

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
CURSO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Natália Machado Gutierrez

Proteína CHAP1 de *Trypanosoma cruzi*: Ferramentas para caracterização funcional

Florianópolis

2021

Natália Machado Gutierrez

Proteína CHAP1 de *Trypanosoma cruzi*: Ferramentas para caracterização funcional

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas

Orientadora: Prof^ª. Patrícia Hermes Stoco

Florianópolis

2021

Gutierrez, Natália

Proteína CHAP1 de Trypanosoma cruzi: Ferramentas para caracterização funcional / Natália Gutierrez ; orientadora, Patrícia Hermes Stoco, 2021.

53 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Trypanosoma cruzi. 3. CHAP1. 4. Tripanotiona Sintetase. 5. Sistema Antioxidante. I. Hermes Stoco, Patrícia. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

Natália Machado Gutierrez

Proteína CHAP1 de *Trypanosoma cruzi*: Geração de ferramentas para caracterização funcional

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel em Ciências Biológicas” e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas

Florianópolis, 05 de Fevereiro de 2021.

Prof. Carlos Roberto Zanetti, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof^a. Patrícia Hermes Stoco, Dr^a.
Orientadora
UFSC

Profa. Ingrid Beltrame Botelho, Dra.
Avaliadora
UNISUL

Gianni Mancini, Dr.
Avaliador
UFSC

Profa. Patricia Flavia Quaresma, Dra.
Avaliadora Suplente
UFSC

Este trabalho é dedicado ao meu Pai Ricardo Cyrillo Gutierrez, a primeira pessoa que acreditou em mim como Bióloga.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha orientadora Dr^a Patrícia Hermes Stoco, minha grande inspiração e exemplo na ciência, por ter aceitado me orientar, não só para este trabalho, mas como em todos os projetos PIBICs que eu participei, me orientar na graduação e na vida. Agradeço todos os esforços investidos em mim que não foram poucos, todo o apoio na academia e fora dela, pelos conselhos e conversas que houve durante todos esses anos e agradecer por sempre ter me enxergado como uma pessoa íntegra, com as minhas qualidades e dificuldades. Agradeço por toda paciência e por ter sempre acreditado muito em mim. És uma mulher incrível Pati, fico grata pela grande sorte de ter te conhecido e pela oportunidade de me espelhar em uma mulher tão forte e determinada.

Ao Professor Dr. Edmundo Grisard, por todas as conversas que tivemos, conselhos dados e sessões de “terapia”. Ed, você é, como eu já disse muitas vezes, meu orientador de vida e um segundo pai pra mim, muito obrigada por sem querer aceitar esse papel e desempenhá-lo da melhor maneira possível.

À Milene, por todos os ensinamentos no laboratório de Protozoologia e agora na BiomeHub, e pelo companheirismo diário.

À Carime Lessa Mansur Pontes, por todos os ensinamentos no laboratório de Protozoologia e pela grande contribuição a este trabalho.

À Adriana Silva Corrêa, por ter contribuído também de forma significativa neste trabalho, por ter atendido a todos os pedidos de ajuda sem exitar, não só a mim, mas a todos os colegas de trabalho.

Aos Professores Mário, Glauber e Patrícia por todos os conselhos e ensinamentos.

Aos meus companheiros de laboratório, Laryssa, Vanessa, Bia, Ana, Caiibe, Bibiana, Amábili, Viviane, Guilherme, Iasmin, Thomas, Eric, Taty, pela convivência diária e pela ajudano laboratório.

Ao meu Pai, em memória, por ter sido a primeira pessoa a acreditar em mim quando a ideia de me tornar Bióloga surgiu e por ser a pessoa que sempre acreditou em mim em todos os outros aspectos da minha vida, além de cuidar de mim e dos meus irmãos de forma excepcional, e me proporcionar uma vida e educação tão boas. Me tornei a adulta que sou por conta de tudo que meu pai me ensinou e proporcionou.

À minha mãe Cleris, por sempre acreditar em mim e me apoiar em todas as minhas decisões, e me amar incondicionalmente.

Ao meu avô Milton, por todo o apoio em todos esses anos e por sempre acreditar em mim.

À minha madrastra, Marizet e minha irmã Mariana, por todo o companheirismo e apoio e por estarem presentes nos momentos mais difíceis.

À minha família por todo o apoio e companheirismo mesmo estando longe.

