *T. brucei*, foram identificadas cinco isoformas de Centrina, cada uma desempenhando papéis específicos na duplicação do corpo basal, motilidade do flagelo e segregação de organelas (SELVAPANDIYAN *et al.*, 2001; HE *et al.*, 2005; WEI *et al.*, 2014; SHI *et al.*, 2008; SHAN *et al.*, 2019). No entanto, não há estudos específicos sobre as isoformas de Centrina em *T. cruzi*, o que abre uma nova área de pesquisa com potencial significativo para o desenvolvimento de vacinas.

Diante do exposto, este trabalho justifica-se pela necessidade urgente de novas estratégias preventivas para as DTNs. A pesquisa focada na aplicação da técnica CRISPR/Cas9 para a criação de parasitas geneticamente modificados e atenuados oferece uma abordagem inovadora e promissora para o desenvolvimento de vacinas eficazes contra a doença de Chagas. A capacidade de interromper genes específicos sem a necessidade de inserir genes de resistência a antibióticos ou outras marcas de seleção oferece uma vantagem significativa na criação de organismos geneticamente modificados para aplicações terapêuticas e vacinais.]

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇA DE CHAGAS

A doença de chagas, causada pelo protozoário *T. cruzi*, acomete atualmente 6 a 7 milhões de pessoas (WHO, 2023). A rota mais comum de transmissão é através das fezes contaminadas durante a picada do vetor triatomíneo (Hemiptera: *Reduviidae*), que entram em contato com a corrente sanguínea no local da picada ou nas membranas mucosas do hospedeiro. Outras rotas de infecção também podem se dar através de doação de sangue ou órgãos contaminados, consumo de alimentos ou bebidas contaminadas e congenitamente (Bern *et al.*, 2019).

Durante a alimentação de um percevejo triatomíneo em um hospedeiro contaminado, os tripomastigotas no sangue entram no intestino do inseto. Os parasitas, na forma epimastigota, migram do intestino médio para o intestino posterior, onde se ancoram às membranas perimicrovilares do intestino posterior iniciando a sua diferenciação de epimastigotas não infecciosos para tripomastigotas metacíclicos infectivos. Após a diferenciação os parasitos são migrados para o reto, onde serão excretados nas fezes e urina do percevejo durante sua próxima alimentação. Se o hospedeiro coça ou esfrega o local da picada contaminado com as fezes do percevejo, os parasitas presentes nas fezes podem entrar no organismo através de pequenas lesões na pele ou pelas mucosas, como a mucosa ocular ou oral. Uma vez dentro do hospedeiro, os parasitas podem se espalhar pelo corpo através do sangue (Alves *et al*, 2007; Garcia *et al.*, 2007).

Após a entrada no hospedeiro, os tripomastigotas metacíclicos se aderem a membrana celular do hospedeiro com seus flagelos, e ligam glicoproteínas a membrana celular do hospedeiro, mobilizando uma quantidade de cálcio necessária para entrar no citoplasma. Em seguida, o parasite aderido reconhece e altera ligantes, para internalização segura através de endocitose mediada por clatrina e lipídios caveolares (Onyekwelu, 2019). Após a entrada, os parasitas residem em um vacúolo fosfórico formado pela membrana plasmática, que se posteriormente se funde com o lisossomo da célula hospedeira. Local onde os parasitas se diferenciam de tripomastigotas para amastigotas (Teixeira et al., 2012). Após ou durante a metacíclicos diferenciação, os tripomastigotas е amastigotas secretam hemolisina/*Tc*-Tox, e trans-sialidase/neuraminidase, respectivamente. Ambos

compostos são necessários para realizar a fragmentação do vacúolo fosfórico do parasita e entrar no citoplasma da célula hospedeira. Os amastigotas reentram no ciclo celular e proliferam até que a célula hospedeira esteja cheia de parasitos, neste ponto, os amastigotas começam a se diferenciar em tripomastigotas não replicativos. Os tripomastigotas de corrente sanguínea rompem a célula hospedeira e entram na corrente sanguínea, infectando outras células (**Figura 1**) (Andreoli *et al.*, 2006; Huotari e Helenius, 2011; Teixeira *et al.*, 2012).

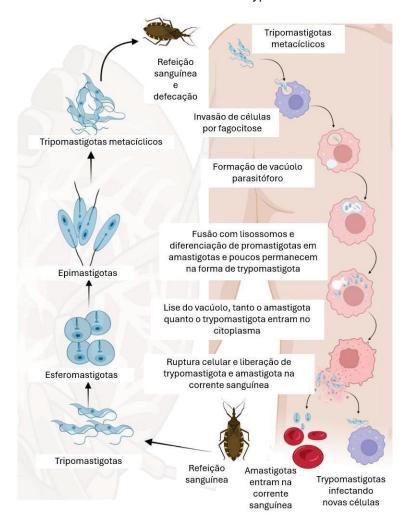


FIGURA 1. CICLO DE VIDA DE Trypanosoma cruzi.

Fonte: Modificada e traduzida de Berhe et al., 2024.

Legenda: Representação gráfica do ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* no inseto-vetor e no hospedeiro.

Após a exposição ao parasita, a fase aguda se inicia 1 a 2 semanas depois da infecção, e pode durar até 3 meses. A maioria dos casos os pacientes são

assintomáticos, porém em alguns casos eles podem apresentar um pouco de febre, pequena inflamação ou abcesso no sítio de infecção, que podem ser causados por uma pequena reação inflamatória à saliva ou fezes do percevejo (Carter et al., 2012). A infecção por via oral tem sido relatada como causadora de morbidade aquda mais severa e mais mortalidade do que a transmissão por vetores, isso se deve ao fato das glicoproteínas de superfície de T. cruzi terem alterações pela exposição ao ácido gástrico, aumentando a invasividade do parasita (Covarrubias et al., 2007; Yoshida, 2008; Barreto-De-Albuquerque et al., 2015). Durante a infecção recém-nascidos são assintomáticos, porém congênita, os uma porcentagem pode apresentar sintomas como baixo peso ao nascer, prematuridade, hepatoesplenomegalia, anemia, baixos escores de Apgar, trombocitopenia, meningoencefalite, megassíndromes gastrointestinais, miocardite, pneumonite e/ou dificuldade respiratória podendo levar a óbito (CDC, 2023). Na figura 2, está a representação de um diagrama com os estágios e sintomas da doença de chagas.

20-30% dos neste estágio Fase aguda Fase intermediário Fase crônica da doença de Chagas da doença de Chagas da doença de Chagas Estágio inicial Tromboembolismo Este estágio é principalmente Anormalidades de condução assintomático e muito raramente Menos de 5% exibem sintomas Arritmias apresenta sintomas que são ignorados Cardiomiopatia dilatada Mal-estar, febre pelos sujeitos infectados Desequilíbrio gástrico Lesões cardíacas Desequilíbrios cardíacos 💟 Desnervação do miocárdio Mal-estar Inchaço periorbital Fibrose miocárdica Febre Erupções epidérmicas Perturbações microvasculares Desequilíbrios cardíacos Edema com conjuntivite Aneurisma do ventrículo esquerdo Ramo direito do feixe de bloqueio Este estágio é imediatamente seguido pelo estágio crônico de Chagas Embolismo cerebral e acidente vascular cerebral Constipação Estágio posterior (muito raro) Impactação fecal Insuficiência cardíaca congestiva Acalasia Broncopneumonia Meningoencefalite

FIGURA 2. DIAGRAMA COM A REPRESENTAÇÃO CLÍNICA DA DOENÇA DE CHAGAS.

Fonte: Reproduzida e traduzida de Berhe et al., 2024.

Legenda: A doença de Chagas tem duas etapas ou fases clínicas: uma fase aguda e uma crônica. A maioria das pessoas infectadas (entre 70 e 80%) permanece assintomática durante toda a vida, mas em 20 a 30% dos casos, a doença progride para causar sintomas crônicos. A infecção também está associada a outras doenças e infecções, complicando assim a condição do paciente.

Para conseguir invadir o hospedeiro e evadir seu sistema imune, *T. cruzi* possui diversas estratégias como a alternância entre formas proliferativas intracelulares e tripomastigotas extracelulares não proliferativas, mas invectivos.

Diferenças formas e mudanças adaptativas na sua expressão genética durante todo o ciclo (Tyler et al., 2003). Porém, durante todo o ciclo há a ativação de diversas respostas imunológicos para combater a infecção. A resposta imune inata é a primeira linha de combate contra o parasita, ela é composta por macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células natural killer (Paiva et al., 2018). O ambiente inflamatório no início da infecção leva a ativação dos macrófagos, fazendo com que eles exercem efeitos citotóxicos, principalmente por meio da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico. Porém, o parasita possui um elaborado sistema antioxidante, contendo quatro superóxido dismutases de ferro (SODs), que ajudam a proteger o parasita contra os efeitos citotóxicos diretos do O2- e, portanto, inibem a formação de ONOO- ao detoxificar o radical superóxido (Piacenza et al., 2007; Cardoso et al., 2016). As células dendríticas capturam e processam os antígenos, passando por um processo de maturação e ativação logo em seguida. Para evadir essa estratégia, T. cruzi limita a maturação dessas células, e as leva a um perfil com uma redução da expressão de moléculas de superfície e liberação de citocinas (Overtvelt et al., 1999; Poncini et al., 2008).

Após a primeira leva de parasitas rompendo a célula do hospedeiro, o sistema imunológico do hospedeiro acaba reconhecendo padrões moleculares associados a danos (DAMPs) e a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) liberados ou degradados pelo parasita, desencadeando inflamação (Pinge-Filho, 2021). Para controlar a infecção intracelular, o hospedeiro conta com uma robusta resposta, porém lenta, das células T CD8+, gerando células T CD8+ específica para *T. cruzi* após os dias 8 - 9 de infecção (Martin *et al.*, 2006; Padilla *et al.*, 2009). O principal antígeno de *T. cruzi* em que as células T CD8+ reconhecem são as trans-sialidases. Esse antígeno e secretado ou recobre a superfície do parasita, que são expostas após a ruptura das células hospedeiras.

As transialidases formam uma família de enzimas altamente diversa, com mais de 1.400 genes codificantes identificados. Essa diversidade é refletida tanto na estrutura quanto na função dessas proteínas, com diferentes cepas do parasita expressando variantes específicas que podem influenciar sua capacidade de evadir o sistema imunológico do hospedeiro. Essa variação permite ao parasita adaptar-se a diferentes ambientes e hospedeiros, tornando a resposta imunológica do hospedeiro menos eficaz (Nardy *et al.*, 2016, Tzelepis *et al.*, 2008; Rosenberg *et al.*, 2010). A ativação das células das células T CD8+ acarreta uma ativação da

maquinaria molecular para eliminar a célula alvo, como por exemplo a produção de citocinas como IFN-γ, TNF-α e IL-2, responsáveis por ativar macrófagos que irão eliminar o parasita (Acosta Rodríguez *et al.*, 2019). Devido seu papel colaborativo com outras células, pouco se sabe sobre o papel direto das células T CD4+ (Acevedo *et al.*, 2018).

2.2 TRATAMENTOS PARA DOENÇA DE CHAGAS

O tratamento da Doença de Chagas se dá pela utilização de dois principais medicamentos: Nifurtimox e Benznidazol (**Figura 3**). Ambos foram desenvolvidos há mais de 50 anos. O tratamento é longo, podendo durar até 90 dias, possui um alto efeito tóxico e é ineficaz para pacientes na fase crônica (Sales Junior *et al.*, 2017; Caldes *et al.*, 2019). O mecanismo exato da atividade do Benznidazol ainda é desconhecido. Porém, ele é ativado por redutases tripanossomais dependentes de NADH, produzindo um metabólito redutivo que se torna tóxico ao parasita, podendo causar danos ao DNA e inibição da síntese proteica (Patterson & Wyllie, 2014). Atualmente, não há vacina disponível para prevenir a doença de Chagas.

FIGURA 3. ESTRUTURA QUÍMICA DO BENZIDAZOL E NIFURTIMOX.

Fonte: Autor.

Atualmente, alguns pesquisadores têm buscado descobrir medicamentos ou fazer o reposicionamento de medicamentos conhecidos para combater a Doença de Chagas. No reposicionamento de medicamentos, temos pesquisas utilizando medicamentos anticancerígenos como o inibidor de tirosina kinase Imatinib e seu análogo LS2/89, o inibidor de DNA topoisomerase NSC-706744, o medicamento contra câncer de mama Miltefosina e o Tamoxifen (Miguel et al., 2010; Simões-Silva et al., 2019; Bernatchez et al., 2020; Gulin et al., 2022; de Freitas et al., 2023). Medicamentos anti-histaminicos como Clemastina, Azelastina, Loratadina, Cyproheptadina e Cinnarizina (De Rycker et al., 2016, Alberca et al., 2018; Sayé et al., 2020). Medicamentos psicoativos como Ifenprodil, Ziprasidona, Sertralina, Promazina, Clorpromazina, Clomipramina, Naproxeno e Nimesulida (Iribarne et al., 2009; De Rycker et al, 2016; García et al., 2016; Ferreira et al., 2018; Adasme et al., 2020; Hashimoto, 2021; Trindade et al., 2021). Medicamentos para redução do colesterol como Atorvastatina e Clofibrato (de Rycker et al., 2016; Campos-Estrada et al., 2023). Medicamentos para condições do coração como Amiodarona, Carvedilol, Manidipina e Benidipina (Adesse et al., 2011; Bellera et al., 2015; Correa et al., 2021; Rivero et al., 2021). Medicamentos antifúngicos como Terconazol e Cetoconazol (Kaiser et al., 2015; Reigada et al., 2019). Medicamentos antibióticos e antivirais como Metronidazol, Ciprofloxacino, Piperacilina, Clofazimina, Saquinavir e 348U87 (Bellera et al., 2015; Simões-Silva et al., 2017; Adasme et al., 2020; Sayé et al., 2020) além de diversos outros antiparasitários (Kaiser et al., 2015; Fraccaroli et al., 2022). O reposicionamento de medicamentos (e a descoberta de medicamentos em geral) em T. cruzi enfrenta diversos desafios, como a falta de conhecimento abrangente da biologia do T. cruzi e dos alvos de medicamentos (Jansen et al., 2020).

Um medicamento novo que tem se dado atenção atualmente é o composto Anacor benzoxaborole ou AN15368 (Padilla *et al.*, 2022). Esse composto é ativado pela enzima carboxipeptidase do parasita para produzir um composto que tem como alvo a via de processamentos de RNAm. AN15368 tem se mostrado ativo *in vitro* e *in vivo* em primatas não humanos. Além de não apresentar toxicidade aguda detectável ou algum impacto na saúde ou reprodução a longo prazo do animal.

2.3 VACINAS

A busca por uma vacina contra a Doença de Chagas se iniciou em 1912, logo após Blanchard demonstrar que animais que sobreviveram a infecção por *T. cruzi* tornaram-se resistentes à reinfecção (Davalas, 1979). Pesquisas de imunização utilizando parasitas mortos, quimicamente ou fisicamentente, foram feitas em seguida, sempre com resultados insatisfatórios. Em 1968, Menezes *et al.*, determinaram que a cepa Y de *T. cruzi* que estava sendo cultivada por 15 anos se tornou avirulenta, devido a mutações no decorrer dos anos. Ele também demonstrou que a imunização com essa cepa protegia animais contra infecções de diferentes cepas de *T. cruzi*, demonstrando que os fatores de virulência não são imunogênicos necessários para uma vacina. Devido a insegurança dessa cepa recuperar a virulência, a primeira geração de vacinas utilizando cepas avirulentas não foi continuada (Menezes *et al.*, 1968)

A segunda-geração de vacinas se baseia na utilização de proteínas imunogênicas de *T. cruzi*, nativas ou recombinantes. Algumas proteínas mostraram forte resposta imunogênica em camundongos como: proteína paraflagelar (PFR), antígenos excretórios-secretórios do tripomastigota, proteína recombinante KMP11, proteínas associadas ao arcabouço de microtúbulos do parasita, glicoproteína de membrana GP82, proteína de membrana de amastigota e transialidases (Taibi et al., 1993; Yoshida *et al.*, 1993; Santori *et al.*, 1996; Marañón *et al.*, 2001; Araujo *et al.*, 2005; Morell et al., 2006; Hoft et al., 2007; Giddings et al., 2010). Vacinação com Cruzipaina co-administrada com um lipopeptídeo ativador de macrófago, MALP-2, gerando uma resposta protetiva com o aumento na produção de óxido nítrico, IL-12 e IFN-γ (Hoft et al., 2007; Guiñazú et al., 2007). Mesmo com a utilização de diversas proteínas recombinantes, a principal resposta imune observada é a produção de anticorpos específicos, porém a resposta celular bem limitada. Devido T. cruzi possuir uma fase do seu ciclo intracelular, evitando o contato do parasita com os anticorpos, anticorpos não são suficientes para controlar a infecção. Devido a essas características, um imunizante que gera uma resposta celular elevada, em especial uma resposta por células T CD8+, é crucial para combater a infecção (Sánchez-Valdéz *et al.*, 2014).

A terceira-geração de vacinas é baseado na utilização de vacinas de DNA, vetores não patógenos e parasitas geneticamente atenuados. As vacinas de DNA

apresentam várias vantagens de distribuição, como a fácil manufaturamento, ampla administração e sem a necessidade de uma câmara fria para a distribuição (Porter & Raviprakash, 2017). Alguns antígenos têm se usado para essas vacinas como TSA-1, Tc24 e Cruzipaina, porém a vacinação apesar de demonstrar uma forte resposta celular por células Th1, após os desafios não foi observado a imunidade estéril (Garg & Tarleton *et al.*, 2002; Cazorla *et al.*, 2008, Ramos-Vega *et al.*, 2023).

As vacinas com patógenos atenuados oferecem várias vantagens como: a mimetização da rota de infecção; fornece um amplo espectro de epítopos antigênicos e moléculas estimulantes do sistema imunológico, pode apresentar uma infecção transitório que proporciona uma carga antigênica pequena, autocontrolada e duradoura, além de possuir um baixo custo de produção em comparação com outros tipos de vacinas (Sánchez-Valdéz et al., 2014). Apesar das vantagens, também é possível observar fatores como incertezas quanto a atenuação do parasita, atenuação excessiva, reversão da atenuação para um fenótipo virulento e a persistência do parasita no hospedeiro, todas essas características devem ser levadas em consideração na criação de uma vacina de parasita atenuada (Leguizamón et al., 1993).

Um dos primeiros trabalhos observando a vacinação de camundongos com um parasita atenuado através de modificações genéticas, foi realizado por Cooper et al (1993), os autores realizaram uma deleção bi alélica no gene GP72 na cepa Y de T. cruzi. Os parasitos alterados, confirmados por análises de Western blotting, resultou em um fenótipo com modificações na adesão do flagelo na membrana do parasita. Os mutantes apresentaram capacidade de infectar diversos tipos celulares e baixa replicação no inseto-vetor, porém em experimentos in vivo demonstraram eles não produzem infecção duradoura que uma em camundongos imunocompetentes e imuno deficientes, e não apresentam uma resposta inflamatória tecidual ou produção de anticorpos anti-T. cruzi. Camundongos vacinados com essa cepa mutante, tiveram uma redução altamente significativa nos níveis de parasitemia, porém sem diferenças significativas na capacidade protetora em relação a cepa selvagem (Cooper et al., 1993; Basombrío et al., 2002).

Parasitas mutantes da cepa CL de *T. cruzi* com a deleção bi alélica de lyt1, não tiveram o seu crescimento na forma epimastigota afetado, porém apresentaram uma redução substancial na infectividade *in vitro* e *in vivo*, assim como uma redução na resposta inflamatória tecidual, consistente com a baixa carga parasitária

(Manning-Cela et al., 2001). Camundongos imunizados com essa cepa mutante apresentaram uma imunidade ativa, evidenciada pela baixa parasitemia durante 60 dias. Também foi verificado que o índice de peso do baço foi significativamente menor em camundongos imunizados. A esplenomegalia é causada pelo aumento nas populações de células linfoides B e T no baço, assim a sua redução é um efeito indireto da gravidade da infecção. A imunização induziu uma imunidade protetora duradoura, evidenciada em até 14 meses depois do desafio (Zago et al., 2008).

Calreticulina é uma chaperona cálcio-ligante envolvida no controle de qualidade das novas proteínas sintetizadas no reticulo endoplasmático (Labriola *et al.*, 1999). *T. cruzi* TCC com a deleção monoalélica de Calreticulina, não possuem morfologia alterada, porém tem seu crescimento afetado em epimastigota. A deleção de Calreticulina em ambos os alelos, não gera parasitas viáveis. Camundongos BALB/c infectados com essa cepa mutante não tiveram detecção na parasitemia após 6 meses, sugerindo a redução da virulência dessa cepa (Ferreira *et al.*, 2004, Ramírez *et al.*, 2011). Camundongos imunizados com essa cepa mutante, apresentaram uma redução significativa da quantidade de parasitas no sangue, redução da resposta inflamatória no musculo e coração, e sem mortalidade, porém não apresentaram redução na parasitemia quando comparado com camundongos não imunizados (Ragone *et al.*, 2012).

2.4 CRISPR/CAS

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) foram descobertas pela primeira vez nas sequências de DNA da bactéria Escherichia coli e descritas por Ishino et al. em 1987, porém as primeiras informações experimentais sobre o mecanismo de ação do sistema CRISPR foram obtidas em 2007 por Barrangou et al. Atualmente, CRISPR foram encontradas na maioria dos genomas de arqueas e em quase metade dos genomas bacterianos estudados, mas não foram encontradas em sequências de DNA eucarióticas ou virais. Atualmente, os sistemas CRISPR-Cas (CRISPR associado a proteína Cas) são classificados em 2 classes e 6 tipos, que se dividem em vários subtipos (Marakova et al., 2019). A principal diferença entre as classes é que o módulo efetor da Classe 1 é composto por um complexo de várias proteínas, enquanto na Classe 2 é uma única proteína multidomínio (como por exemplo, a Cas9). De todas as proteínas Cas conhecidas,

as mais estudadas são aquelas pertencentes ao sistema de corte direcionado de DNA estrangeiro, por exemplo a Cas9, as chamadas "tesouras genéticas" (Bolotin *et al.*, 2005).

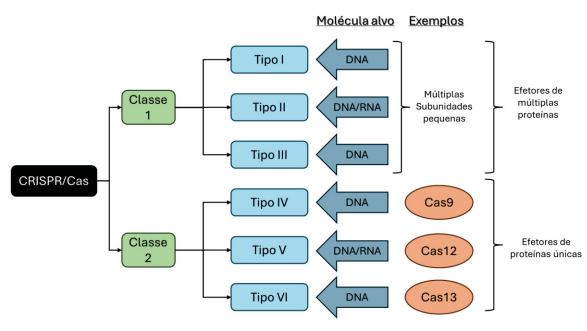


Figura 10. MICROSCOPIA ELETRONICA DO AXONEMA E PFR EM T. brucei e L. mexicana.

Fonte: Autor.

Legenda: Classificação convencional dos sistemas de CRISPR-Cas.

A proteína Cas9 possui seis domínios: REC I, REC II, Hélice de Ponte, PAM, HNH e RuvC. O domínio REC I é responsável por se ligar no RNA guia. A hélice de ponte é rica em arginina e é crucial para iniciar a atividade de clivagem ao se ligar ao DNA alvo. O domínio PAM confere especificidade, sendo responsável por iniciar a ligação ao DNA alvo. Os domínios HNH e RuvC são domínios de nucleases que cortam o DNA. O papel do domínio REC II ainda não é compreendido (Gupta *et al.*, 2019).

Para realizar o corte no DNA, a Cas9 se liga com um RNA guia. O RNA guia é composto por um RNA de fita simples, podendo ser de tamanho diverso que forma uma estrutura em T. O RNA guia é projetado para ter uma extremidade 5' complementar à sequência de DNA alvo, fornecendo especificidade à sequência do genoma alvo.

A resposta imune em bactérias utilizando o sistema CRISPR-Cas envolve três etapas: adaptação, expressão e interferência (*Barrangou* et al., 2007). Na etapa de adaptação, um complexo de proteínas Cas liga-se a uma molécula de DNA invasora através do motivo PAM, e causa quebra da dupla fita. O fragmento de DNA liberado, chamado protospacer, é integrado entre duas repetições da matriz CRISPR e se torna um espaçador. Na fase de expressão, ocorre a expressão dos genes Cas e a transcrição do CRISPR em um longo RNA precursos (pre-crRNA), que é processado em crRNA. Na etapa de interferência, a ação combinada do crRNA e das proteínas Cas reconhece e cliva o ácido nucleico estrangeiro, protegendo assim as células hospedeiras da infecção (Marakova *et al.*, 2006; *Barrangou* et al., 2007).

Entre as proteínas Cas do sistema CRISPR, a proteína Cas9 é a mesma utilizada no sistema CRISPR para engenharia genômica, comumente usada para edição e regulação genômica. O sistema CRISPR/Cas9 envolve a utilização de uma Cas9 com os sítios HNH e RuvC, responsáveis por realizar o corte na fita alvo do DNA. A Cas9 forma um complexo ribonucleoproteico com RNA que terá a sua sequência de ancoragem e outra de reconhecimento da fita alvo (Jinek *et al.*, 2012; Gasiunas *et al.*, 2012).

A fita alvo de DNA possui um *protospacer*, complementar à extremidade 5' e do sgRNA, e um PAM curto ligado pela Cas9, adjacente ao *protospacer*. O sgRNA reconhece uma sequência específica no genoma, e a Cas9 atua como uma tesoura para clivar a sequência de DNA. A Cas9 não cliva a sequência na ausência de um PAM. Diferentes sistemas CRISPR tipo II bacterianos possuem diferentes proteínas Cas9, sendo a Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) mais utilizada (Cong & Zhang, 2014; Hirano *et al.*, 2016). Tem se utilizado a SaCas9 de *Staphylococcus aureus* para edição genômica em trypanosomatideos, devido ao seu tamanho ser menor que a SpCas9, passando com mais facilidade pela barreira física da membrana do parasito (Soares-Medeiros *et al.*, 2017).

Existem dois principais mecanismos endógenos de reparo em eucariotos: junção de extremidades não homólogas (NHEJ) e reparo direcionado por homologia (HDR). No mecanismo NHEJ, as fitas de DNA são juntadas através de fatores proteicos, porém esse mecanismo de reparo é propenso a erros, podendo resultar em deleções ou adições de nucleotídeos errôneos. O mecanismo HDR requer a presença de sequências de DNA doador com sequencias homologas, podendo ser

das cromátides-irmãs ou de DNA externo, para resultar em inserções precisas e substituições de bases entre dois (Lin *et al.*, 2014; Branzei & Foiani, 2008).

2.5 CENTRINAS

As centrinas, pequenas proteínas citoesqueléticas de aproximadamente 20 kDa, fazem parte da família de proteínas ligadoras de cálcio (*EF-hand*) (Bhattacharya *et al.*, 2004). Essas proteínas têm uma ampla distribuição, associando-se ao centríolo, centrossomos, corpos basais e polos mitóticos em diversos organismos, incluindo algas, plantas, invertebrados, células mamíferas e até tripanossomatídeos (Salisbury *et al.*, 1986; Baron & Salisbury, 1988; Höhfeld *et al.*, 1988; Katsaros *et al.*, 1991; He, 2005). Centrinas são proteínas com diversas isoformas, sendo que mamíferos podem possuir até 4 diferentes formas de centrinas (Gavet *et al.*, 2003; Giessl *et al.*, 2004; Middendrop & Küntziger, 2000; Salisbury *et al.*, 2002), enquanto A função das centrinas está relacionada ao posicionamento e orientação do centrossomo, à segregação dos fusos mitóticos e à clivagem dos microtúbulos, conforme observado por Salisbury (1995) em *S. cerevisiae*, e posteriormente demonstrado em células eucarióticas superiores (Tourbez *et al.*, 2004).

Apesar de observado uma forte localização das centrinas no centrossomo, linfoblastos humanos não possuem a maior concentração de centrinas localizada no centrossomo (Baron *et al.*, 1994), sendo possível observar essas proteínas interagindo com estruturas com atividades proteassômicas e no complexo de poros nucleares (Chen & Madura, 2008; Fischer *et al.*, 2004). A função da centrína é mediada por diferentes alvos de ligação e regulada pelos níveis de cálcio. Além disso, vários mecanismos regulatórios, como a fosforilação (Lutz *et al.*, 2001; Meyn *et al.*, 2006) e a SUMOilação (Klein & Nigg, 2009), podem modular a atividade e a localização subcelular da centrína. Esses mecanismos regulatórios diversificados podem possibilitar que organismos com um número relativamente limitado de centrinas alcancem a mesma diversidade funcional observada em organismos com um repertório expandido de membros da centrina (Zhang & He, 2011). As diversas localizações e interações das centrinas estão ilustrados na **Figura 4**.

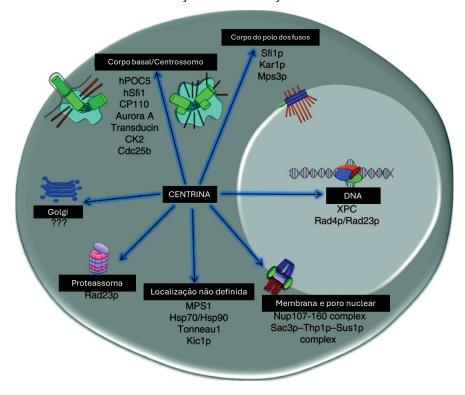


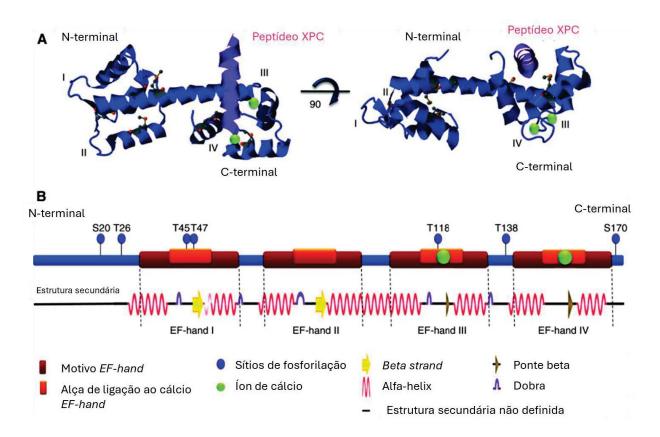
FIGURA 4. LOCALIZAÇÃO E INTERAÇÕES DAS CENTRINAS.

Fonte: Reproduzida e traduzida de Dantas et al., 2012.

Legenda: O desenho mostra as interações das centrinas em eucariotos superiores (em preto) e em leveduras (em marrom), indicando as organelas ou estruturas onde as centrinas foram encontradas associadas aos seus respectivos parceiros.

Atualmente, o modelo estrutural mais aceito para a centrina é a divisão de dois domínios independentes, domínio N-terminal (NTD) e domínio C-Terminal (CTD). Cada domínio contém um par de *EF-hand*, cada estrutura *EF-hand* é composta por duas alfa-hélices (Veeraraghavan *et al.*, 2002). Um esquema da estrutura secundária e terciária das Centrinas está ilustrado na **Figura 5**. Em uma maneira geral, a ligação do cálcio no motivo *EF-hand* facilita o reconhecimento do peptídeo-alvo pela proteína, com os locais de ligação de peptídeo de baixa afinidade sendo ativados na presença de cálcio (Radu *et al.*, 2010).

Figura 5. ESTRUTURA E DOMÍNIOS DAS CENTRINAS.



Fonte: Reproduzida e traduzida de Dantas et al., 2012.

Legenda: (A) Um diagrama de fita da Centrina 2 de *Homo sapiens*, elaborado com base na estrutura descrita para a proteína, excluindo os primeiros 24 aminoácidos da extremidade N-terminal (Thompson *et al.*, 2006). A representação lons de cálcio são representados como esferas verdes, e os *EF-hands* são marcados por números romanos. (B) Representação bidimensional dos domínios principais da Centrina 2 de Homo sapiens, composta por 172 aminoácidos, juntamente com a estrutura secundária correspondente.

Embora ambos os pares de *EF-hand* demonstrem afinidade pelo cálcio, em *Chlamydomonas*, o domínio localizado na região C-terminal exibe uma afinidade maior pelo cálcio, enquanto o par na região N-terminal possui uma maior afinidade por um peptídeo Kar1 (Ortiz *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2004). Já em *Leishmania donovani*, o domínio *EF-hand* na região C-terminal consegue se ligar ao cálcio de forma mais eficiente do que o domínio na região N-terminal (Sheehan *et al.*, 2006). Na extremidade N-terminal das centrinas, há uma região desordenada de ~20 aminoácidos, a qual não é muito conservada entre diferentes centrinas, mas quando presente pode ser utilizado para distinguir as centrinas de outras proteínas *EF-hand* (Huang *et al.*, 1988). Análises *in vitro* demonstraram que algumas centrinas podem formar agregados, em particular centrinas de *Scherffelia dubia*, podendo formar estruturas filamentosas dependentes de cálcio (Wiech *et al.*, 1996)

2.6 CENTRINAS EM TRYPANOSOMATIDEOS

Em *T. brucei*, foram identificadas cinco isoformas de centrinas. *Tb*CTN1 e *Tb*CTN2 estão localizadas no corpo basal e são essenciais para a duplicação do corpo basal (He *et al.*, 2005). *Tb*CTN3 está localizada no flagelo e é necessária para a motilidade flagelar (Wei *et al.*, 2014). *Tb*CTN4 está localizada tanto nos corpos basais quanto na estrutura de bilobo e está envolvida na segregação de organelas e na coordenação entre cariocinese e citocinese (Shi *et al.*, 2008). *Tb*CTN5 é encontrada no citosol, núcleo e no flagelo, e possui a capacidade de formar complexos com as demais Centrinas dependendo dos níveis de cálcio celular (Shan *et al.*, 2019).

Através da técnica de RNAi, He e colaboradores (2005) observaram que o silenciamento de *Tb*CTN1 ou *Tb*CTN2 faz com que ocorra a inibição do da duplicação do corpo basal, afetando a divisão do kinetoplasto, porém sem efeito na divisão nuclear. O silenciamento acabou afetando a citocinese, criando assim células multinucleadas. Esses fenótipos foram observados em aproximadamente 10% da população após 24 horas de interrupção de *Tb*CTN1 e 48 horas de interrupção de *Tb*CTN2. Os autores também observaram que o silenciamento de *Tb*CTN2 afetou a duplicação do complexo de golgi, o que resultou em aproximadamente 72% das células com apenas em um complexo de golgi. Entretando, a interrupção de *Tb*CTN1 teve resultou contrário, em que 77% das células apresentaram ambos os complexos de Golgi. Assim demonstrado que *Tb*CTN2 é essencial para o processo de duplicação do complexo de Golgi (He *et al.*, 2005).

silenciamento de TbCTN3 parasitas Т. *brucei* com gera comprometimento de sua motilidade, porém sem paralisar os parasitas. Parasitas modificados ainda apresentam flagelos funcionais, porém incapazes de percorrer longas distancias, o que acaba fazendo com que os parasitas fiquem girando em um mesmo local ou em raros casos movem-se para trás (Wei et al., 2014). Outras observações também foram feitas em relação a interdependência de TbCTN3 e TblAD5-1 (Inner Arm Dynein) na formação de um flagelo estável. O silenciamento de TbCTN3 causa uma diminuição gradual de TbIAD-1 da ponte distal de um novo flagelo. Quando ocorre a desestabilização do complexo *Tb*CTN3-TbIAD5-1, ambas as proteínas são transportadas do flagelo para o citosol e degradas, processo que

também ocorre com a desestabilização do complexo *outer-arm dynein* (Wei *et al.*, 2014; Duquesnoy *et al.*, 2009).

TbCTN4 foi localizada nos corpos basais e na estrutura bilobada próximo ao Complexo de Golgi, localização semelhante com os resultados observados para TbCTN2. O silenciamento de TbCTN4 não afetou a duplicação das organelas e a citocinese nos parasitas em até 48 horas após o silenciamento. Entretanto, após 48 horas os parasitas apresentaram alterações no ciclo celular e muitas células maiores e multinucleadas, resultado semelhante ao observado no silenciamento de TbCTN4 (He et al., 2005; Shi et al., 2008). A maior diferença observada na interrupção de TbCTN4, quando comparada com TbCTN2, é a quantidade de células filhas anucleadas, porém com todas as organelas, observadas com a interrupção. Células com interrupção de *Tb*CTN4 apresentaram ~10% de sua população como zóides nas primeiras horas de silenciamento, seguido de uma população >40% em 72 horas. Esse crescimento do número de zóides sugere uma divisão celular defeituosa nas células com TbCTN4 interrompida. Esse defeito na divisão celular pode ser devido a uma separação mais lenta dos núcleos de células filhas recém-formadas, de modo que a citocinese acaba resultando na produção de uma célula zoide e uma célula 2N1K, sugerindo que a TbCTN4 está envolvida na coordenação do tempo da citocinese em relação a cariocinese (Shi et al., 2008).

Na **Figura 6**, temos um modelo representado de Shi e Colaboradores, 2008, descrevendo os efeitos do silenciamento de TbCTN2 e TbCTN4. Em células normais, a duplicação e segregação dos corpos basais, flagelos e cinetoplastos são seguidas pela divisão dos núcleos. A citocinese é iniciada na extremidade anterior da célula somente após a completa segregação dos núcleos, com o núcleo da célula filha posterior posicionado entre os cinetoplastos mais segregados. estrangulamento para o início da citocinese se forma entre as organelas segregadas e as divide igualmente em células filhas. A zona de adesão do flagelo, também conhecida como FAZ, acredita-se ter um papel importante na formação do estrangulamento citocinético. Em células com a interrupção de *Tb*CTN2, a duplicação/segregação dos corpos basais e cinetoplastos é inibida, enquanto o flagelo e o núcleo duplicam normalmente. A formação da nova FAZ também é inibida, possivelmente explicando a subsequente inibição da divisão celular. Em células com o silenciamento de TbCTN4, a duplicação e segregação dos corpos basais, cinetoplastos, flagelos e FAZ parecem normais. No entanto, a divisão

nuclear parece atrasada em relação à divisão celular, levando à formação de filhas 1K2N e zóides.

TbCentrin2-RNAi
Normal
TbCentrin4-RNAi

Figura 6. MODELO DESCREVENDO OS EFEITOS do silenciamento DE TbCTN2 E TbCTN4.

Fonte: Reproduzida de Shi et al., 2008.

Legenda: No meio estão as células normais, a esquerda células com a interrupção de *Tb*CTN2 e a direita células com a interrupção de *Tb*CTN4. Algumas de suas organelas e estruturas estão representadas: corpos basais (verde), flagelos (cinza), cinetoplastos (pequenos quadrados azuis), núcleos (grandes círculos azuis), FAZ (vermelho).

Em Leishmania, as centrinas já vem sendo estudada por mais de 20 anos. Em 2004, Selvapandiyan e colaboradores, desenvolveram um mutante de Leishmania donovani (LdCen-/-) com o knockout de um gene de centrina em ambos os cromossomos, através da substituição do gene por um gene de resistência à antibiótico. O fenótipo observado em promastigotas desse clone foi igual ao do selvagem, porém a deficiência de centrina fez com resultasse a falta de formação dos corpos basais e citocinese em amastigotas, o que levava a célula à parada celular na fase G2/M e a indução da apoptose, inibindo o crescimento em macrófagos infectados *in vivo*. Amastigotas que conseguiam realizar citocinese e divisão celular formavam células maiores e multinucleadas, incapazes de completar

o ciclo celular, resultando em morto celular (Selvapandiyan *et al.*, 2001; Selvapandiyan *et al.*, 2004).

Em estudos *in vivo*, a imunização com *Ld*Cen-/- gerou uma proteção duradoura contra *L. donovani*, *L. braziliensis* e *L. mexicana*, causadores de leishmaniose visceral, monocutânea e cutânea, respectivamente (Selvapandiyan *et al.*, 2009, Dey *et al.*, 2014). A proteção foi demonstrada pela redução da carga parasitária no fígado e baço e pela falta de lesão em camundongos imunizados. A vacinação causa um aumento na resposta imune de células Th17 e Th1 (Selvapandiyan *et al.*, 2009; Barnejee *et al.*, 2018), produção das citocinas IL-1β, IL-6, TGF-β, e IL-23 pelas células CD4+ e CD8+ (Barnejee *et al.*, 2018). Devido ao limite da expressão de CD200 em células dendríticas CD11c+, ocorre a redução de IL-10 e o aumento da produção de IFN-γ e TNF-α pelas células T CD4+. (Singh *et al.*, 2018). Na **figura 7**, está relatado os efeitos imunológicos causados pela imunização de *Ld*Cen-/-.

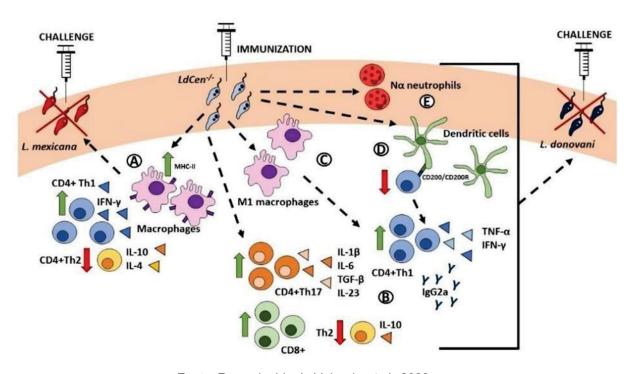


Figura 7. IMUNIDADE MEDIADA PELA IMUNIZAÇÃO COM O MUTANTE DE LdCen-/-.

Fonte: Reproduzida de Volpedo et al., 2022.

Legenda: A imunização com *Ld*Cen-/- leva a um influxo significativo de macrófagos expressando MHC-II, resultando em níveis mais altos de células Th1 CD4+ secretoras de IFN-γ+ e níveis mais baixos de células Th2 CD4+ secretoras de IL-10 e IL-4. Essa resposta oferece proteção contra o desafio de L. mexicana. A imunização com *Ld*Cen-/- também leva a um aumento significativo de células Th1 CD4+ secretoras de IFN-γ e TNF-α, células Th17 CD4+ secretoras de IL-1β, IL-6, TGF-β e IL-23, células T citotóxicas CD8+, Ig2a e níveis mais baixos de células Th2 CD4+ secretoras de IL-

10. Essas respostas, juntamente com o acúmulo de neutrófilos pró-inflamatórios Nα, levam à proteção contra o desafio de *L. donovani*.

A vacinação de camundongos infectados com L. donovani, modelo para infecção assintomática devido a características imunológicas específicas, utilizando LdCen-/- demonstra uma resposta muito parecida entre os camundongos assintomáticos e os camundongos controle, mostrando que também que pode ser utilizado em indivíduos assintomáticos (Ismail et al., 2017). Infecção in vitro de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes humanos que tiveram leishmaniose dérmica pós-calazar ou leishmaniose visceral, apresentaram uma produção forte de IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-6, IL-12, e IL-17e um aumento de células CD4+ e CD8+ produtoras de IFN- γ (Avishek et al., 2016). Vacinação com LdCen-/- também foi testada em cachorros. Comparando a imunogenicidade de LdCen-/- com Leishmune®, uma vacina para cachorro comercial, a vacinação com o parasita mutante apresenta imunogenicidade semelhante aos cachorros vacinados com a vacina comercial. Porém, a resposta celular com proliferação de CD4+ e CD8+, ativação de células T CD8+, produção de IFN-γ, diminuição da produção de IL-4 e aumento da secreção de TNF-α e IL-12/IL-23p40 pelas células T (Fiuza *et al.*, 2013; Fiuza et al., 2015).

Com o intuito de realizar testes clínicos, Selvapandiyan e colaboradores (2014) geraram uma cepa de *Leishmania major* com knockout para centrina (*Lm*Cen-/-) utilizando a técnica de CRISPR/Cas9. *Ld*Cen-/- não poderia passar para testes clínicos devido a: presença de um gene de resistência a antibióticos na interrupção do gene da centrina (Selvapandiyan *et al.*, 2014); por *L. donovani* ser causadora de leishmaniose visceral que possui poucos sinais clínicos da doença, como a lesão, o que faz necessário um diagnóstico mais invasivo (Srivastava *et al.*, 2011); ser mortal em 95% dos casos (McGwire & Satoskar, 2014). *L. major* tem se mostrada uma ótima candidata para ser utilizado nos testes clínicos em humanos da vacina por sua infecção ser tegumentar com sintomas leveis e auto curativa em comparação com outras cepas cutâneas (Volpedo *et al.*, 2021). Imunização de murinos com *Lm*Cen-/- garantiu a proteção contra novas infecções de *L. major* virulentas em desafios por agulha e por mosquito-palha essa proteção é garantida devido a recrutamento rápido de células multifuncionais do sistema imune para o sítio da infecção, iniciando uma resposta imune rápida após o desafio. Além disso,

também apresenta características semelhantes ao modelo de Leishmunização, caracterizado pela resposta de células T efetoras IFN-γ + e células de memória residente residual (Zhang *et al.*, 2020).

Vacinação utilizando *L. mexicana* com nocaute da centrina (*Lmex*Cen-/-) garante proteção contra a cepa virulenta de *L. mexicana* em camundongos geneticamente diferentes, BALB/c e C57BL/6. Enquanto camundongos BALB/c apresentaram uma diminuição da indicação da reposta de Th2, em camundongos C57BL/I foi observado um aumento da resposta Th1 na pele e dos nódulos linfáticos, sugerindo mecanismos diferentes de reposta de acordo com a genética do hospedeiro. Porém, em ambos os casos, vacinação com *Lmex*Cen-/- garante uma proteção contra desafios com a cepa virulenta de *L. mexicana*, promovendo uma resposta imune pró inflamatória e gerando células T de memória (Volpedo *et al.*, 2022). Na **Figura 8** podemos observar os efeitos protetivos causados pela vacinação de *Lm*Cen-/- e *Lmex*Cen-/- contra desafio de diferentes cepas virulentas de Leishmania por diferentes rotas (injeção ou mosquito-palha).

IMMUNIZATION CHALLENGE - IMMUNIZATION CHALLENGE LmexCen-/-LmCen-/-CD4+CD69+ **CD103+ TRM** L. mexicana **(C)** L. donovani L. major CD4+CD44+CD62L+ | IL-10 CD4+CD44HiLy6C+T-bet+ IL-4 Effector T cells Th2 < TNF-a IL-10 IL-10 Th2 IL-4 <

Figura 8. IMUNIDADE MEDIADA PELA IMUNIZAÇÃO COM O MUTANTE DE *Lm*Cen-/- e *Lmex*Cen-/-

Fonte: Reproduzida de Volpedo et al., 2022.

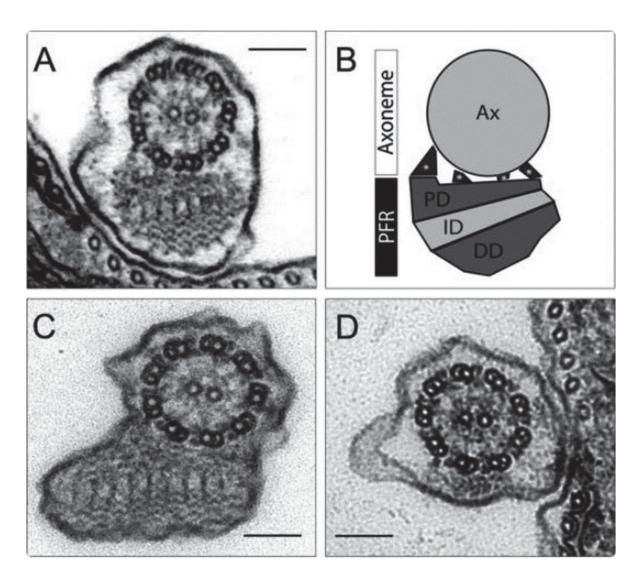
Legenda: (A) imunização com *Lm*Cen-/- gera um aumento no número de células T efetoras IFN-γ+ (CD4+CD44HiLy6C+T-bet+) e células T de memória residente tecidual (CD4+CD69+CD103+) em comparação com camundongos desafiados não imunizados. Essas populações celulares garantem a

proteção contra o desafio com *L. major* virulento, tanto por agulha quanto por mosquito-palha. (B) A imunização também resulta em maior expressão de IFN-γ e TNF-α no baço, aumento na resposta de Th1 e redução na resposta de Th2, que garantem proteção contra o desafio com *L. donovani* virulenta. (C) Em camundongos C57BL/6, a imunização com *Lmex*Cen-/- resulta em respostas aumenta na resposta com células Th1 na pele e nos linfonodos drenantes, levando à proteção contra o desafio por agulha com parasitas virulentos de *L. mexicana*. Já em (D) camundongos BALB/c, a imunização com *LmexCen-*/- leva à geração de células T de memória central (CD4+CD44+CD62L+) e a respostas Th2 significativamente menores na pele e nos linfonodos drenantes em comparação com os controles não imunizados, levando à proteção contra o desafio por agulha com parasitas virulentos de *L. mexicana*.

2.7 PFR

O bastão paraflagelar (PFR) é uma estrutura complexa treliçada trilaminar com domínios proximal, intermediário e distal definidos. Ela está localizada ao lado do axonema microtubular canônico 9 + 2 em diversos tripanosomatídeos como Trypanosoma, Phytomonas, Leishmania e Herpetomonas. Apesar de manter sua estrutura conservada em diferentes Kinetoplastos, a ultraestrutura da PFR varia em tamanho entre as espécies e, em alguns casos, pode estar significativamente reduzido (de Souza and Souto-Padron, 1980). O domínio localizado na região proximal está ligado a Zona de Fixação do Flagelo (FAZ) por meio de filamentos na face interna da membrana flagelar, sendo que o restante da proteína mantem a mesma orientação do axonema (**Figura 9**) (Gadelha *et al.*, 2006). Inicialmente foram identificadas duas PFRs que são abundantemente expressas, PFR1 e PFR2 com aproximadamente 80 kDa e 69 kDa, respectivamente. Através de técnicas de bioinformática, bioquímicas e imunológicas foram identificadas mais de 40 proteínas associadas as PFRs (Portman & Gull, 2010). Sua função tem sido relatada pelo envolvimento físico no flagelo, responsável por auxiliar no espessamento e endurecimento do flagelo (Fuge, 1969).

Figura 9. MICROSCOPIA ELETRONICA DO AXONEMA E PFR EM T. brucei e L. mexicana.



Fonte: Reproduzida de Portman e Gull, 2010.

Legenda: Microscopia eletrônica de transmissão de cortes transversais do (A) flagelo de *T. brucei* e do (C) flagelo de *L. mexicana*. (B) Esquema do flagelo de *T. brucei* mostrando o axonema (Ax) e os domínios proximal (PD); domínio intermediário (ID) e domínio distal (DD). Em (D) microscopia eletrônica de transmissão de cortes transversais do flagelo de *T. brucei* 48 horas após o silenciamento de PFR2 com RNAi.

Células com o silenciamento de PFR2 através da técnica de RNAi em *T. brucei* e a geração de um mutante nulo PFR2 em *L. mexicana*, apresentaram um fenótipo semelhante. Ambos os tipos celulares apresentaram uma diminuição drástica na amplitude e frequência do batimento flagelar, interferindo na motilidade da célula para frente (Santrich *et al.*, 1997; Bastin *et al.*, 2000). Através da técnica de microscopia eletrônica nesses clones, foi observado a perda da parte distal, intermediária e um pedaço da parte proximal não estavam ligadas ao axonema, porém PFR1 ainda estava presente na parte restante de PFR, sugerindo que apenas

PFR1 é necessária para formar a região do domínio mais proximal de PFR (Portman & Gull, 2010). Essa observação foi confirmada por Maga *et al.* (1999), que observaram que os domínios de PFR não foram montados em um clone de *L. mexicana* com knockout de PFR1, tendo a proteína PFR2 transportada para o flagelo, mas não incorporada. Não foi possível obter clones viáveis de *T. brucei* com o knockout duplo de PFR1 e PFR2 (Hunger-Glaser e Seebeck, 1997). A interrupção parcial de PFR1 ou PFR2 em epimastigotas de *T. cruzi*, através da técnica de CRISPR/Cas9, gerou células com a acumulação dos componentes de PFR na ponta do flagelo, seguido a perda total da PFR e o desgrudamento do flagelo do corpo celular. Os mutantes sem flagelo possuem motilidade reduzida, e acabam afundando no fundo da garrafa de cultura (Lander *et al.*, 2015).

A interação da PFR2 com outras proteínas, como as centrinas 4, que participam da organização do citoesqueleto e dos processos do ciclo celular, pode ter uma implicação direta na capacidade do parasita de infectar as células do hospedeiro. Como consequência, o estudo dessas interações torna-se muito importante para compreender em maior detalhe os mecanismos biológicos que sustentam a infectividade de *T. cruzi*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAL

Avaliar o efeito da edição do gene de Centrina 4 para atenuação de *Trypanosoma cruzi*, utilizando um sistema livre de marcas de seleção.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Realizar a caracterização *in silico* da Centrina 4 em *Trypanosoma cruzi*, identificando sequências ortólogas e realizando análises filogenéticas.
- Desenvolver e validar o sgRNA para edição genômica de TcCTN4 utilizando CRISPR/Cas9:
- Desenvolver um parasita com a interrupção dos genes *Tc*CTN4 e *Tc*PFR2.
- Avaliar o efeito da interrupção do gene Centrina 4 no ciclo de vida do parasita, incluindo sua replicação em diferentes formas, morfologia, e capacidade de diferenciação.
- Avaliar a infectividade e virulência de Trypanosoma cruzi TcCTN4 -/- in vitro e in vivo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANÁLISES IN SÍLICO

Sequencias ortológas dos genes PFR2 e Centrina foram obtidas através da busca na plataforma TriTrypDB utilizando a sequência aminoacidica das Centrinas de Leishmania major e Trypanosoma brucei como query. Para PFR2 foi utilizada a sequência de Trypanosoma cruzi (Gene ID: TcCLB.511215.119) (Lander et al., 2015). Softwares de bioinformática foram utilizadas para obtenção das sequencias aminoacidicas (Expasy Translate Tool http://web.expasy.org/translate/), determinação dos parâmetros bioquímicos (ProtParam Tool http://web.expasy.org/protparam/) e alinhamentos das sequências (Clustal Omega http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/). Após o alinhamento, as sequências aminoacidicas foram utilizadas para a construção de árvores de filogenéticas utilizando-se o programa MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11 (Tamura et al., 2021). utilizando o método estatístico Neighboor-Joining, com 1.000 replicatas. A localização dos domínios foi feita utilizando o software SMART (http://smart.embl-heidelberg.de). O modelo tridimensional foi gerado com a ferramenta Phyre2 (http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index) a partir do alinhamento com a sequência de Centrina 4 de *T. brucei* (PDB: 5ZOR; Shan et al., 2018).

4.2 CONFECÇÃO DO SGRNA PARA EDIÇÃO GENÔMICA UTILIZANDO CRISPR/CAS9

O RNA guia (sgRNA) foi desenhado para alvejar os genes *Tc*CTN4 (Gene ID: BCY84_06997) e *Tc*PFR2 (*TcC*LB.511215.119) utilizando o website EuPaGDT (http://grna.ctegd.uga.edu/), selecionando a nuclease Cas9 de *Staphylococcus aures* (SaCas9), sítio PAM NNGRRT (Peng & Tarleton, 2015) e *T. cruzi* Dm28c (TritrypDB-28) como genoma de referência. Para confirmar de que o sgRNA selecionado tenha como alvo a sequência de PFR2 e Centrina 4 em outras cepas de *T. cruzi*, foi realizado uma busca BlastN em todos os genomas da plataforma TriTrypDB, usando como query 50 nucleotídeos, sendo 25 nt *upstream* e 25 nt *downstream* do sítio de clivagem da SaCas9. A sequência para o sgRNA escolhida foi sintetizada com a

sequência de anelamento da T7 RNA Polimerase na região *upstream* do primer e a uma parte da sequência de *scaffold* da SaCas9 na região *downstream*.

O SaCas9 scaffold template para o sgRNA foi gerado em uma reação de PCR utilizando Phusion® *High-Fidelity* DNA Polymerase kit (Thermo Fisher). Brevemente, a reação de PCR foi feita utilizando 1 × Phusion GC *Buffer*, 0.2 mM de dNTPs, 1 µM de SaCas9gScaffolding-Fw, 1 µM de SaCas9gScaffolding-Rv, 3%0020de DMSO e 2 U de *Phusion* DNA *Polymerase*. As condições da reação foram 98°C por 3 min, seguida de diminuição de 0.1°C/segundo da temperatura para 72°C, e extensão final a 72°C por 5 min. Os produtos de amplificação foram analisados em géis de agarose (1%) corados com 1 × *GelRed*® *Nucleico Acid Gel Stain* (Sigma-Aldrich). O produto de PCR foi purificado utilizando o *E.Z.N.A Cycle Pure Kit* (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante para produtos de PCR menores de 200 pb.

O DNA molde para a transcrição *in vitro* foi gerado em uma reação de PCR utilizando 1 × de *OneTaq master mix* (Thermo Fisher) seguido de 3 μM do sgRNA primer foward (sgRNA_Centrin4KO; sgRNA_PFR2KO), 1.8 μM do primer reverse (SaCas9_gScaffR) e 2 ng do SaCas9 scaffold template. A reação de PCR foi realizada nas seguintes condições: desnaturação a 94°C por 2 min, seguida de 34 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, hibridização a 66.5°C por 30 s, extensão a 68°C por 25 s e extensão final a 68°C por 5 min. Os produtos de amplificação foram analisados em géis de agarose (2%) corados com 1 × *GelRed*® *Nucleico Acid Gel Stain* (Sigma-Aldrich). *E.Z.N.A Cycle Pure Kit* (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante.

A transcrição *in vitro* foi realizada utilizando o TranscriptAid T7 high yield transcription kit (Thermo Fisher) seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, a reação de transcrição foi feita utilizando 0,4 mM de ATP, 0,4 mM de CTP, 0,4 mM de GTP, 0,4 mM de UTP, 1 × tampão de reação, 2 μL de *Enzyme Mix* e 500 ng a 2000 ng do DNA molde para transcrição. A reação foi incubada no termociclador a 37°C por 4 a 5 horas. Para terminar a reação foi adicionado 300 mM de acetato de amônia. O produto da transcrição foi analisado em gel de agarose (2%) corado com 1 × *GelRed*® *Nucleico Acid Gel Stain* (Sigma-Aldrich). A precipitação do sgRNA foi feita incubando com 2.5 volumes de Etanol 100% gelado por 30 minutes a -20°C, seguido de centrifugação a 4°C por 20 minutos na velocidade máxima (>13000 g), lavagem com Etanol 75% gelado, centrifugação e após todo o sobrenadante

removido o RNA foi ressuspendido em água nuclease-free. Quantificação do sgRNA foi checada utilizando o Nanodrop™. Todos os oligos utilizados nesse trabalho estão listados no **Apêndice 1**.

4.3 COMPLEXO RNP E ELETROPORAÇÃO

Epimastigotas T. cruzi Colombiana expressando tdTomato e Luciferase foram utilizados para a edição de Centrina 4 e PFR2. Foi utilizado o protocolo descrito por Soares Medeiros et al. (2017) e Burle-Caldas et al. (2018), com modificações. Brevemente, 4x106 parasitas na fase log foram eletroporados com 50 μg de SaCas9 purificada, 10 μg de sgRNA e 30 μg do single-stranded DNA (ssDNA) donor. Foram feitas duas eletroporações, utilizando as mesmas concentrações, nas culturas de epimastigotas em um intervalo de 2 dias entre cada uma. A eletroporação foi realizada utilizando o Amaxa Nucleofector, protocolo X-014. Após 48 horas da última eletroporação, o DNA genômico foi extraído utilizando 1 mL da cultura eletroporada com o DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) ou pelo protocolo com filtro de papel. Para isso foi centrifugado 1 mL de cultura a 3000 rpm por 10 minutos, e ressuspendido em PBS 1 ×, foi adicionado 200 µL do Buffer AL (Qiagen) e 20 µL de Proteinase K (Qiagen) e incubadas por 10 minutos a 70°C. Foi adicionado a amostras em uma placa de 96 poços com um pedaço de filtro de papel, incubadas por 1 minutos, descartado e então adicionado 200 µL de Wash buffer (10mM tris, 0.1% tween 20), incubados por 1 minuto, descartado o sobrenadante e adicionado 100 µL Elution buffer (Qiagen). Para confirmação da edição foram realizadas reações de PCR utilizando 1× de OneTaq Master Mix (Thermo Fisher), 0,5 µM do oligo forward, 0,5 µM do oligo reverse e 100 ng do DNA genômico como template. O produto de PCR foi digerido com a enzima de restrição BamHI. O produto de digestão do gene Centrina 4 editada resulta em um produto de PCR de 466 pb, digestão com a enzima de restrição *Bam*HI gera duas bandas de tamanhos de 266 pb e 200 pb, e o gene PFR2 resulta em 790 pb, quando digerido se fragmenta em duas bandas de 634 e 156 bp. Todos os fragmentos foram detectados em gel de agarose gel de agarose (1,5%) corados com 1 × GelRed® Nucleico Acid Gel Stain (Sigma-Aldrich).

Após a confirmação da edição, os parasitas transfectados foram clonados utilizando diluição limitante em uma placa ELISA de 96 poços para obter a

população clonal. Para otimizar o crescimento dos parasitas durante a clonagem, eles foram mantidos no meio de cultura *liver digested-neutralized tryptose* (LDNT), suplementado com hemina e 20% de soro fetal bovino inativado por calor. A placa foi mantida em câmera úmida a 28°C e monitorada toda semana para checar o crescimento. Dois meses depois, os clones foram selecionados e diagnosticados para Polimorfismo de Fragmentos de Restrição (RFLP), como descrito acima, para confirmar a presente de clones *null* mutantes (*Tc*CTN4 -/- e *Tc*PFR2 -/-).

4.4 MANUTENÇÃO DOS PARASITAS E CURVA DE CRESCIMENTO

Epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* da cepa Colombiana expressando TdTomato e Luciferase, editados ou não, foram mantidas em crescimento logarítmico a 28°C no meio de cultura *liver digested-neutralized tryptose* (LDNT), suplementado com hemina, 10% de soro fetal bovino inativado por calor, penicilina e streptomicina, como já descrito por Camargo (1964). Para a análise da curva de crescimento, parasitas *Tc*CTN4 -/-, *Tc*CTN4 +/- e *Tc*CTN4 +/+ foram diluídos em 1x10⁶ parasitas/mL e a contagem foi feita diariamente em microscópio optico utilizando câmara de Neubauer. Cultura de parasitas na fase estacionaria foram diluídas 1:10 para contagem.

4.5 METACICLOGÊNESIS

A diferenciação *in vitro* foi realizada conforme descrito anteriormente, com algumas modificações (CONTRERAS *et al.*, 1985). Brevemente, 10x10⁶ epimastigotas/mL foram mantidos em 10 mL de LDNT por 3 dias, para chegar na fase log (1-2x10⁷ epimastigotas/mL). Os parasitas foram centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente e ressuspendido em meio TAU (190 mM de NaCl, 17 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, 2 mM de CaCl₂, 8 mM de Na₂HPO₄ e 0,035% NaHCO₃, pH 6,9), onde foram mantidos por 2 horas a 28°C. Depois, os parasitas foram diluídos (1:100) em meio TAU3AAG (Meio TAU suplementado com 10 mM de L-Prolina, 50 mM de L-glutamato de sódio, 2 mM de L-aspartato de sódio e 10 mM de glicose) e mantidos em 28°C por 5 dias. A contagem dos parasitas no sobrenadante foi feita diariamente utilizando câmara de Neubauer. Os epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos diferenciados, coletados através de centrifugação a

3000 rpm por 10 minutos, foram mantidos em 7 mL de soro fetal bovino *overnight*, que seletivamente lisa os parasitas na forma de epimastigotas. Os tripomastigotas metacíclicos foram coletados do sobrenadante e utilizados nos próximos experimentos.

4.6 INFECÇÃO IN VITRO.

Culturas de células VERO foram colocadas em uma placa de 24 poços em uma concentração de 4x10⁴ com o meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e incubadas a 37°C com 5% de CO₂. Tripomastigotas metacíclicos (MTs) obtidos da metaciclogênese foram utilizados para a infecção. A infecção foi realizada nas células com confluência de >80%, usando uma razão de 10 parasitas por célula VERO (MOI de 10:1) durante diferentes tempos de acordo com o experimento (6 horas ou *overnight*).

Para a contagem de células infectadas, células VERO plaqueadas em uma placa de 24 poços foram infectadas em uma razão de 10:1 durante 24 horas. Depois do período de infecção as células foram lavadas três vezes com 1× PBS para remover os parasitas que não infectaram as células, e novo meio RMPI suplementado. Três dias após a infecção, foi feito a coloração DAPI. Brevemente, as células foram fixadas utilizando 3% PFA + 0.5% de glyceraldeido por 20 minutos, lavados duas vezes com PBS 1× e corados com DAPI (1:1000) por 15 minutos, seguidos de duas lavagens com PBS 1 x. Foram tiradas 10 fotos de locais aleatórios do poço, utilizando o BioTek Lionheart Imager observando as fluorescências de DAPI e tdTomato. A contagem do número de células e número de células infectadas foi feita utilizando o software Image J. Para a contagem de tripomastigotas, em uma placa de 24 poços, células infectadas (MOI de 10:1) foram lavadas três vezes após o período de infecção com 1× PBS para remover as formas extracelulares e repor por meio de cultura RPMI suplementado com 10% FBS. Após 4 dias de infecção, a liberação de tripomastigotas foi analisada por contagem dos parasitas no sobrenadante, utilizando a câmara de Neubauer durante o período de 4 a 7 dias pós infecção.

4.7 EXPANSÃO E MICROSCOPIA CONFOCAL.

A expansão de células infectadas foi realizada seguindo o protocolo de Campbell & Graffenried, 2023. Brevemente, em uma lamínula células VERO infectadas após 4 dias (MOI de 30:1), foram fixadas utilizando 3% PFA + 0.5% de gliceraldeído por 20 minutos, lavados duas vezes com 1× PBS e colocada em uma solução monomérica para gelificação (19% Acrilato de Sódio, 10% Acrilamida, 0,10% N, N'-methylenbisacrylamida, 10% TEMED, 10% APS). O gel foi incubado por 1 hora a 37°C e então desgrudado da lamínula utilizando o tempão de digestão (200 mM SDS, 200 mM NaCl, 50 mM Tris) mais incubação por 90 minutes em 70°C. Após as incubações, o gel foi expandido em água MilliQ por 90 minutos e armazenado em galato de propil 0,2%.

O gel foi cortado em pequenos pedaços e corados utilizando os anticorpos Anti-β-tubulina e Anti-Mouse (A647). Brevemente, os pedaços de géis foram reduzidos com lavagens por 1× PBS, seguindo de permeabilização com 0,3% Triton X-100 por 15 minutos e bloqueio com 2% BSA-PBS por 20 minutos. Foi feita então a incubação *overnight* em temperatura ambiente com anticorpo primário Anti-β-Tubulina e incubação por 2 horas e 30 minutos em 37°C com o anticorpo secundário Anti-Mouse (A647). Após incubações, os géis foram lavados com 0.1% PBS-Tween e corados com DAPI (1:500) por 20 minutos. Após a coloração, os géis foram colocados em uma placa com fundo de vidro previamente tratada com Poly-D-Lysine por 1 hora. As imagens foram tiradas utilizando o microscópio confocal Zeiss LSM 710 (University of Georgia) e as fotos, variando de 11 a 15 μm, foram processadas com o software Zen 2011 (Zeiss) para obter máxima intensidade de projeções.

4.8 INFECÇÃO IN VIVO.

Camundongos deficientes em IFN-y (B6.129S7-Ifngtm1Ts/J) foram comprados do Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Os camundongos foram mantidos com água e comida a vontade, ciclo de luz 12/12 horas, e em condições livre de patógenos na *Animal Facility* na *University of Georgia*. Este estudo foi realizado na *University of Georgia* de acordo com as diretrizes do *Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals* e *Accreditation of Laboratory Animal Care*. O protocolo foi aprovado pelo *University of Georgia Institutional Animal Care and Use Committee*. *T. cruzi* tripomastigotas metaciclicos (MTs) da cepa Colombiana expressando tdTomato e Luciferase foram obtidos

através do protocolo de metaciclogênese, abordado anteriormente, e usados para a infecção por injeção na pata esquerda ou injeção intraperitoneal nos camundongos.

Foram analisadas a expressão de Luciferase e TdTomato dos parasitas durante os primeiros dias de infecção. Camundongos foram infectados com 1x10⁵ tripomastigotas metacíclicos da cepa *Tc*CTN4 +/+ ou 1x10⁶ da cepa *Tc*CTN4 -/-, em um volume total de 4 mL por pata. O sinal de fluorescência de tdTomato no sítio da infecção foi medido utilizando o Maestro 2 *in vivo system* (CRi, Woburn, MA), utilizando o filtro verde (COLLINS *et al.*, 2011). Para a detecção da bioluminescência, camundongos foram injetados com *D-luciferin* (150 mg/kg; PerkinElmer, Waltham, MA) e após 13 minutos, foram submetidos ao equipamento Maestro 2 *in vivo system* (CRi, Woburn, MA) para realizar as imagens, como descrito anteriormente (Canavaci *et al.*, 2010). Todos os procedimentos de infecção e detecção de sinal (TdTomato e Luciferase) foram feitos com os camundongos anestesiados utilizando 2,5% (vol/vol) de isuoflurano com oxigênio. A análise de dados foi feita utilizando o Living Image v4.3 software (Xenogen).

4.9 FENOTIPAGEM CÉLULAS T.

O sangue foi coletado da ponta do rabo de ratos infectados 10 e 15 dias pós infecção. O sangue colocado em Solução *Alsevier's* (2,05% glicose, 0.8% citrato de sódio, 0.055% ácido cítrico, e 0,42% cloreto de sódio) e lavados utilizando Solução PAB (1% BSA e 0.05% azida de sódio). Eritrócitos foram lisados em meio hipotônico utilizando o Tampão de Lise ACK (150 mM de Cloreto de Amónio, 10 mM de bicarbonato de potássio, 0,1 mM de EDTA). Os anticorpos utilizados foram anti-CD8 FITC (1:200), anti-CD11b PeCy5 (1:200), anti-CD4 PeCy5 e anti-B220 PeCy5 (1:200) (BioLegend). Tetrâmero TSKB20 (ANYKFTLV) marcado com BV421 Anti-Tskb20 BV421 foi sintetizado pela *Tetramer Core Facility* (Emory University, Atlanta, GA). As células foram coradas a 4°C por pelo menos 30 minutos e lavados com Solução PAB. Análises foram feitas por citometria de fluxo utilizando o Quanteon (Agilent) e a análise de dados foi feita utilizando o software FlowJo v10.8.1 (Tree Star, Ashland, OR).

4.10 PARASITEMIA.

Carga parasitaria no musculo esquelético dos camundongos infectados foram determinados utilizando PCR quantitativa em tempo real (qPCR), como descrito por Rosenberg *et al.*, (2016). Brevemente, o tecido muscular esquelético de ambas as patas foi extraído dos camundongos após eutanásia aos 16 dias pós infecção. Os tecidos foram picados em pequenos pedaços e incubados a 55°C com Tampão de lise SDS-ProteinaseK. O DNA foi extraído duas vezes utilizando Fenol clorofórmio-Álcool isoamílico (25:24:1, por volume), precipitados com etanol 100%, e ressuspendido em água nuclease free. PCRs foram feitas utilizando o iQ SYBR green Supermix (Bio-Rad, Irvine, CA) e primers específicos para *T. cruzi* ou DNA genômico de camundongos foram analisados utilizando iCycler (Bio-Rad). O cálculo foi realizado através da razão da quantidade de DNA satélite de *T. cruzi* com a quantidade de DNA de tumor de necrose fator alfa (TNF-α) presente em cada amostra.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISES in silico DE CENTRINA 4

A fim de identificar as sequências de Centrina 4 no genoma de *T. cruzi* para fazer as análises funcionais, foram realizadas buscas *in silico* no banco de dados *TriTryp*DB (https://tritrypdb.org/tritrypdb/app/) utilizando a sequência aminoacidica de Centrina 4 que foi feita knockout em *Leishmania donovani* (Selvapandiyan *et al.*, 2004) como *query*. Foram obtidas um total de 15 sequências para Centrina 4 em sete diferentes cepas de *T. cruzi* (**Anexo 2**), todas apresentando uma identidade de 100% entre si. As sequências de Centrina 4 de *T. cruzi* apresentam entre 91,95% e 97,99% de identidade entre as sequências de Centrina 4 de *T. brucei*, *T. congolense*, *T. equiperdum*, *T. evansi*, *T. grayi*, *T. melophagium*, *T. rangeli*, *T. theileri* e *T. vivax* (**Figura 10**). Quando comparado com as sequências de Centrina 4 de diferentes Leishmania, podemos observar uma identidade de 89,93% a 91,95% (**Figura 10**).

Por não possui a quarta isoforma, não realizemos a comparação com as sequências de centrinas de humanos. Sendo assim, a sequência que escolhemos para realizar o a interrupção foi a sequência de *T. cruzi* da cepa de referência Dm28c 2017 (Gene ID: BCY84_06997), a qual possui 100% identidade entre as outras cepas de T. cruzi e possui uma identidade de 91,95% com a sequência que foi utilizada no knockout em *L. major* por Selvapandiyan *et al.* (2004). Os resultados da representação gráfica (na forma de um cladograma) do alinhamento das sequências aminoacidica de Centrinas 4, mostraram que as sequências de Tripanossomas ficam presente em um clado diferentes dos do grupo das *Leishmanias*, demonstrando novamente a diversidade das sequências entre os diferentes gêneros.

Identidade com TcCentrina4 (%) L. tropica 91.95 L. turanica 91.95 L. mexicana 91.95 L. major 91.95 65 L. gerbilli 91.95 L. donovani 91.95 L. arabica 91.95 L. aethiopica 91.95 L. amazonensis 91.95 L. tarentolae 91.28 L. infantum 91 95 L. enriettii 89.93 L. orientalis 89.93 L. ghana 89.93 L. namibia 89.93 92.62 T. brucei T. equiperdum 92.62 T. evansi 91.95 T. congolense 93.29 T. cruzi 100.00 T. rangeli 97.99 T vivax 93.96 95.30

FIGURA 10 – FILOGENIA E IDENTIDADE ENTRE AS SEQUÊNCIAS DE CENTRINA 4 DE DIFERENTES TRIPANOSOMATIDEOS

LEGENDA: O cladograma foi construído utilizando o método de Neighbor-Joining (1.000 réplicas) no programa MEGA 11. Os valores de suporte de ramo estão evidenciados nos nós, e a porcentagem de identidade entre as sequencias de Centrina 4 de diferentes espécies de tripanosomatideos, quando comparadas com a sequência de Centrina 4 de *T. cruzi* DM28c, estão evidenciados ao lado dos ramos.

M. musculus

0.10

T. melophagium

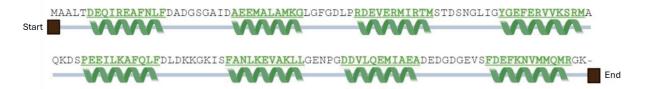
T. theileri

94.63

94.63

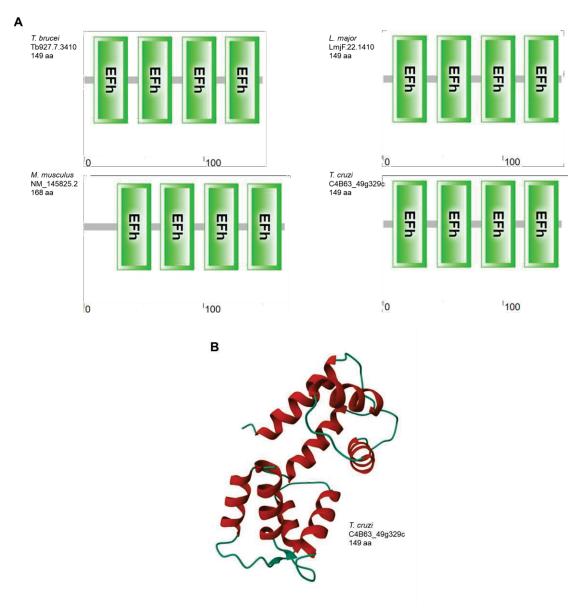
A *Tc*CTN4 apresenta oito alfa-hélices, sendo cada dupla presente em um domínio EF-Hand, totalizando quatro domínios na proteína (**Figura 11**), como representado por Veeraraghavan *et al.*, 2002. Apesar das diferenças aminoacidicas entre as sequências, sua estrutura terciária se mantem entre os diferentes gêneros de tripanossomatídeos e um representante mamífero. A representação gráfica dos domínios da Centrina 4 e sua ilustração da proteína 3D de *T. cruzi* está ilustrado na **FIGURA 12**.

FIGURA 11 - ESTRUTURA PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA DA PROTEINA CENTRINA 4



Legenda: Sequência aminoacidica de *Tc*CTN4 (GENE ID: C4B63_49g329c) e a localização das oito alfa-hélices em sua estrutura secundária.

FIGURA 12- REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS DOMINIOS E ESTRUTURA TERCIÁRIA DA CENTRINA 4



Legenda: Em (A), representação gráfica dos domínios das diferentes Centrinas 4 de *T. cruzi* (GENE ID: C4B63_49g329c), *T. brucei* (GENE ID: Tb927.7.3410), *L. major* (GENE ID: LmjF.22.1410) e *M. musculus* (NM_145825.2), utilizando o software SMART. Em (B), estrutura terciária de *Tc*CTN4 obtida utilizando o software Phyre2 a partir do alinhamento com a sequência de CTN4 de *T. brucei* (PDB: 5ZOR; Shan *et al.*, 2018).

5.2 EDIÇÃO GENÔMICA DE TCCTN4

Uma vez identificado o ortólogo de Centrina 4 em *T. cruzi*, foram preditos RNAs guias para edição de *TcC*entrina 4 (*TcCTN4*). Para realizar a interrupção dos genes decidimos editar formas epimastigotas de *T. cruzi* Colombiana expressando tdTomato e Luciferase por nucleofecção do o complexo de sgRNA e SaCas9 na presença de DNA doador (donor ssDNA) para reparo da quebra dupla do genoma. O oligo nucleotídeo utilizado como donor ssDNA possui 76 pb, sendo 30 pb de braço de homologia para a região montante do sítio de clivagem, seguido de 3 códons de parada em diferentes frames de leitura, sequência do sítio de restrição para a enzima *Bam*HI e 35 pb de braço de homologia na região jusante do sítio de clivagem (**Figura 13A**).

Após a confirmação da edição da população, os parasitas foram clonados por diluição limitante em uma placa de 96 poços. Após aproximadamente 2 meses, os parasitas que cresceram nos poços foram transferidos a uma placa de 24 poços e checados para RFLP para identificar os parasitas que tiveram os genes modificados em ambos os alelos, para isso foi utilizado a técnica de PCR seguido de digestão com *Bam*HI (**Figura 13B e 13C**). Para o gene da Centrina 4 (**Figura 13B**), o sgRNA está localizado entre os nucleotídeos 170 a 190, o gene possui 450 pares de base. Os primers utilizados amplificam o gene inteiro, e após a digestão com a enzima *Bam*HI, os parasitas editados irão resultar em duas bandas com 266 e 200 pb, enquanto os não editados não irá ocorrer a digestão. Para o gene da PFR2 (**Figura 13C**), o sgRNA se localiza nos nucleotídeos 125 ao 145, o gene possui 1809 pares de base. Os primers utilizados geram um produto de PCR de 790 pb, que após a sua digestão, os parasitas editados irão resultar em duas bandas com 634 e 156 pb, enquanto os não editados não irá ocorrer a digestão.

Gene

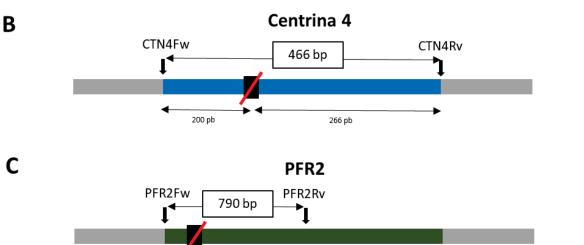
Região Upstream

Região Downstream

ssDNA

TAGATAGATAGGGATCC
30 pb

Figura 13 – LOCALIZAÇÃO DOS PRIMERS E SGRNA PARA EDIÇÃO

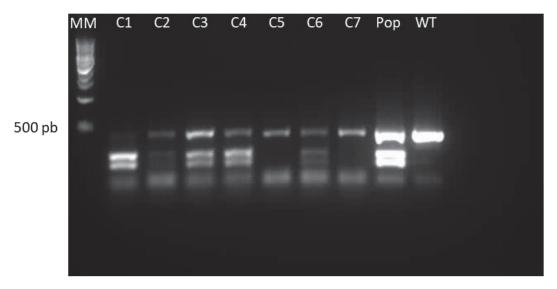


Legenda: (A) Representação gráfica do *donor ssDNA* utilizado na estratégia de edição genômica por CRISPR/Cas9. O braço de homologia para a região montante está representado em vermelho escuro, o braço de homologia para a região jusante está representado em azul. No esquema está representada o ssDNA utilizado nesse trabalho, contendo a sequência de 3 stop códons e o sítio de restrição da enzima *Bam*HI. Localização do RNA guia e primers de PCR para diagnóstico, utilizados para criação das cepas com knockout para os genes (B) Centrina 4 e (C) PFR2.

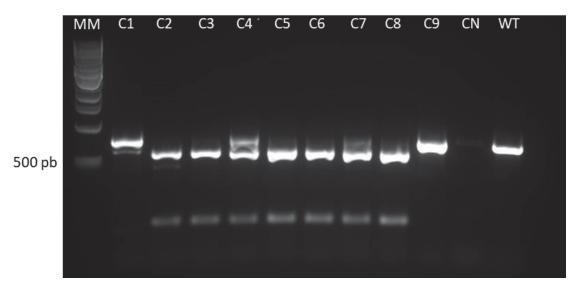
Para a edição de ambos os genes, os parasitas foram transferidos da placa de 96 poços para uma placa de 24 poços. Foi realizado a extração de DNA utilizando o protocolo de extração com filtro de papel, seguido de PCR e digestão com a enzima de restrição *Bam*HI. Foram identificados vários clones com a edição nos genes Centrina 4 (**Figura 14A**) e PFR2 (**Figura 14B**), resultando em clones com a interrupção em ambos os alelos (*Tc*CTN4 -/-, *Tc*PFR2 -/-), assim como outros com apenas um alelo interrompido (*Tc*CTN4 +/-, *Tc*PFR2 +/-). Os clones obtidos de cada genótipo foram congelados e armazenados.

FIGURA 14 - GENOTIPAGEM DE CLONES OBTIDOS APÓS PROTOCOLO DE EDIÇÃO GENÔMICA.

Α



В

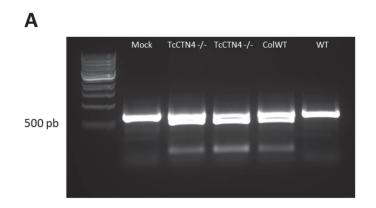


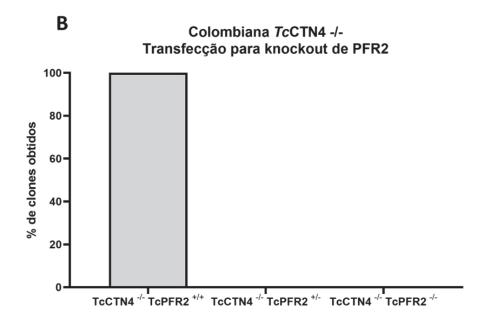
Legenda: Em **(A)** o gel do produto de PCR, digerido com *Bam*HI para alguns clones de *T. cruzi* Colombiana expressando Luciferase e tdTomato selecionados com a edição para o *knockout* de *Tc*CTN4, obtendo clones *Tc*CTN4 +/+ (C5 e C7), *Tc*CTN4 +/- (C2, C3, C4 e C6) e *Tc*CTN4 -/- (C1). Para a edição do gene PFR2 **(B)** foi obtido clones *Tc*CTN4 +/+ (C1 e C9), *Tc*CTN4 +/- (C4), *Tc*PFR2 -/- (C2, C3, C5, C6, C7 e C8). MM: Marcador Molecular de 1 kb; C1-C9: Clone 1 ao Clone 9; Pop: População após transfecção; WT:genótipo selgagem para *Tc*CTN4 (Sem edição de *Tc*CTN4); CN: Controle Negativo (Sem DNA molde).

5.3 EDIÇÃO GENÔMICA DE *Tc*CTN4 E *Tc*PFR2 NO MESMO PARASITA.

Para obter clones *knockout* de ambos os genes *Tc*CTN4 e *Tc*PFR2, o clone *Tc*CTN4 -/- foi transfectado com o complexo RNP e *donor* ssDNA para a edição do gene PFR2. A edição da população foi confirmada por PCR e digestão (**Figura 15A**) e foram clonados por diluição limitante. Após diagnóstico, foi encontrado apenas clones interrupção em ambos os alelos de Centrina 4, porém não foi encontrado nenhum clone com nocaute de PFR2 em um ou dois alelos (**Figura 15**).

FIGURA 15 - PORCENTAGEM DE CLONES OBTIDOS APÓS EDIÇÃO GENÔMICA DE TCCTN4 E TCPFR2

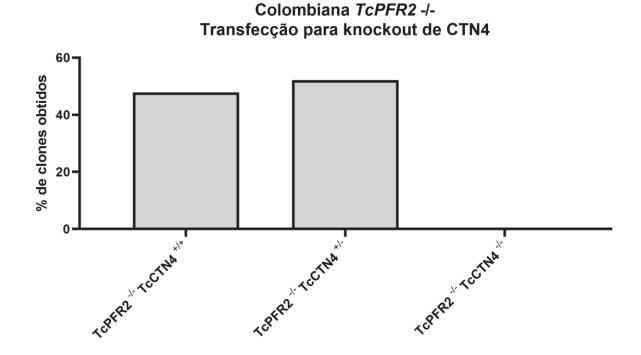




Legenda: Em (A), gel do produto de PCR de PFR2 digerido com BamHI, da edição para o diagnóstico da edição *Tc*PFR2 em diferentes populações. Em (B), Porcentagem de clones obtidos por diluição limitante, após knockout de *Tc*PFR2 em *Tc*CTN4 -/-. MM: Marcador Molecular de 1 kb; Mock: população transfectada sem o ssDNA; *Tc*CTN4-/-: População com knockout de *Tc*CTN4; ColWT: *T. cruzi* Colombiana WT; CN: Controle Negativo (Sem DNA Template).

Em outra estratégia, também fizemos a transfecção do complexo RNP e donor ssDNA para a edição do gene *Tc*CTN4 no clone obtido de *Tc*PFR2 -/-. Após confirmação da edição por PCR e digestão, os parasitas foram clonados através de diluição limitante. Todos os clones obtidos na clonagem foram diagnosticados (**Figura 16**). Nós obtivemos 47,82% de clones que não apresentaram nenhuma edição para *Tc*CTN4, apenas *Tc*PFR2 -/-. Também foram obtidos 52,17% de clones que apresentaram edição em um alelo de *Tc*CTN4, juntamente com a edição de PFR2 KO (*Tc*PFR2 -/- *Tc*CTN4 +/-).

FIGURA 16 - PORCENTAGEM DE CLONES OBTIDOS APÓS EDIÇÃO DE *TC*CTN4 EM UM CLONE TCPFR2 -/-.

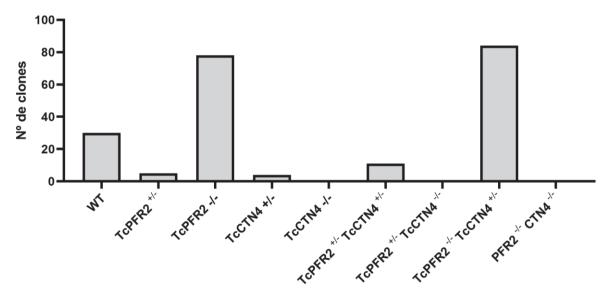


Legenda: Porcentagem de clones obtidos por diluição limitante, após knockout de *Tc*CTN4 em um clone de *Tc*PFR2 -/-.

Utilizando uma cepa selvagem (WT) de Colombiana, nós realizamos a transfecção do complexo RNP e *donor* ssDNA para a edição do gene *Tc*CTN4. Três dias após a primeira transfecção, a mesma população foi submetida a outra transfecção utilizando o complexo RNP e um doador de ssDNA para a edição do gene *Tc*PFR2. Após confirmação da população por PCR e digestão, a população foi clonada por diluição limitante e todos os clones obtidos foram diagnosticados

(**Figura 17**). Através da clonagem, de um total de 212 clones foram obtidos 30 clones sem nenhuma edição, 5 clones com a edição *Tc*PFR2 +/-, e 78 clones para *Tc*PFR2 -/-. No que diz respeito a edição de *Tc*CTN4, foram encontrados 4 clones *Tc*CTN4 +/-, enquanto nenhum parasita *Tc*CTN4-/- foi encontrado. Para modificações em ambos os genes no mesmo parasitas, foram encontrados 11 clones TcPFR2 +/- *Tc*CTN4 +/-, além de 84 clones *Tc*PFR -/- *Tc*CTN4 +/-. Não foram identificados clones com edição de ambos os alelos de ambos os genes. Para os próximos experimentos nos focamos em utilizar a cepa *Tc*CTN4 -/- expressando tdTomato e Luciferase, confirmando mais uma vez a sua edição através do sequenciamento de *Tc*CTN4 por Sanger (**Figura 18**).

FIGURA 17 - FREQUÊNCIA DE CLONES OBTIDOS APÓS TENTATIVA DE EDIÇÃO GENÔMICA DE CEPA SELVAGEM DE COLOMBIANA PARA OS GENES TCCTN4 E TCPFR2 EM CONJUNTO.



Legenda: Número de clones obtidos por diluição limitante de Colombiana WT transfectada com os componentes para a interrupção de *Tc*CTN4, seguido da transfecção dos componentes para a interrupção de *Tc*PFR2.

FIGURA 18 – SEQUENCIAMENTO DE CLONE TCCTN4 -/-.

TcCTN4+/+	ATGGCGTTGGCAATGAAGGGGCTTGGGTTTGGTGACTTGCCACGCGACGAGGTGGAGCGT	60
TcCTN4-/-	ATGGCGTTGGCAATGAAGGGGCTTGGGTTTGGTGACTTGCCACGCGACGAGGTGGAGCGT	60

TcCTN4+/+	ATGATCCGCACAATGTCCACGGACTCCAACGGCCTGATTGGGTA	104
TcCTN4-/-	ATGATCCGCACAATGTCCACGGACTCCAACGGCCTGATTGGGTTAGATAGA	120

TcCTN4+/+	TGGTGAGTTTGAGCGTGTGGTGAAGTCGCGCATGGCGCAGAAGGACTCACCGGAGGAGAT	164
TcCTN4-/-	TGGTGAGTTTGAGCGTGTGGTGAAGTCGCGCATGGCGCAGAAAGACTCACCGGAGGACAT	180

TcCTN4+/+	ACTGAAGGCGTTTCAGCTGTTTGACCTCGACAAGAAGGGAAAGATATCGTTTGCCAACCT	224
TcCTN4-/-	CTGGAAGGCGTTTCAGCTGTTTGACCTCTACCAGATGGGAACCATATCGTTTGCCAACCT	240

Legenda: Alinhamento da sequência obtida através do sequenciamento do gene *Tc*CTN4 no parasita Colombiana WT e *Tc*CTN4 -/-, obtidos através do método de Sanger. Alinhamento foi feito utilizando o software ClustalOmega. Em vermelho sublinhado, destacando a localização da edição.

5.4 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE PARASITOS EDITADOS

Para a curva de crescimento, epimastigotas expressando tdTomato e Luciferase TcCTN4 +/+, TcCTN4 +/- e TcCTN4 -/- em fase logarítmica de crescimento foram cultivadas em uma placa de 96 poços, com uma concentração inicial de $1x10^6$, e contadas diariamente utilizando câmara de Neubauer (**Figura 19**). A taxa de crescimento permaneceu similar entre TcCTN4 +/+ e TcCTN4 -/-. No entanto, ao sétimo dia, o clone editado apresentou uma significativa redução na taxa de crescimento em comparação com TcCTN4 +/+. O cloneTcCTN4 +/- exibiu uma drástica redução em sua taxa de crescimento quando comparada com as outras cepas.

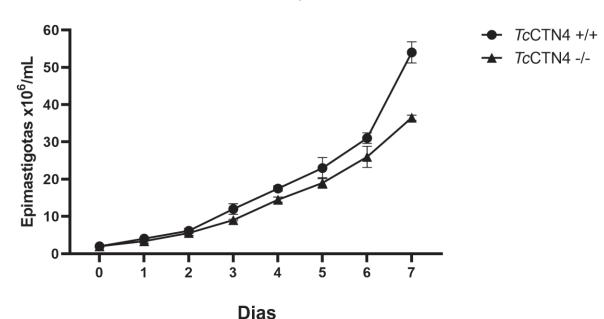


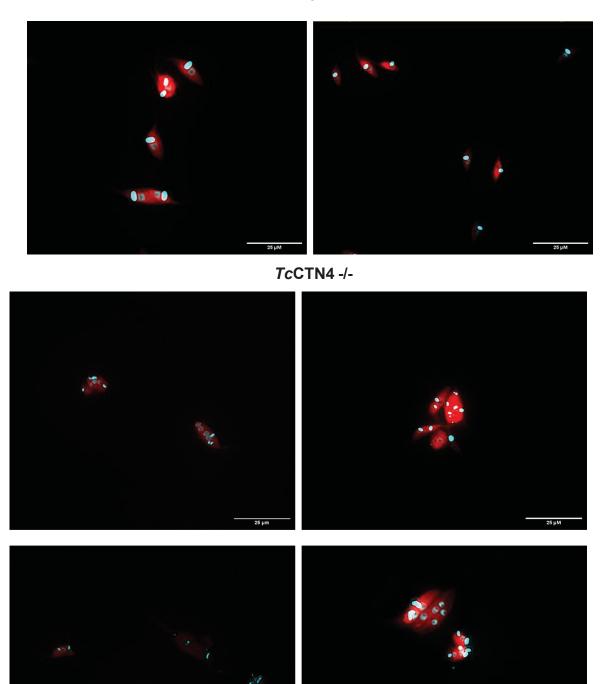
FIGURA 19 – CURVA DE CRESCIMENTO COMPARATIVA ENTRE A CEPA SELVAGEM E OS CLONES EDITADOS, MOSTRANDO A VARIAÇÃO NA DENSIDADE CELULAR AO LONGO DO TEMPO.

Legenda: Curva de crescimento *Tc*CTN4 +/+ e *Tc*CTN4 -/-. A curva de crescimento foi realizada durante 7 dias e os parasitas foram contados todos os dias utilizando a câmara de Neubauer (Três replicatas biológicas).

Parasitas *Tc*CTN4 +/+ e *Tc*CTN4 -/- na forma epimastigotas, foram corados com DAPI e feito a analisados por microscopia de fluorescência para tdTomato e DAPI. Parasitas com a expressão interrompida apresentaram morfologia alterada com tamanhos e formas diferentes dos encontrados em *Tc*CTN4 +/+, podendo ter morfologia mais arredondadas ou achatadas (**Figura 20**). Além disso, também apresentaram células multiflageladas e multinucleadas.

FIGURA 20 – ANÁLISE MORFOLÓGICA DE EPIMASTIGOTAS EDITADOS POR MICROSCOPIA CONFOCAL.

TcCTN4 +/+



Legenda: Epimastigotas foram fixados com 4% Paraformaldeído e fixados em uma lamínula tratado com Poly-D-lisina. Os parasitas foram corados utilizando DAPI (1:1000 concentração de dapi prédiluição). Fotos foram tiradas com microscopia de fluorescência para DAPI e tdTomato. Aumento de 40X.

Com o objetivo de avaliar o impacto da interrupção de Centrina 4 na diferenciação *in vitro* de epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos, parasitas *Tc*CTN4 +/+ e *Tc*CTN4 -/- foram submetidos à indução de diferenciação *in vitro* por um período de 5 dias (**Figura 21**). Este processo foi conduzido utilizando o meio TAU3AAG, conforme descrito anteriormente (CONTRERAS *et al.*, 1985). Ao final de 5 dias, os parasitas *Tc*CTN4 +/+ exibiram uma proporção de 23,74% de metacíclicos, enquanto os parasitas *Tc*CTN4 -/- mostraram uma reduzida taxa de 17,52% de formas metacíclicos. Além de apresentarem proporção de metacíclicos reduzida, em todas as replicatas realizadas com *Tc*CTN4 -/- foi possível observar uma grande proporção de debris (parasitas mortos).

FIGURA 21 – A EDIÇÃO DE TCCTN4 INTERFERE COM A EFICIÊNCIA DE DIFERENCIAÇÃO DE FORMAS EPIMASTIGOTAS EM FORMAS TRIPOMASTIGOTAS METACÍCLICAS.

Legendas: Epimastigotas de *Tc*CTN4 +/+ e *Tc*CTN4 -/- na fase estacionaria foram incubados com meio de TAU, e os metacíclicos foram contados do sobrenadante, diariamente durante 5 dias utilizando câmara de Neubauer.

5.5 A INTERRUPÇÃO DE TCCTN4 INTERFERE COMA VIRULÊNCIA DE T. cruzi.

Devido ao insucesso na obtenção de formas Tripomastigotas derivadas cultura de células (TCTs), os ensaios de infecção foram realizados com células VERO sendo incubadas *overnight* com tripomastigotas metacíclicos de *Tc*CTN4 +/+ ou *Tc*CTN4 -/-. Após o período de infecção, as células foram lavadas com PBS 1×, e no segundo dia pós infecção as células foram fixadas e coradas com DAPI, como descrito nos materiais e métodos. Foram capturadas imagens utilizando fluorescência tdTomato e DAPI em 10 locais aleatórios da placa em um aumento de 40X, e foi realizado a contagem do número total de células e do número de células infectadas. As células infectadas com o parasito *Tc*CTN4 +/+ tiveram uma taxa de infecção de 6,39% de células infectadas, enquanto os parasitas *Tc*CTN4 -/- apresentaram uma baixa taxa de infecção com 1,35%, no segundo dia pós infecção (**Figura 22**).

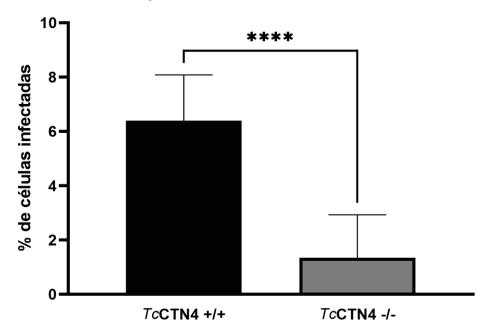


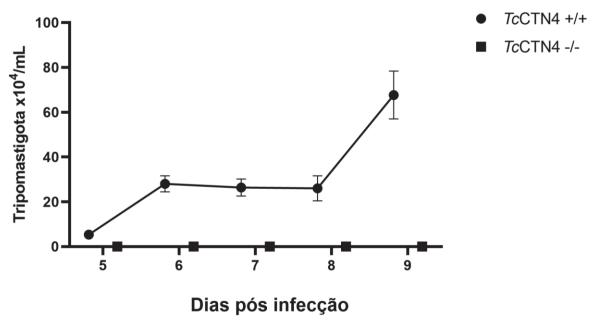
FIGURA 22 – TAXA DE INFECÇÃO IN VITRO DE CÉLULAS VERO POR PARASITOS TCCTN4 -/-.

Legenda: Porcentagem de células infectadas *in vitro*. Células VERO foram plaqueadas em meio de cultura RPMI e deixadas para aderir em uma placa de 6 poços *overnight*. Tripomastigotas metacíclicos foram adicionados no meio em um MOI de 10:1 e lavados após 24 horas. O número de células infectadas foi contado utilizando microscópio de fluorescência para a marcação de DAPI (1:1000) e TdTomato, 2 dias após a infecção.

Apesar dos parasitas *Tc*CTN4 -/- conseguirem invadir células VERO, eles não conseguiram completar o ciclo com a transformação de amastigota para

tripomastigotas (TCT), como mencionado anteriormente. Quatro dias após infecção, os tripomastigotas foram contados diariamente até o 9 dia pós infecção. Parasitas TcCTN +/+ liberaram 6,7x10⁵ TCT/mL após 9 dias de infecção. Entretando, não foram encontrados nenhum TCT presentes nas células infectadas com o parasito mutante TcCTN4 -/- (**Figura 23**). Foram realizadas várias tentativas utilizando células VERO normais ou irradiadas, infecções *overnight* com uma concentração elevada de parasitas por célula, 30 ou 50 parasitas por célula, monitorando as células diariamente por pelo menos 20 dias. Nenhuma presença de TCT foi detectada durante esse período, levando à conclusão de que os amastigotas de TcCTN4 -/- não se transformam em tripomastigotas.

FIGURA 23 – A INTERRUPÇÃO DE TCCTN4 LEVA AO COMPROMETIMENTO DA LIBERAÇÃO DE TCTS EM ENSAIOS DE INFECÇÃO $IN\ VITRO$.



Legenda: Células VERO foram plaqueadas em meio de cultura RPMI e deixadas para aderir em uma placa de 6 poços overnight. Tripomastigotas metacíclicos foram adicionados no meio em um MOI de 10:1 e deixados infectar *overnight* e então lavados com PBS 1 ×. Durante o 5 ao 9 dia pós infecção, o número de Tripomastigotas (TCTs) liberados no sobrenadante de células infectadas foi contado utilizando câmara de Neubauer.

Células VERO infectadas com *Tc*CTN4 +/+ ou *Tc*CTN4 -/-, em uma proporção de 10:1, foram fotografadas diariamente após 3 dpi, utilizando o microscópio de fluorescênciatdTomato, e o número de amastigotas presentes em células infectadas determinado. Por aumentar muito o número de amastigota por célula em células infectadas com *Tc*CTN4 +/+, a contagem foi realizada apenas até o dia 5 (**Figura**

24). Durante a infecção com *Tc*CTN4 +/+, a contagem média de amastigotas por célula foi de 5,58 no terceiro dia, aumentando para 16,22 no quarto dia e alcançando 67,28 no quinto dia. Em contraste, nas células infectadas com *Tc*CTN4 -/-, a média de amastigotas por célula foi de 1,36 no terceiro dia, elevando-se para 2,2 no quarto dia e atingindo 3,74 no quinto dia, demonstrando uma grande redução na taxa de multiplicação.

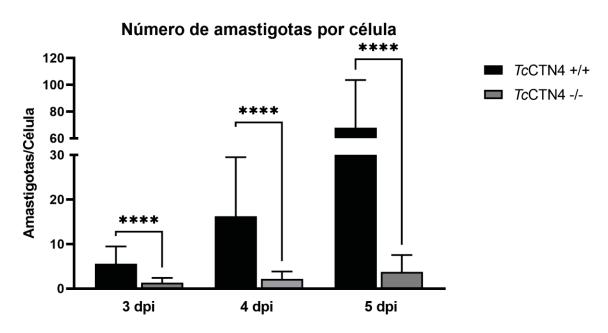


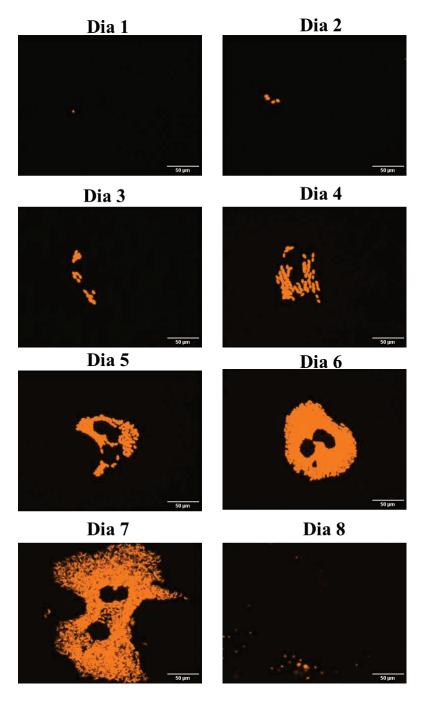
FIGURA 24 – NÚMERO DE AMASTIGOTA POR CÉLULA EM ENSAIO DE INFECÇÃO IN VITRO.

Legenda: Células VERO foram plaqueadas em meio de cultura RPMI e deixadas para aderir em uma placa de 6 poços *overnight*. Tripomastigotas metacíclicos foram adicionados no meio em um MOI de 10:1 para infecção *overnight* seguido de lavagem com PBS 1 ×. Entre o 3 e 5 dpi, as placas foram fotografadas em locais aleatórias utilizando o microscópio de fluorescência para TdTomato, e o número de amastigotas por célula foi contado.

Células VERO irradiadas infectadas com metacíclicos de *Tc*CTN4 +/+ ou *Tc*CTN4 -/- foram fotografadas diariamente utilizando o Microscópio automático digital LionHeart. Todas as imagens foram tiradas da mesma coordenada da placa para garantir obter imagens da mesma célula infectadas com o objetivo de visualizar a replicação das amastigotas e o destino da célula infectada. Podemos observar que a célula infectada com *Tc*CTN4 +/+ (**Figura 25**) tem uma alta taxa de multiplicação de amastigotas após 4 dias, e em 7 dias um grande número de tripomastigotas TCTs e a ruptura da célula no dia 8. Como esperado, as células infectadas com *Tc*CTN4 -/- apresentaram uma taxa de multiplicação de amastigotas reduzida

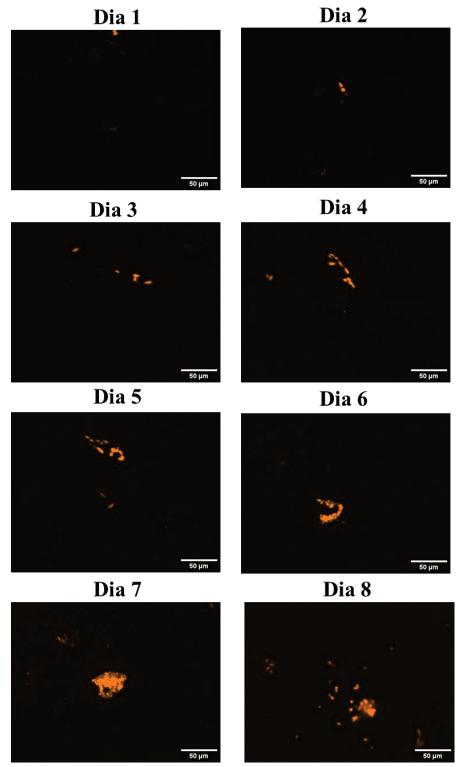
(**Figura 26**). Várias células foram observadas nesse experimento, porém as células infectadas que foram encontradas, a maioria delas não houve replicação na fase intracelular.

FIGURA 25 – MULTIPLICAÇÃO DE FORMAS AMASTIGOTA SELVAGENS EM UMA MESMA CÉLULA – TCCTN4 +/+



Legenda: Células VERO infectada com metacíclicos de *Tc*CTN4 +/+ *overnight*, a mesma célula foi fotografada diariamente durante oito dias utilizando o microscópio automático LionHeart para TdTomato em 40X.

FIGURA 26 – A INTERRUPÇÃO DE TCCTN4 COMPROMETE A MULTIPLICAÇÃO DE FORMAS INTRACELULARES.



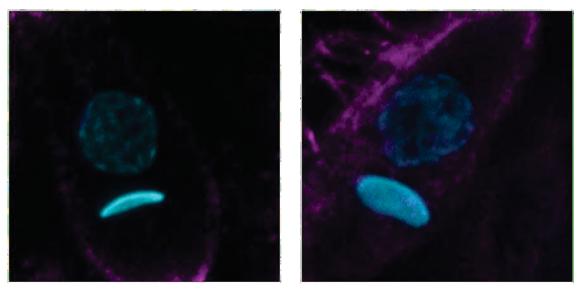
Legenda: Células VERO infectada com metacíclicos de *Tc*CTN4 -/- *overnight*, a mesma célula foi fotografada diariamente durante oito dias utilizando o microscópio automático LionHeart para tdTomato em 40X.

5.6 ANÁLISE MORFOLÓGICA DE FORMAS INTRACELULARES DE TCCTN4 -/-.

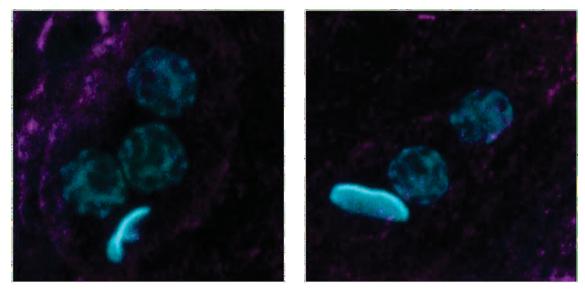
Células VERO infectadas por metacíclicos de *Tc*CTN4 +/+ ou *Tc*CTN4 -/- foram fixadas e utilizadas no protocolo de expansão, como descrito nos materiais e métodos. O gel obtido com a expansão foi cortado em pequenas partes e incubados com anti-β-Tubulina (1:500) e DAPI (1:1000) para visualização da morfologia de formas intracelulares. Os pedaços corados de gel foram colocados em uma placa de petri com fundo de vidro e visualizado através de microscopia confocal. Amastigotas de *Tc*CTN4 -/-, encontradas dentro da mesma célula infectada, exibiram morfologias distintas, incluindo a presença de um número significativamente maior de núcleos e cinetoplastos em uma mesma amastigota, em comparação com as amastigotas do tipo *Tc*CTN4 +/+ (**Figura 27**). Outra observação que pudemos fazer é apresentarem uma morfologia celular distinta, tendo uma forma mais alongada ao invés de circular, como nas amastigotas *Tc*CTN4 +/+.

FIGURA 27 - MICROSCOPIA CONFOCAL DE AMASTIGOTAS EM CÉLULAS VERO INFECTADAS

*Tc*CTN4 +/+



TcCTN4 -/-

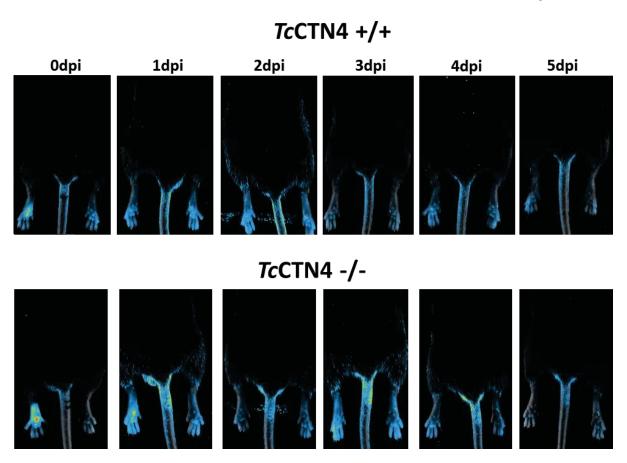


Legenda: Células VERO foram plaqueadas em meio de cultura RPMI e deixadas para aderir em uma placa de 6 poços *overnight*. Tripomastigotas metacíclicos foram adicionados no meio em um MOI de 50:1. Os parasitas foram lavados após 24 horas de infecção. Após 4 dpi as células infectadas foram processadas com o protocolo de expansão, coradas com DAPI (1:1000) e o anticorpo Anti-β-Tubulina (1:500). As imagens foram feitas utilizando o microscópio confocal.

5.7 A EDIÇÃO DE *TC*CTN4 CAUSA UMA ATENUAÇÃO DRÁSTICA DA VIRULÊNCIA EM ENSAIOS DE INFECÇÃO *in vivo*.

Para avaliar a infectividade do clone editado *in vivo*, camundongos IFN-y KO foram infectados com os clones *Tc*CTN4 +/+ ou *Tc*CTN4 -/- na pata esquerda, seguindo o protocolo descrito em materiais e métodos. Logo após a infecção e durante os 5 primeiros dias de infecção, foi medida a fluorescência de tdTomato na pata infectada para detecção dos parasitos (**Figura 28**). Devido a redução do sinal de tdTomato com o avançar da infecção e alta taxa de auto-fluorescência causado por sujeira e pelos do animal, não foi possível realizar a detecção dos parasitos.

FIGURA 28 - ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE TDTOMATO NO SÍTIO DE INFECÇÃO

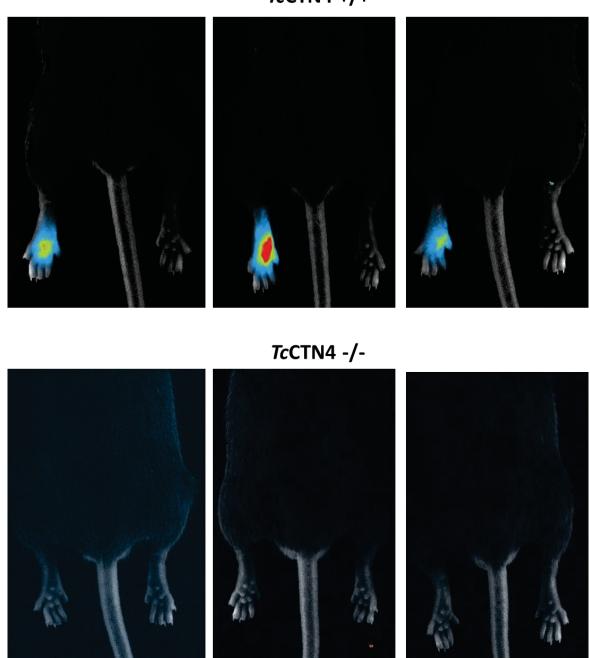


Legenda: Camundongos IFN-y KO foram infectados na pata esquerda com diferentes concentrações de tripomastigotas metaciclicos de *Tc*CTN4 +/+ ou *Tc*CTN4 -/-. Os parasitas expressando tdTomato no sitio de infecção foram analisados utilizando o equipamento Maestro 2 usando os filtros para verde.

Sete dias após a infecção dos camundongos IFN-y KO, estes foram anestesiados e a Luciferina foi administrada para avaliar o nível de parasitemia no local da infecção. Observou-se fluorescência nos camundongos infectados por *Tc*CTN4 +/+, enquanto aqueles infectados com a cepa *Tc*CTN4 -/- não apresentaram bioluminescência no local da infecção (**Figura 29**).

FIGURA 29 - BIOLUMINESCÊNCIA EM CAMUNDONGOS INFECTADOS.

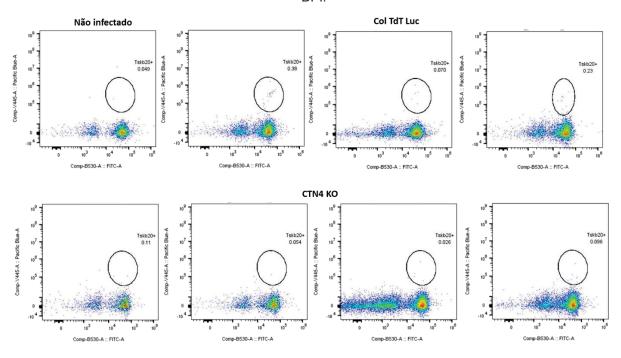
*Tc*CTN4 +/+



Legenda: Camundongos IFN-y KO foram infectados na pata esquerda com diferentes concentrações de tripomastigotas metacíclicos tdTomato/Luc positivos de *Tc*CTN4 +/+ ou *Tc*CTN4 -/-. Os camundongos foram anestesiados e receberam uma aplicação de luciferase intraperitoneal e a bioluminescência foi analisada por Maestro 2 *in vivo system*.

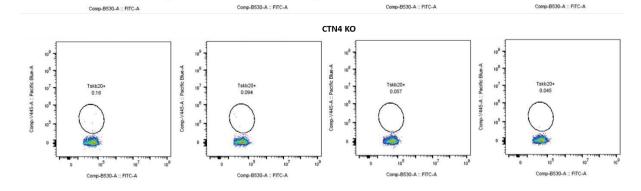
Em 10 (**Figura 30**), 15 (**Figura 31**) e 60 (**Figura 32**) dias pós-infecção, realizou-se a coleta de sangue dos camundongos por meio da cauda. O sangue foi processado para isolar linfócitos, e procedeu-se à imuno marcação de monócitos, macrófagos, células CD4+ e CD8+, além de marcar o epítopo Tskb20, específico para *T. cruzi*, com o objetivo de avaliar a presença de uma resposta imune específica para o *T. cruzi*. No décimo dia, observou-se que o número de células CD8 positivas para Tskb20 era extremamente baixo ou nulo no grupo infectado com *Tc*CTN4+/+. Entretanto, no décimo quinto dia, notou-se que os grupos infectados com *Tc*CTN4+/+ apresentaram uma variação de 3,59% a 4,54% de células T positivas para Tskb20. Em contraste, os camundongos infectados com *Tc*CTN4-/-não mostraram células positivas para Tskb20, além de um background não específico em todos os dias analisados.

FIGURA 30 – ANÁLISE DAS CÉLULAS T CD8 TSKB20+ POR CITOMETRIA DE FLUXO COM 10 DPI.



Legenda: Os anticorpos utilizados foram anti-CD8 FITC (1:200), anti-CD11b PeCy5 (1:200), anti-CD4 PeCy5 e anti-B220 PeCy5 (1:200). Tetrâmero TSKB20/Kb marcado com BV421 foi utilizado para observar as células T CD8+ especificas para T. cruzi de camundongos não infectado, infectados com *Tc*CTN4 +/+ ou *Tc*CTN4 -/-.

FIGURA 31 – ANÁLISE DAS CÉLULAS T CD8 TSKB20+ POR CITOMETRIA DE FLUXO COM 15 DPI



Legenda: Os anticorpos utilizados foram anti-CD8 FITC (1:200), anti-CD11b PeCy5 (1:200), anti-CD4 PeCy5 e anti-B220 PeCy5 (1:200). Tetrâmero TSKB20/Kb marcado com BV421 foi utilizado para observar as células T CD8+ especificas para *T. cruzi* de camundongos não infectado, infectados com *Tc*CTN4 +/+ ou *Tc*CTN4 -/-.

10

Comp-B530-A :: FITC-A

Não infectado

Col TdT Luc

Vega guidad: Vega vivo de la compression de la color de la col

FIGURA 32 – ANÁLISE DAS CÉLULAS T CD8 TSKB20+ POR CITOMETRIA DE FLUXO DE CAMUNDONGOS COM 60 DPI.

Legenda: Os anticorpos utilizados foram anti-CD8 FITC (1:200), anti-CD11b PeCy5 (1:200), anti-CD4 PeCy5 e anti-B220 PeCy5 (1:200). Tetrâmero TSKB20/Kb marcado com BV421 foi utilizado para observar as células T CD8+ especificas para *T. cruzi* de camundongos não infectado, infectados com *Tc*CTN4 +/+ ou *Tc*CTN4 -/-.

Comp-B530-A :: FITC-A

107

Comp-B530-A :: FITC-A

Os camundongos infectados com *Tc*CTN4 -/- não apresentaram sintomas visíveis, enquanto os camundongos *Tc*CTN4 +/+ exibiram um processo inflamatório no local da infecção no 16º dia pós-infecção (**Figura 33**). Após a eutanásia, realizouse a remoção do músculo esquelético, e foi conduzida a PCR para analisar a parasitemia dos animais. Observou-se que metade dos animais infectados com *Tc*CTN4 -/- testaram positivo no 16º dia pós-infecção, indicando que, embora a interrupção reduza drasticamente a infectividade da cepa, pode ser que o clone editado consiga realizar a infecção *in vivo* e sobreviver por alguns dias. Os camundongos crônicos infectados com *Tc*CTN4 -/- também foram submetidos à eutanásia, e a PCR do músculo esquelético revelou que nenhum dos camundongos era positivo para o DNA de *T. cruzi* (**Figura 34**).

FIGURA 33 – FOTOS DO LOCAL DE INFECÇÃO EM 16 DPI.

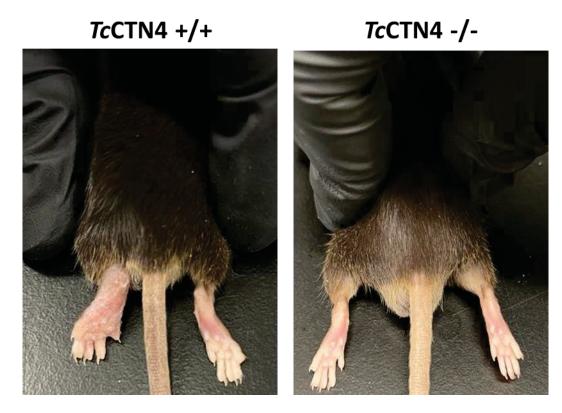
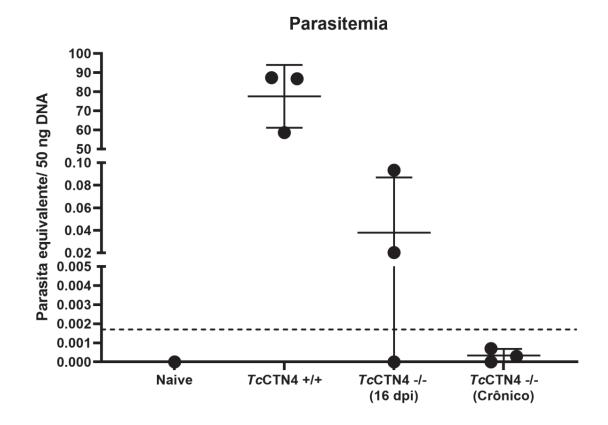


FIGURA 34 - PARASITEMIA EM CAMUNDONGOS IFN-Y KO INFECTADOS.



6 DISCUSSÃO

A utilização de estudos com nocaute de genes é fundamental para a compreensão aprofundada das funções específicas de determinados genes. A técnica de CRISPR/Cas9 tem sido empregada com sucesso na geração de mutantes e na realização de nocaute e marcações de genes (Sánchez-Valdéz et al., 2014). Embora a técnica de clonagem para estabelecer uma linhagem celular estável com as modificações genéticas desejadas, comumente aplicada em experimentos com *T. cruzi*, seja um processo demorado, podendo demandar meses para a obtenção da linhagem, ela revela-se eficaz para gerar diversas linhagens celulares com distintas alterações genéticas. Neste estudo, evidenciamos os impactos da interrupção da expressão de Centrina 4 no fenótipo e na funcionalidade da cepa Colombiana de *T. cruzi*, conhecida por sua alta infectividade.

Para a edição do gene nós buscamos evitar a utilização de genes de resistência, e procuramos fazer a adição de três sequencias de stop códon em diferentes frames no começo do gene, o que impede a formação da proteína completa. Foi escolhido realizar a edição dessa maneira para evitar marcas de seleção no parasita, o que impossibilitaria a utilização desse parasita em experimentos futuros, como a realização de testes clínicos para a utilização em uma vacina com parasita atenuada.

Com a finalidade de desenvolver uma cepa atenuada, buscamos realizar a interrupção dos genes Centrina 4 e PFR2, que poderiam reduzir a infectividade de *T. cruzi*. Neste trabalho caracterizamos fenotipicamente linhagens de *T. cruzi* mutantes para o knockout do gene Centrina 4, e a possibilidade da geração de um mutante com o knockout para múltiplos genes no mesmo parasita. Este é o primeiro trabalho caracterizando o knockout de Centrina 4 em *T. cruzi*, knockout bem caracterizado em diversas espécies de *Leishmania*.

A interrupção de PFR2 e CTN4 foi considerado um sucesso nos parasitas, conseguindo linhagens com interrupção para um dos genes. A inativação das proteínas paraflagelares 1 e 2 já foi previamente realizada em formas próciclicas de *T. brucei* (Bastin *et al.*, 1998; La count *et al.*, 2000), *L. braziliensis* (Santrich *et al.*, 1997) e *T. cruzi* (Lander *et al.*, 2015). Em todos esses casos, observou-se que os mutantes eram viáveis, embora apresentassem a perda do flagelo. O knockout de Centrina 4 foi conduzido em diferentes espécies de Leishmania, que apresentaram

alterações em promastigotas, gerando células multinucleadas de tamanho maior, resultando na perda de virulência tanto *in vitro* quanto *in vivo*. (Selvapandiyan *et al.*, 2009; Volpedo *et al.*, 2022; Zarei *et al.*, 2023). A interrupção de ambos os genes no mesmo parasita, apesar de diversos testes realizados, não foi possível. Apesar de não afetar sua viabilidade com o knockout de apenas um dos genes, o fenótipo observado em ambos: desprendimento do flagelo e a perturbação do ciclo celular, acabam se tornando letais para o parasita.

A técnica padrão para o knockout de genes é utilizando fragmentos recombinantes de ssDNA com regiões flanqueadoras 3' e 5' do gene-alvo com uma sequência de um gene de resistência de antibiótico entre essa região, geralmente higromicina ou neomicina. Posteriormente, a clonagem da população transfectada é realizada através da adição de antibióticos no meio (Sánchez-Valdéz et al., 2014). No entanto, esses parasitas editados não podem ser utilizados como vacinas, pois contém genes heterólogos de resistência a antibióticos, que não devem ser distribuídos para qualquer finalidade além da pesquisa, nem liberados no meio ambiente (Alcolea et al, 2019). Vale ressaltar que o nosso parasita editado foi desenvolvido para não conter nenhuma marca de seleção ou gene de resistência, tornando-o uma opção mais segura para futuras aplicações terapêuticas e vacinais, sem os riscos associados à disseminação de genes de resistência a antibióticos.

Epimastigotas de *Tc*CTN4 -/- apresentaram um fenótipo semelhante ao encontrado no knockout do mesmo gene em *Leishmania*. Eles apresentam falha na duplicação do corpo basal e citocinese, resultando em células com formato anormal, tamanho agigantado com múltiplos núcleos e múltiplos cinetoplastos (Selvapandiyan et al.,2014). Em *Leishmania* esse fenótipo foi observado apenas em amastigotas e não promastigotas, enquanto em *T. cruzi* podemos observar esses fenótipos em epimastigotas e amastigotas. Parasitas *Tc*CTN4 -/- possuem seu crescimento de epimastigotas *in vitro* reduzido. Formas promastigotas de *L. donovani* com knockout para Centrina não tiveram a sua replicação afetada, porém quando passadas para o meio de cultura para amastigotas axênicas, apresentaram um aumento no número celular em 24 h, durante o período de transformação de promastigota para amastigota, porém logo em seguida não houve mais replicação (Selvapandiyan *et al.*,2014), demonstrando que apenas a forma amastigota de Leishmania é afetada pelo knockout, porém amastigotas também apresentaram morfologia diferenciada, com formas podendo ser redondas semelhantes a *Tc*CTN4 +/+, ou alongada, além

de apresentaram células multinucleadas. Acreditamos que os parasitas que conseguem passar de epimastigotas até amastigotas, são os parasitas que conseguiram manter a parte nuclear intacta. Selvapandiyan *et al.*, 2004, sugerem que a duplicação nuclear na ausência de citocinese pode acionar o caminho de morte celular em protozoários, dados observados em *L. donovani* por seu grupo. O efeito da Centrina 4 na transformação de amastigota para tripomastigotas ainda é desconhecido.

Apesar das alterações morfológicas, as epimastigotas conseguem se transformar em tripomastigotas metacíclicos, capazes de infectar células *in vitro*, porém com um grau de replicação em amastigotas extremamente reduzido e sem liberação de TCT. Todos os experimentos de infecção, *in vitro* e *in vivo*, foram realizados com tripomastigotas metacíclicos, devido a esse fenótipo. Mesmo com todos esses dados da infecção, é crucial ter em mente que o crescimento em epimastigotas é afetado de maneira sutil. Essa característica possibilita o cultivo abundante desses parasitas, preparando o terreno para a utilização desses mutantes em futuros avanços no desenvolvimento de uma vacina. O knockout de Centrina 4 prejudica de maneira sútil seu crescimento *in vitro* na forma epimastigota, porém prejudicando de maneira mais drásticas durante a infecção em células VERO, e consequentemente durante a infecção *in vivo*. Essa deficiência e dificuldade de completar seu clico, sugere uma ausência de virulência do parasita. Assim, esses parasitas deficientes em *Tc*CTN4 podem ser considerados para testes como uma possível vacina contra a Doença de Chagas.

IFN-y é uma molécula extremamente importante para o controle da infecção com *T. cruzi*, tendo como um papel importante na ativação de macrófagos através da indução de mediadores anti-parasitárias, como óxido nítrico (Marinho *et al.*, 2007). Camundongos IFN-y KO infectados com *T. cruzi* possuem uma mortalidade de 100% em até 30 dias, porém a eutanásia é recomendada em três semanas devido ao camundongo apresentar sintomas muito elevados (Marinho *et al.*, 2007; Michailowsky *et al.*, 2001). Camundongos IFN-y KO infectados com parasitas *Tc*CTN4 -/- não apresentaram nenhuma mortalidade durante esse estudo.

Camundongos IFN-y KO não apresentaram nenhum indício de infecção, inflamação no local da infecção, quando infectados com *Tc*CTN4 -/-, além de ter a detecção de carga parasitária em 15 dpi ser bem reduzida comparada com a cepa não alterada, isso demonstra a natureza avirulenta dos parasitas mutantes. A

persistência do parasita no hospedeiro é um fator crucial para garantir a imunidade de uma vacinação, manutenção da memória imunológica e prevenção da doença (Uzona et al., 2001). A exposição continua ao antígeno é um reforço contínuo para manter a imunidade protetora contra desafios (Volpedo et al., 2022). Um dos grandes desafios para fornecer uma imunidade duradoura contra Doença de Chagas é a geração de uma cepa quer persista tempo o suficiente para garantir a proteção, antes da imunidade estéril ser estabelecida (Nylén et al., 2010).

A vacinação utilizando duas doses do parasita atenuado CL-14 expressando NY-ESO-1, para terapia contra câncer, é capazes de promover tanto a expansão das células T CD8+ específicas para NY-ESO e a produção de altos níveis de IFN-γ e IL-2 (Dos Santos *et al.*, 2015). No entanto, apesar dessa vacinação conseguir induzir uma células efetoras CD8 de memória, elas acabam retornando ao seus níveis basais na medida em que está ocorrendo a eliminação total dos parasitas (Dos Santos *et al.*, 2015). Para garantir uma proteção completa com a vacina, tem a necessidade da presença de células efetoras funcionais, o que pode ser obtido à medida que a infecção se torna crônica, o que aumenta a frequência de células CD8+ (Bixby & Tarleton, 2008).

Após 15 dias pós infecção, foi possível observar células T CD8+ positivas para Tskb20 apenas no grupo infectado com TcCTN4 +/+. Tskb20 (ANYKFTLV) é um epítopo da família das trans-sialidases que apresenta de 20 a 30% do total de células T CD8+ durante uma infecção (Rosenberg et al., 2010). Na fase inicial da invasão e replicação de T. cruzi células hospedeiras in vivo, ocorre um reconhecimento mínimo tanto pelas células hospedeiras infectadas quanto pelo sistema imunológico como um todo. Os monócitos/macrófagos, presentes tanto no local da infecção quanto recrutados conforme a infecção avança, são as células predominantes que abrigam *T. cruzi* nesses estágios iniciais, apresentando, contudo, poucos sinais de ativação (Rosenberg et al., 2010, Padilla et al., 2023). Acredita-se que por essa invasão inicial ser furtiva, e o reconhecimento iniciar-se após a primeira liberação de TCTs, a cepa TcCTN4 -/- acaba não sendo reconhecida pelas células de defesa, o que não há a formação de células T especificas para T. cruzi. Após algumas rodadas de replicação do parasita no local da infecção, os parasitas se movimentam para outros locais virgens para estabelecer uma infecção sistemática (Padilla et al., 2023). Com esse perfil de infecção, acreditamos que a cepa mutante *Tc*CTN4 -/- não é capaz de estabelecer

uma infecção sistemática, devido a dificuldade de completar o seu ciclo durante a fase no hospedeiro.

Todos os dados obtidos até o momento nos mostram que a interrupção de Centrina 4 reduziu drasticamente a infectividade da cepa Colombiana, sendo assim uma ótima opção para usar como uma vacina atenuada. Vale ressaltar que utilizar um parasita atenuado para uma vacina fornece uma ampla variedade de antígenos que possibilitam proteção cruzada contra diferentes cepas de T. cruzi. Muitas variáveis devem ser consideradas para a criação de uma vacina para a Doença de Chagas. A utilização de adjuvantes pode ser uma maneira de melhorar a efetividade da vacinação. Camundongos imunizados com TcTASV-C junto com o adjuvante U-Omp19 sozinho apresentam parasitemia significativamente menor do que vacinação com hidróxido de alumínio, saponina e/ou U-Omp19 e garantiu maior sobrevivência após um desafio letal com a cepa RA (TcVI) (Caeiro et al., 2018, Caeiro et al., 2020). A rota de infecção tem que ser levada em consideração para garantir uma entrega dos antígenos com sucesso. Um estudo comparando a via intraperitoneal versus oral de infecção com a cepa Y de *T. cruzi* indicou que a via intraperitoneal resulta em uma parasitemia mais alta, um número aumentado de macrófagos peritoneais, concentrações de óxido nítrico/IL-12 e focos inflamatórios cardíacos, porém sem diferenças na proliferação de células T CD4+ e CD8+ (Kuehn et al., 2014). A estratégia da vacinação com mais de uma dose também deve ser considerada, pois aumenta o sucesso da vacina (Vuola et al., 2005).

Neste estudo, apresentamos a cepa mutante com knockout de Centrina 4. Observamos que este knockout diminui drasticamente a infecção tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Para garantir que está cepa pode trazer a imunização para camundongos, é necessário que a vacinação seja adaptada em concentração da dose, número de doses, entrega do antígeno e a utilização de adjuvantes, para serem realizados testes em cachorros, assim podendo ser uma possível vacina para a proteção do vetor contra a Doença de Chagas.

7 PERSPECTIVAS

Com base nos resultados obtidos, podemos demonstrar que a criação de um clone de *Trypanosoma cruzi* editado para a interrupção do gene de Centrina 4, que não contém marcas de seleção ou genes de resistência foi um sucesso. Obter um clone sem marcas de resistência representa um avanço significativo no desenvolvimento de ferramentas mais seguras e potencialmente aplicáveis em contextos terapêuticos e vacinais. Os experimentos realizados confirmaram que o parasita editado mantém sua viabilidade e capacidade de replicação, apresentando características fenotípicas semelhantes ao obtidos com o knockout desse gene em *Leishmania* e *Trypanosoma brucei*. Além disso, os ensaios de crescimento indicaram que o clone editado pode ser utilizado em estudos mais aprofundados, uma vez que se mostrou estável e funcional em condições laboratoriais controladas.

No entanto, apesar dos resultados promissores, é crucial que sejam realizados diversos experimentos de imunologia para avaliar a eficácia e a segurança do uso deste clone editado como uma potencial vacina. Estudos adicionais são necessários para compreender como o sistema imunológico do hospedeiro responde ao parasita editado, bem como para determinar a capacidade do clone de induzir uma resposta imunológica protetora sem efeitos adversos. Além também de ser necessário a criação de parasitas *addback* para o gene Centrina 4, para complementar a validação dos efeitos da interrupção desse gene. Essas investigações futuras serão fundamentais para validar o potencial terapêutico deste clone e avançar no desenvolvimento de estratégias vacinais contra a doença de Chagas.

REFERÊNCIAS

ACEVEDO, Gonzalo R.; GIRARD, Magalí C.; GÓMEZ, Karina A. The Unsolved Jigsaw Puzzle of the Immune Response in Chagas Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1929, 2018.

ACOSTA RODRÍGUEZ, Eva V.; ARAUJO FURLAN, Cintia L.; FIOCCA VERNENGO, Facundo; *et al.* Understanding CD8+ T Cell Immunity to Trypanosoma cruzi and How to Improve It. **Trends in Parasitology**, v. 35, n. 11, p. 899–917, 2019.

ADASME, Melissa F.; BOLZ, Sarah Naomi; ADELMANN, Lauren; *et al.* Repositioned Drugs for Chagas Disease Unveiled via Structure-Based Drug Repositioning. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 22, p. 8809, 2020.

ADESSE, Daniel; EDUARDO MEIRELLES AZZAM; MARIA; *et al.* Amiodarone Inhibits *Trypanosoma cruzi* Infection and Promotes Cardiac Cell Recovery with Gap Junction and Cytoskeleton Reassembly *In Vitro*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 1, p. 203–210, 2011.

ALFREDO ROMERO DAVALAS. **Enfermedad de Chagas**. Santa Cruz, Bolivia: Fundación Cultural Ramón Dario, 1979.

ALVES, C. R.; ALBUQUERQUE-CUNHA, J. M.; MELLO, C. B.; *et al.* Trypanosoma cruzi: Attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of Rhodnius prolixus. **Experimental Parasitology**, v. 116, n. 1, p. 44–52, 2007.

ANDREOLI, W.K.; TANIWAKI, N.N.; MORTARA, R.A. Survival of Trypanosoma cruzi metacyclic trypomastigotes within Coxiella burnetii vacuoles: differentiation and replication within an acidic milieu. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 1, p. 172–182, 2006.

ANNANG, F.; PÉREZ-MORENO, G.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, R.; *et al.* High-Throughput Screening Platform for Natural Product–Based Drug Discovery Against 3 Neglected Tropical Diseases: Human African Trypanosomiasis, Leishmaniasis, and Chagas Disease. **SLAS Discovery**, v. 20, n. 1, p. 82–91, 2015.

ARAUJO, Adriano; CUNHA, Bruna; LUIZ, José; *et al.* CD8+ -T-Cell-Dependent Control of Trypanosoma Cruzi Infection in a Highly Susceptible Mouse Strain after Immunization with Recombinant Proteins Based on Amastigote Surface Protein 2. **Infect Immun**, v. 73, n. 9, p. 6017–6025, 2005.

BARON, A T; SALISBURY, J L. Identification and localization of a novel, cytoskeletal, centrosome-associated protein in PtK2 cells. **Journal of Cell Biology**, v. 107, n. 6, p. 2669–2678, 1988.

BARON, A.T.; SUMAN, V.J.; NEMETH, E.; *et al.* The pericentriolar lattice of PtK2 cells exhibits temperature and calcium-modulated behavior. **Journal of Cell Science**, v. 107, n. 11, p. 2993–3003, 1994.

BARON, Andre T.; GREENWOOD, Tammy M.; SALISBURY, Jeffrey L. Localization of the centrin-related 165,000-Mr protein of PtK2 cells during the cell cycle. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v. 18, n. 1, p. 1–14, 1991.

BARRETO-DE-ALBUQUERQUE, Juliana; SILVA-DOS-SANTOS, Danielle; PÉREZ, Ana Rosa; *et al.* Trypanosoma cruzi Infection through the Oral Route Promotes a Severe Infection in Mice: New Disease Form from an Old Infection? **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 6, p. e0003849, 2015.

BASOMBRÍO, Miguel A.; GÓMEZ, Laura; PADILLA, Angel M.; *et al.* TARGETED DELETION OF THE*GP72*GENE DECREASES THE INFECTIVITY OF TRYPANOSOMA CRUZI FOR MICE AND INSECT VECTORS. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 3, p. 489–493, 2002.

BASTIN, P.; ELLIS, K.; KOHL, L.; *et al.* Flagellum ontogeny in trypanosomes studied via an inherited and regulated RNA interference system. **Journal of Cell Science**, v. 113, n. 18, p. 3321–3328, 2000.

BERHE, Hayelom; SRIDHAR, Mahesh Kumar Cinthakunta; MULATE ZERIHUN; *et al.* The Potential Use of Peptides in the Fight against Chagas Disease and Leishmaniasis. **Pharmaceutics**, v. 16, n. 2, p. 227–227, 2024.

BERN, Caryn; MESSENGER, Louisa A.; WHITMAN, Jeffrey D.; *et al.* Chagas Disease in the United States: a Public Health Approach. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 1, 2019.

BERNATCHEZ, Jean; CHEN, Emily; HULL, Mitchell V; *et al.* High-Throughput Screening of the ReFRAME Library Identifies Potential Drug Repurposing Candidates for Trypanosoma cruzi. *Microorganisms*, v. 8, n. 4, p. 472–472, 2020.

BHATTACHARYA, Shibani; BUNICK, Christopher G.; CHAZIN, Walter J. Target selectivity in EF-hand calcium binding proteins. **Biochimica et Biophysica Acta** (BBA) - Molecular Cell Research, v. 1742, n. 1-3, p. 69–79, 2004.

CALDAS, Ivo S.; SANTOS, Elda G.; NOVAES, Rômulo D. An evaluation of benznidazole as a Chagas disease therapeutic. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 20, n. 15, p. 1797–1807, 2019.

CAMARGO, E. P. GROWTH AND DIFFERENTIATION IN TRYPANOSOMA CRUZI. I. ORIGIN OF METACYCLIC TRYPANOSOMES IN LIQUID MEDIA. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo**, v. 6, p. 93–100, 1964.

CAMPOS-ESTRADA, Carolina; EDURNE URARTE; DENEGRI, Marisol; *et al.* Effect of statins on inflammation and cardiac function in patients with chronic Chagas disease: A protocol for pathophysiological studies in a multicenter, placebocontrolled, proof-of-concept phase II trial. **PloS one**, v. 18, n. 1, p. e0280335–e0280335, 2023.

CARDOSO, Mariana S.; REIS-CUNHA, João Luís; BARTHOLOMEU, Daniella C. Evasion of the Immune Response by Trypanosoma cruzi during Acute Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 6, 2016.

CAROLINA LETICIA BELLERA; DARIO EMMANUEL BALCAZAR; VANRELL, Maria; *et al.* Computer-guided drug repurposing: Identification of trypanocidal activity of clofazimine, benidipine and saquinavir. **European journal of medicinal chemistry**, v. 93, p. 338–348, 2015.

CARTER, Yvonne L.; JULIANO, Jonathan J.; MONTGOMERY, Susan P.; *et al.* Acute Chagas Disease in a Returning Traveler. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 6, p. 1038–1040, 2012.

CAZORLA, Silvia I; BECKER, Pablo D; FRANK, Fernanda M; *et al.* Oral Vaccination with *Salmonella enterica* as a Cruzipain-DNA Delivery System Confers Protective Immunity against *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 1, p. 324–333, 2008.

CHEN, Li; MADURA, Kiran. Centrin/Cdc31 Is a Novel Regulator of Protein Degradation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 28, n. 5, p. 1829–1840, 2008. COOPER, R; DE JESUS, AR; CROSS, GA. Deletion of an immunodominant Trypanosoma cruzi surface glycoprotein disrupts flagellum-cell adhesion. **Journal of Cell Biology**, v. 122, n. 1, p. 149–156, 1993.

CORREA, Isabela Teresa Santos; DA COSTA-SILVA, Thais Alves; TEMPONE, Andre Gustavo. Bioenergetics impairment of Trypanosoma cruzi by the antihypertensive manidipine: A drug repurposing strategy. **Acta Tropica**, v. 214, p. 105768, 2021.

COVARRUBIAS, Charles; CORTEZ, Mauro; FERREIRA, Daniele; *et al.* Interaction with host factors exacerbates Trypanosoma cruzi cell invasion capacity upon oral infection. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 14, p. 1609–1616, 2007.

CYNTHIA VANESA RIVERO; MARTINEZ, Santiago; NOVICK, Paul; *et al.* Repurposing Carvedilol as a Novel Inhibitor of the Trypanosoma cruzi Autophagy Flux That Affects Parasite Replication and Survival. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 2021.

DE FREITAS, Luca S F Nesic; SILVA, Cristiane França da; INTAGLIATA, Sebastiano; *et al. In vitro* and *in silico* analysis of imatinib analogues as anti-*Trypanosoma cruzi* drug candidates. **Parasitology**, v. 150, n. 4, p. 359–364, 2023.

DE RYCKER, Manu; THOMAS, John; RILEY, Jennifer; *et al.* Identification of Trypanocidal Activity for Known Clinical Compounds Using a New Trypanosoma cruzi Hit-Discovery Screening Cascade. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. e0004584, 2016.

DE SOUZA, W.; SOUTO-PADRÓN, T. The paraxial structure of the flagellum of trypanosomatidae. **The Journal of Parasitology**, v. 66, n. 2, p. 229–236, 1980.

DUQUESNOY, Philippe; ESCUDIER, Estelle; VINCENSINI, Laetitia; *et al.* Loss-of-Function Mutations in the Human Ortholog of Chlamydomonas reinhardtii ODA7 Disrupt Dynein Arm Assembly and Cause Primary Ciliary Dyskinesia. **The American Journal of Human Genetics**, v. 85, n. 6, p. 890–896, 2009.

FERREIRA, Daiane Dias; MESQUITA, Juliana Tonini; DA COSTA SILVA, Thais Alves; *et al.* Efficacy of sertraline against Trypanosoma cruzi: an in vitro and in silico study. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 24, n. 1, 2018.

FERREIRA, Viviana P; MOLINA, Mario J; VALCK, Carolina; *et al.* Role of calreticulin from parasites in its interaction with vertebrate hosts. **Mol Immunol**, v. 40, n. 17, p. 1279–1291, 2004.

FISCHER, Tamás; RODRÍGUEZ-NAVARRO, Susana; PEREIRA, Gislene; *et al.* Yeast centrin Cdc31 is linked to the nuclear mRNA export machinery. **Nature Cell Biology**, v. 6, n. 9, p. 840–848, 2004.

FRACCAROLI, Laura; RUIZ, Martínez; VIRGINIA GABRIELA PERDOMO; *et al.* Broadening the spectrum of ivermectin: Its effect on Trypanosoma cruzi and related trypanosomatids. v. 12, 2022.

FUGE, HARALD. Electron Microscopic Studies on the Intra-flagellar Structures of Trypanosomes*. **The Journal of Protozoology**, v. 16, n. 3, p. 460–466, 1969.

GADELHA, C.; WICKSTEAD, B.; MCKEAN, P. G.; *et al.* Basal body and flagellum mutants reveal a rotational constraint of the central pair microtubules in the axonemes of trypanosomes. **Journal of Cell Science**, v. 119, n. 12, p. 2405–2413, 2006.

GARCIA, Eloi S.; RATCLIFFE, Norman A.; WHITTEN, Miranda M.; *et al.* Exploring the role of insect host factors in the dynamics of Trypanosoma cruzi–Rhodnius prolixus interactions. **Journal of Insect Physiology**, v. 53, n. 1, p. 11–21, 2007.

GARG, N.; TARLETON, R. L. Genetic Immunization Elicits Antigen-Specific Protective Immune Responses and Decreases Disease Severity in Trypanosoma cruzi Infection. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 10, p. 5547–5555, 2002.

GAVET, Olivier; ALVAREZ, Chantale; GASPAR, Patricia; *et al.* Centrin4p, a Novel Mammalian Centrin Specifically Expressed in Ciliated Cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 14, n. 5, p. 1818–1834, 2003.

GIDDINGS, O. K.; EICKHOFF, C. S.; SULLIVAN, N. L.; *et al.* Intranasal Vaccinations with the trans-Sialidase Antigen plus CpG Adjuvant Induce Mucosal Immunity Protective against Conjunctival Trypanosoma cruzi Challenges. *Infection and Immunity*, v. 78, n. 3, p. 1333–1338, 2010.

GIESSL, Andreas; PULVERMÜLLER, Alexander; TROJAN, Philipp; *et al.* Differential Expression and Interaction with the Visual G-protein Transducin of Centrin Isoforms

in Mammalian Photoreceptor Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 49, p. 51472–51481, 2004.

GRAEFE, Sebastian E.B; JACOBS, Thomas; GAWORSKI, Iris; *et al.* Interleukin-12 but not interleukin-18 is required for immunity to Trypanosoma cruzi in mice. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 10, p. 833–839, 2003.

GUIÑAZÚ, Natalia; PELLEGRINI, Andrea; CARRERA-SILVA, Eugenio Antonio; *et al.* Immunisation with a major Trypanosoma cruzi antigen promotes pro-inflammatory cytokines, nitric oxide production and increases TLR2 expression. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 11, p. 1243–1254, 2007.

GULIN, Julián Ernesto Nicolás; BISIO, Margarita María Catalina; ROCCO, Daniela; *et al.* Miltefosine and Benznidazole Combination Improve Anti-Trypanosoma cruzi In Vitro and In Vivo Efficacy. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 855119, 2022.

HASHIMOTO, Kenji. Repurposing of CNS drugs to treat COVID-19 infection: targeting the sigma-1 receptor. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 271, n. 2, p. 249–258, 2021.

HE, C. Y.; WARREN, Graham; PYPAERT, Marc. Golgi Duplication in Trypanosoma brucei Requires Centrin2. **Science**, v. 310, n. 5751, p. 1196–1198, 2005.

HOFT, Daniel F.; EICKHOFF, Christopher S.; GIDDINGS, Olivia K.; *et al.* Trans-Sialidase Recombinant Protein Mixed with CpG Motif-Containing Oligodeoxynucleotide Induces Protective Mucosal and Systemic Trypanosoma cruzi Immunity Involving CD8+ CTL and B Cell-Mediated Cross-Priming. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 10, p. 6889–6900, 2007.

HÖHFELD, I.; OTTEN, J.; MELKONIAN, M. Contractile eukaryotic flagella: Centrin is involved. **Protoplasma**, v. 147, n. 1, p. 16–24, 1988. HU, Haitao; SHEEHAN, Jonathan H; CHAZIN, Walter J. The Mode of Action of Centrin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 49, p. 50895–50903, 2004.

HUANG, Bessie; A MENGERSEN; LEE, V D. Molecular cloning of cDNA for caltractin, a basal body-associated Ca2+-binding protein: homology in its protein sequence with calmodulin and the yeast CDC31 gene product. **Journal of Cell Biology**, v. 107, n. 1, p. 133–140, 1988.

HUNGER-GLASER, Isabel; SEEBECK, Thomas. Deletion of the genes for the paraflagellar rod protein PFR-A in Trypanosoma brucei is probably lethal. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 90, n. 1, p. 347–351, 1997.

HUOTARI, Jatta; HELENIUS, Ari. Endosome maturation. **The EMBO Journal**, v. 30, n. 17, p. 3481–3500, 2011.

IRIBARNE, F.; PAULINO, M.; AGUILERA, S.; et al. Assaying phenothiazine derivatives as trypanothione reductase and glutathione reductase inhibitors by

theoretical docking and Molecular Dynamics studies. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 28, n. 4, p. 371–381, 2009.

JANSEN, Ana Maria; XAVIER, Samanta Cristina das Chagas; ROQUE, André Luiz R. Landmarks of the Knowledge and Trypanosoma cruzi Biology in the Wild Environment. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 10, 2020.

KAISER, Marcel; MÄSER, Pascal; TADOORI, Leela Pavan; *et al.* Antiprotozoal Activity Profiling of Approved Drugs: A Starting Point toward Drug Repositioning. **PLOS ONE**, v. 10, n. 8, p. e0135556, 2015.

KATSAROS, Chr; KREIMER, G; MELKONIAN, M. Localization of Tubulin and a Centrin-Homologue in Vegetative Cells and Developing Gametangia of Ectocarpus siliculosus (Dillw.) Lyngb. (Phaeophyceae, Ectocarpales). v. 104, n. 2, p. 87–92, 1991.

KHARE, Shilpi; ROACH, Steven L.; BARNES, S. Whitney; *et al.* Utilizing Chemical Genomics to Identify Cytochrome b as a Novel Drug Target for Chagas Disease. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 7, p. e1005058, 2015.

KLEIN, Ulf R.; NIGG, Erich A. SUMO-dependent regulation of centrin-2. **Journal of Cell Science**, v. 122, n. Pt 18, p. 3312–3321, 2009. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19706679/>. Acesso em: 29 jan. 2024.

Koichiro Tamura, Glen Stecher, and Sudhir Kumar (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. Molecular Biology and Evolution 38:3022-3027

LABRIOLA, C.; CAZZULO, J. J.; PARODI, A. J. Trypanosoma cruzi calreticulin is a lectin that binds monoglucosylated oligosaccharides but not protein moieties of glycoproteins. **Molecular Biology of the Cell**, v. 10, n. 5, p. 1381–1394, 1999.

LAURENCE VAN OVERTVELT; VANDERHEYDE, Nathalie; VERHASSELT, Valérie; *et al. Trypanosoma cruzi* Infects Human Dendritic Cells and Prevents Their Maturation: Inhibition of Cytokines, HLA-DR, And Costimulatory Molecules. **Infect Immun.**, v. 67, n. 8, p. 4033–4040, 1999.

LEGUIZAMÓN, María Susana; CAMPETELLA, Oscar Eduardo; ÖRN, Anders; *et al.* Reversion of culture-induced virulence-attenuation in Trypanosoma cruzi. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, n. 1, p. 161–162, 1993.

LUCAS NICOLÁS ALBERCA; MARIA LAURA SBARAGLINI; JUAN FRANCISCO MORALES; *et al.* Cascade Ligand- and Structure-Based Virtual Screening to Identify New Trypanocidal Compounds Inhibiting Putrescine Uptake. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 8, 2018.

LUTZ, Ward; LINGLE, Wilma L.; MCCORMICK, Daniel; *et al.* Phosphorylation of Centrin during the Cell Cycle and Its Role in Centriole Separation Preceding Centrosome Duplication. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 23, p. 20774–20780, 2001.

M. PAOLA ZAGO; BARRIO, Alejandra B; CARDOZO, Rubén M; *et al.* Impairment of Infectivity and Immunoprotective Effect of a *LYT1* Null Mutant of *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 1, p. 443–451, 2008.

MAGA, J.A.; SHERWIN, T.; FRANCIS, S.; *et al.* Genetic dissection of the Leishmania paraflagellar rod, a unique flagellar cytoskeleton structure. **Journal of Cell Science**, v. 112, n. 16, p. 2753–2763, 1999.

MALECKAR, J. R.; KIERSZENBAUM, F. Inhibition of mitogen-induced proliferation of mouse T and B lymphocytes by bloodstream forms of Trypanosoma cruzi. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 130, n. 2, p. 908–911, 1983.

MANNING-CELA, R.; CORTÉS, A.; GONZÁLEZ-REY, E.; *et al.* LYT1 protein is required for efficient in vitro infection by Trypanosoma cruzi. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 6, p. 3916–3923, 2001.

MARAÑÓN, C.; THOMAS, M. C.; PLANELLES, L.; *et al.* The immunization of A2/K(b) transgenic mice with the KMP11-HSP70 fusion protein induces CTL response against human cells expressing the T. cruzi KMP11 antigen: identification of A2-restricted epitopes. **Molecular Immunology**, v. 38, n. 4, p. 279–287, 2001.

MARTIN, Diana L; D. BRENT WEATHERLY; LAUCELLA, Susana A; *et al.* CD8+ T-Cell Responses to Trypanosoma cruzi Are Highly Focused on Strain-Variant trans-Sialidase Epitopes. **Med Hypotheses**, v. 2, n. 8, p. e77–e77, 2006.

MENEZES, Humberto. **PROTECTIVE EFFECT OF AN A VIRULENT (CULTIV ATEO) STRAIN. OF TRYP ANOSOMA CRUZ! AGAINST EXPERIMENTAL INFECTION IN MICE.** [s.l.: s.n.], 1968.

MEYN, Susan M.; SEDA, Christina; CAMPBELL, Muriel; *et al.* The biochemical effect of Ser167 phosphorylation on Chlamydomonas reinhardtii centrin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 342, n. 1, p. 342–348, 2006.

MIDDENDORP, Sandrine; KÜNTZIGERThomas M. A Role for Centrin 3 in Centrosome Reproduction. **The Journal of Cell Biology**, 2000.

MIGUEL, Danilo Ciccone; FERRAZ, Marcela Lencine; ALVES, Rosana de Oliveira; *et al.* The anticancer drug tamoxifen is active against Trypanosoma cruzi in vitro but ineffective in the treatment of the acute phase of Chagas disease in mice. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 7, p. 945–948, 2010.

MÓNICA CRISTINA GARCÍA; PONCE, Nicolás; SANMARCO, Liliana M; *et al.* Clomipramine and Benznidazole Act Synergistically and Ameliorate the Outcome of Experimental Chagas Disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 6, p. 3700–3708, 2016.

MORELL, María; THOMAS, M. Carmen; CABALLERO, Trinidad; *et al.* The genetic immunization with paraflagellar rod protein-2 fused to the HSP70 confers protection against late Trypanosoma cruzi infection. **Vaccine**, v. 24, n. 49-50, p. 7046–7055, 2006.

NIGG, Erich A. Centrosomes in Development and Disease. **Wiley eBooks**, p. 93–122, 2004.

ONYEKWELU, Kenechukwu C. Life Cycle of Trypanosoma cruzi in the Invertebrate and the Vertebrate Hosts. [s.l.]: IntechOpen, 2019.

ORTIZ, Mildred; ZULEIKA SANOGUET; HU, Haitao; *et al.* Dynamics of Hydrogen–Deuterium Exchange in *Chlamydomonas* Centrin. **Biochemistry**, v. 44, n. 7, p. 2409–2418, 2005.

ORTIZ-ORTIZ, L.; PARKS, D. E.; RODRIGUEZ, M.; *et al.* Polyclonal B lymphocyte activation during Trypanosoma cruzi infection. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 124, n. 1, p. 121–126, 1980.

PADILLA, Angel M.; WANG, Wei; AKAMA, Tsutomu; *et al.* Discovery of an orally active benzoxaborole prodrug effective in the treatment of Chagas disease in non-human primates. **Nature Microbiology**, v. 7, n. 10, p. 1536–1546, 2022.

PADILLA, Angel M; BUSTAMANTE, Juan M; TARLETON, Rick L. CD8+ T cells in Trypanosoma cruzi infection. **Current Opinion in Immunology**, v. 21, n. 4, p. 385–390, 2009.

PAIVA, Claudia N.; MEDEI, Emiliano; BOZZA, Marcelo T. ROS and Trypanosoma cruzi: Fuel to infection, poison to the heart. **PLOS Pathogens**, v. 14, n. 4, p. e1006928, 2018.

PATTERSON, Stephen; WYLLIE, Susan. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 6, p. 289–298, 2014.

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

PIACENZA, Lucía; IRIGOÍN, Florencia; ALVAREZ, María Noel; *et al.* Mitochondrial superoxide radicals mediate programmed cell death in Trypanosoma cruzi: cytoprotective action of mitochondrial iron superoxide dismutase overexpression. **Biochemical Journal**, v. 403, n. 2, p. 323–334, 2007.

PINGE-FILHO, Phileno. Can extracellular vesicles produced during infection by Trypanosoma cruzi function as damage-associated molecular patterns in the host? **Medical Hypotheses**, v. 155, p. 110667, 2021.

PONCINICarolina Verónica; SOTO, Catalina Dirney Alba; BATALLA, Estela; *et al.* Trypanosoma cruzi Induces Regulatory Dendritic Cells In Vitro. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 6, p. 2633–2641, 2008.

PORTER, Kevin R; RAVIPRAKASH, Kanakatte. DNA Vaccine Delivery and Improved Immunogenicity. **Current issues in molecular biology**, v. 22, p. 129–138, 2017.

PORTMAN, Neil; GULL, Keith. The paraflagellar rod of kinetoplastid parasites: From structure to components and function. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 2, p. 135–148, 2010.

RADU, Laura; DURUSSEL, Isabelle; LILIANE ASSAIRI; *et al. Scherffelia dubia* Centrin Exhibits a Specific Mechanism for Ca²⁺-Controlled Target Binding. **Biochemistry**, v. 49, n. 20, p. 4383–4394, 2010.

RAGONE, Paula G.; PÉREZ BRANDÁN, Cecilia; PADILLA, Angel M.; *et al.* Biological behavior of different Trypanosoma cruzi isolates circulating in an endemic area for Chagas disease in the Gran Chaco region of Argentina. **Acta Tropica**, v. 123, n. 3, p. 196–201, 2012.

RAMÍREZ, Galia; VALCK, Carolina; MOLINA, María C.; *et al.* Trypanosoma cruzi calreticulin: A novel virulence factor that binds complement C1 on the parasite surface and promotes infectivity. **Immunobiology**, v. 216, n. 1-2, p. 265–273, 2011.

RAMOS-VEGA, Abel; MONREAL-ESCALANTE, Elizabeth; ROSALES-MENDOZA, Sergio; *et al.* Trypanosoma cruzi Tc24 Antigen Expressed and Orally Delivered by Schizochytrium sp. Microalga is Immunogenic in Mice. **Molecular Biotechnology**, 2023.

REIGADA, Chantal; SAYÉ, Melisa; VALERA-VERA, Edward; *et al.* Repurposing of terconazole as an anti Trypanosoma cruzi agent. **Heliyon**, v. 5, n. 6, p. e01947–e01947, 2019.

ROSENBERG, Charles S.; MARTIN, Dianya L.; TARLETON, Rick L. CD8+ T cells specific for immunodominant trans-sialidase epitopes contribute to control of Trypanosoma cruzi infection but are not required for resistance. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 185, n. 1, p. 560–568, 2010.

SALAS-SARDUY, Emir; LANDABURU, Lionel Urán; KARPIAK, Joel; *et al.* Novel scaffolds for inhibition of Cruzipain identified from high-throughput screening of anti-kinetoplastid chemical boxes. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.

SALES JUNIOR, Policarpo Ademar; MOLINA, Israel; FONSECA MURTA, Silvane Maria; *et al.* Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease: A Review. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 5, p. 1289–1303, 2017.

SALISBURY, Jeffrey L; BARON, Andre T; COLING, Donald E; *et al.* Calcium-modulated contractile proteins associated with the eucaryotic centrosome. **Cytoskeleton**, 1986.

SALISBURY, Jeffrey L; SUINO, Kelly M; BUSBY, Robert; *et al.* Centrin-2 Is Required for Centriole Duplication in Mammalian Cells. **Current Biology**, v. 12, n. 15, p. 1287–1292, 2002.

SÁNCHEZ-VALDÉZ, Fernando J; PÉREZ BRANDÁN, Cecilia; FERREIRA, Arturo; *et al.* Gene-deleted live-attenuated *Trypanosoma cruzi* parasites as vaccines to protect against Chagas disease. **Expert Review of Vaccines**, v. 14, n. 5, p. 681–697, 2014.

SANTORI, Fabio R.; DORTA, Miriam L.; JULIANO, Luiz; *et al.* Identification of a domain of Trypanosoma cruzi metacyclic trypomastigote surface molecule gp82 required for attachment and invasion of mammalian cells. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 78, n. 1-2, p. 209–216, 1996.

SANTRICH, C; MOORE, L; SHERWIN, T; *et al.* A motility function for the paraflagellar rod of Leishmania parasites revealed by PFR-2 gene knockouts. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 90, n. 1, p. 95–109, 1997.

SAYÉ, Melisa; GAUNA, Lucrecia; VALERA-VERA, Edward; *et al.* Crystal violet structural analogues identified by in silico drug repositioning present anti-Trypanosoma cruzi activity through inhibition of proline transporter TcAAAP069. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 1, p. e0007481–e0007481, 2020.

SELVAPANDIYAN, Angamuthu; DUNCAN, Robert; DEBRABANT, Alain; *et al.* Expression of a Mutant Form of Leishmania donovaniCentrin Reduces the Growth of the Parasite. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 46, p. 43253–43261, 2001.

SHAN, Fangzhen; YANG, Xiao; DIWU, Yating; *et al.* Trypanosoma brucei centrin5 is enriched in the flagellum and interacts with other centrins in a calcium-dependent manner. **FEBS Open Bio**, v. 9, n. 8, p. 1421–1431, 2019.

SHAN, Fangzhen; YE, Kaiqin; ZHANG, Jiahai; *et al.* Solution structure of TbCentrin4 from Trypanosoma brucei and its interactions with Ca2+ and other centrins. **The Biochemical Journal**, v. 475, n. 23, p. 3763–3778, 2018.

SHEEHAN, Jonathan H.; BUNICK, Christopher G.; HU, Haitao; *et al.* Structure of the N-terminal Calcium Sensor Domain of Centrin Reveals the Biochemical Basis for Domain-specific Function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 5, p. 2876–2881, 2006.

SHI, Jie; FRANKLIN, Joseph B.; YELINEK, Jordan T.; *et al.* Centrin4 coordinates cell and nuclear division in T. brucei. **Journal of Cell Science**, v. 121, n. Pt 18, p. 3062–3070, 2008.

SIMÕES-SILVA, M R; DE, S; JORGE, Gabriel; *et al.* Drug repurposing strategy against Trypanosoma cruzi infection: In vitro and in vivo assessment of the activity of metronidazole in mono- and combined therapy. v. 145, p. 46–53, 2017.

SIMÕES-SILVA, M. R.; DE ARAÚJO, J. S.; PERES, R. B.; *et al.* Repurposing strategies for Chagas disease therapy: the effect of imatinib and derivatives against Trypanosoma cruzi. **Parasitology**, v. 146, n. 8, p. 1006–1012, 2019.

TAIBI, A.; PLUMAS-MARTY, B.; GUEVARA-ESPINOZA, A.; *et al.* Trypanosoma cruzi: immunity-induced in mice and rats by trypomastigote excretory-secretory

antigens and identification of a peptide sequence containing a T cell epitope with protective activity. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 151, n. 5, p. 2676–2689, 1993.

TEIXEIRA, Dirceu E.; BENCHIMOL, Marlene; CREPALDI, Paulo Henrique; *et al.* Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of Trypanosoma cruzi, the Causative Agent of Chagas Disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 8, 2012.

THOMPSON, James R; RYAN, Zachary C; SALISBURY, Jeffrey L; *et al.* The Structure of the Human Centrin 2-Xeroderma Pigmentosum Group C Protein Complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 27, p. 18746–18752, 2006.

TOURBEZ, Martine; FIRANESCU, Claudia; YANG, Ankun; *et al.* Calcium-dependent Self-assembly of Human Centrin 2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 46, p. 47672–47680, 2004.

TRINDADE, Joana D'Arc S.; FREIRE-DE-LIMA, Célio Geraldo; CÔRTE-REAL, Suzana; *et al.* Drug repurposing for Chagas disease: In vitro assessment of nimesulide against Trypanosoma cruzi and insights on its mechanisms of action. **PLOS ONE**, v. 16, n. 10, p. e0258292, 2021.

TYLER, K. M.; OLSON, C. L.; ENGMAN, D. M. The Life Cycle of Trypanosoma Cruzi. *In*: **World Class Parasites**. [s.l.: s.n.], 2003, p. 1–11.

TZELEPIS, Fanny; BRUNA; MARCUS; *et al.* Infection with *Trypanosoma cruzi* Restricts the Repertoire of Parasite-Specific CD8+ T Cells Leading to Immunodominance. **Journal of Immunology**, v. 180, n. 3, p. 1737–1748, 2008.

VEERARAGHAVAN, Sudha; FAGAN, Patricia A.; HU, Haitao; *et al.* Structural independence of the two EF-hand domains of caltractin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 32, p. 28564–28571, 2002.

VESPA, G N; CUNHA, F Q; SILVA, J S. Nitric oxide is involved in control of Trypanosoma cruzi-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 11, p. 5177–5182, 1994.

WEI, Ying; HU, Huiqing; LUN, Zhao-Rong; *et al.* Centrin3 in trypanosomes maintains the stability of a flagellar inner-arm dynein for cell motility. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, 2014.

WIECH, Hans; GEIER, Birgitta; PASCHKE, Thilo; *et al.* Characterization of Green Alga, Yeast, and Human Centrins. **J Biol Chem**, v. 271, n. 37, p. 22453–22461, 1996.

YOSHIDA, N.; ARAYA, J.E.; DASILVEIRA, J.F.; *et al.* Trypanosoma cruzi: Antibody Production and T Cell Response Induced by Stage-Specific Surface Glycoproteins Purified from Metacyclic Trypomastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 77, n. 4, p. 405–413, 1993.

YOSHIDA, Nobuko. Trypanosoma cruzi infection by oral route. **Parasitology International**, v. 57, n. 2, p. 105–109, 2008.

ZHANG, Yu; HE, Cynthia Y. Centrins in unicellular organisms: functional diversity and specialization. **Protoplasma**, v. 249, n. 3, p. 459–467, 2011.

APÊNDICE 1 – LISTA DE OLIGOS

Nome	Iniciador senso (5'-3')	Anotação			
Centrin4_Fw	ATGGCGGCTCTTACTGACGA	Utilizado para realizar o diagnóstico da edição do gene Centrina 4			
Centrin4_Rv	CTACTTTCCGCGCATCTGCA	Utilizado para realizar o diagnóstico da edição do gene Centrina 4			
PFR2_Fw	ATGAGCTACAAGGAGGCATC	Utilizado para realizar o diagnóstico da edição do gene PFR2			
PFR2_Rv	CTGTCCAATTATGCGGAACT	Utilizado para realizar o diagnóstico da edição do gene PFR2			
SaCas9 Reverse	AAAAAAATCTCGCCAACAAGTTGACGAGAT	Utilizado para fazer o template do sgRNA			
sgRNA_CTN4_170	GAGAATTGTAATACGACTCACTATAGGCCAACGGCCT	Primer para o sgRNA contendo a			
	GATTGGGTATGGTTTTAGTACTCTGGAAACAGAATCTA	sequencia T7 + sgRNA da CTN4 +			
	CTAAAACAAGGCAAAATGC	SaCas9Scaffold			
	GAGAATTGTAATACGACTCACTATAGGAGACCTCCTG	Primer para o sgRNA contendo a			
sgRNA_PFR2_125	CCTGTCGAACGGTTTTAGTACTCTGGAAACAGAATCTA	sequencia T7 + sgRNA da PFR2 +			
	CTAAAACAAGGCAAAATGC	SaCas9Scaffold			
	ACCTGAAGCTGAAGACCTCCTGCCTGTCGATAGATAG				
Donor_PFR2_125	ATAGGATCCACGAGGAGTTCATCCAGGACCTGCACGT	ssDNA donor contendo 3 STOP códons			
	GT	+ BamHI site para a edição de PFR2			
	TGTCCACGGACTCCAACGGCCTGATTGGGTTAGATAG				
Donor_CTN4_170	ATAGGATCCATGGTGAGTTTGAGCGTGTGGTGAAGTC	ssDNA donor contendo 3 STOP códons			
	GC	+ BamHI site para a edição de CTN4			

APÊNDICE 2 – SEQUÊNCIAS FILOGENIA

Espécie	Сера	Anotação	Código	Cromos	ssomo	Localização
Trypanosoma cruzi	CL Brener Esmeraldo-like	centrin-4, putative	<i>TcC</i> LB.508323.7	TcChr13-S	397518	397967
Trypanosoma cruzi	CL Brener Non- Esmeraldo-like	centrin-4, putative	<i>TcC</i> LB.511825.4	TcChr13-P	396565	397014
Trypanosoma cruzi	Dm28c 2018	centrin-4	C4B63_293g33c	PRFA01000293	24960	25409
Trypanosoma cruzi	strain CL	centrin	<i>TcC</i> L_ESM0911	MKQG01000287	14242	14691
Trypanosoma cruzi	strain G	centrin	TcG_08384	MKKV01000191	13900	14349
Trypanosoma cruzi	Sylvio X10/1	EF-hand domain pair	TcSYL_0200860	TcX10_chr44	166986	167433
Trypanosoma cruzi	TCC	centrin-4	C3747_92g368c	PRFC01000092	183973	184422
Trypanosoma equiperdum	Trypanosoma equiperdum	Centrin-4	TEOVI_0008335 00	CZPT02001001.1	17584	18033
Trypanosoma evansi	strain STIB 805	centrin, putative	TevSTIB805.7.35 80	STIB805_Chr07	882125	882574
Trypanosoma grayi	ANR4	centrin	DQ04_02811020	JMRU01000281	2913	3362
Trypanosoma melophagium	St. Kilda	EF-hand domain	LSM04_008520	JAJSEB01000000 8	88597	89046
Trypanosoma rangeli	SC58	centrin	TRSC58_03164	AUPL01003164	516	965
Trypanosoma theileri	isolate Edinburgh	centrin	TM35_00019251	NBCO01000019	418546	418995
Trypanosoma vivax	Y486	centrin-4, putative	TvY486_070328	TvY486_07	874080	874529
Leishmania major	Friedlin	centrin-4, putative	LmjF.22.1410	LmjF.22	585786	586235
Leishmania tarentolae	Parrot Tar II 2019	-	-	BLBS01000029	589774	590223
Leishmania enriettii	LEM3045	-	-	LenLEM3045_22	529186	529635
Leishmania sp. Ghana	MHOM/GH/201 2/GH5	-	-	CM030489	667321	667770
Leishmania orientalis	MHOM/TH/201 4/LSCM4	-	-	CM030453	604127	604576
Leishmania sp. Namibia	MPRO/NA/1975 /252/LV425	-	-	CM030561	676916	677365
Leishmania amazonensis	MHOM/BR/7197 3/M2269	-	-	KE391567.1	23432	23881

Espécie	Cepa	Anotação	Código	Cromossomo	Local	ização
Leishmania mexicana	MHOM/GT/200 1/U1103	-	-	LmxM.22	578083	578532
Leishmania infantum	JPCM5	-	-	LinJ.22	641770	642219
Leishmania donovani	HU3	-	-	LR812642	621381	621830
Leishmania aethiopica	L147	-	-	LaeL147_22	500449	500898
Leishmania arabica	LEM1108	-	-	LarLEM1108_22	461552	462001
Leishmania gerbilli	LEM452	-	-	LgeLEM452_22	474901	475350
Leishmania tropica	L590	-	-	LtrL590_22	527060	527509
Leishmania turanica	LEM423	-	-	LtuLEM423_22	501473	501922
Trypanosoma brucei	brucei TREU927	centrin-4	Tb927.7.3410	Tb927_07_v5.1	886561	887312
Trypanosoma brucei	EATRO1125	centrin-4	Tb1125.7.3410	CM032582.1	941855	942606
Trypanosoma brucei	gambiense DAL972	centrin-4, putative	Tbg972.7.3740	Tbg972_07	938882	939331
Trypanosoma brucei	Lister strain 427	centrin, putative	Tb427.07.3410	Tb427_07_v4	887376	887825
Trypanosoma congolense	IL3000 2019	centrin-4	TcIL3000.A.H_0 00518900	Tc.A.H.pschr_0	2122707	2123156