Ao meu irmão e melhor amigo Lucas, por ser a pessoa que mais me apoia em todas as decisões, pelos puxões de orelha quando necessário, pelos momentos juntos de muita risada, reflexões, por me apoiar também sempre nos momentos mais difíceis e pela presença nos momentos felizes, pelos conselhos e pelo simples fato de existir e tornar a minha vida mais feliz.

À minha amiga Sophia, por ser minha maior fã e vibrar muito por todas as minhas conquistas, obrigada também por estar presente nos momentos difíceis e compartilhar comigo esses momentos, mas também os momentos de muita alegria além de todo o apoio nas minhas decisões.

Às minhas amigas, Thaís, Monique, Sofia, Isa, Laura e Carime, por serem muito mais que minhas amigas, mas sim ser a família que eu escolhi, eu amo vocês. Obrigada por todos os momentos de descontração, reflexão, e obrigada por estarem presentes nos meus momentos mais difíceis e por tornarem esses momentos e também a minha vida mais colorida e cheia de história para contar. Obrigada por tudo.

Às minhas amigas de escola Náthalie, Lara, Marina e Ceci, por vibrarem pelas minhas conquistas, mesmo de longe.

Ao meu amigo Gabs, por compartilhar comigo os melhores momentos da minha vida e estar presente sempre nos difíceis, eu te amo muito.

Aos meus colegas de trabalho e amigos do Furta Cor Podcast, Satu, Leo, Lucas, Chris, Pedrão e Gabs por me aceitarem nesse projeto maravilhoso, pela convivência que não é pouca, por me entenderem tanto e por vibrarem pelas minhas conquistas. Vocês se tornaram muito na minha vida.

Aos meus colegas de casa e amigos, Rebeca, Bia, Abadio e Taty, pelo convívio, companheirismo, e principalmente por segurar as pontas nesse período de TCC.

A minha gata Dora, pela companhia em todos os momentos e por ser meu momento de alívio.

Aos meus professores do ensino médio Ana Cristina (BioAna) e Thiago, por me despertarem o gosto pela Biologia.

À todos os meus professores da graduação pela minha formação como Bióloga

Aos meus colegas de trabalho na BiomeHub, Felipe, Dani, Vanessa, Lucas, Ana, Milene, Carol, Aline, Laís, Mirella, Bárbara, Jéss, Carime, Ana Vieira, Bianca, Renata, Lígia, Jana, Mari, Carlos pela convivência diária e pelos ensinamentos, e especialmente para a Delly, por, além de tudo, ser tão compreensível durante esse período do TCC.

À banca, por ter aceitado participar e avaliar esse trabalho.

À UFSC por me proporcionar uma formação gratuita e de qualidade.

Ao CNPq por todas as bolsas PIBIC que participei, que contribuíram para me tornar a profissional que sou hoje.

À todas as agências de fomento que proporcionaram a execução desse trabalho.

À Alexandra Elbakyan, criadora do SciHub, a qual eu tive a oportunidade de agradecer pessoalmente, por proporcionar o acesso livre a informação científica.

À todas as pessoas que de alguma maneira passaram na minha vida e contribuíram pra pessoa e jovem cientista que sou hoje.

Embora seja sempre bom acreditar em si mesmo, uma ajudinha dos outros pode ser uma grande benção. (Avatar, a Lenda de Aang)

RESUMO

O *Trypanosoma cruzi* é o protozoário agente etiológico da doença de Chagas. Esse parasito possui um ciclo de vida heteroxênico, compreendendo um hospedeiro mamífero e um invertebrado. Para estabelecer a infecção e manter o seu metabolismo, o *T. cruzi* precisa estabilizar os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) provenientes do sistema imune de seus hospedeiros, bem como produzidos de forma intrínseca. Para não sofrer com esse estresse oxidativo e nitrosativo, o *T. cruzi* possui um sistema antioxidante exclusivo baseado na tripanotiona, um tiol formado por duas glutationas e uma espermidina, que é sintetizado por uma reação de duas etapas, ambas catalisadas pela enzima tripanotiona sintetase (TryS). Essa enzima é essencial para o metabolismo do parasito. Em estudos genômicos do nosso grupo de pesquisa, foi verificada a presença de outras duas sequências anotadas nos bancos de dados de tripanosomatídeos como *TryS*, porém elas não possuem o domínio de síntese, apenas o domínio CHAP e por essa razão essas sequências foram renomeadas como *TcChap1* e *TcChap2*. A *TcChap1* difere da *TryS* por ser menor e possuir endereçamento para mitocôndria. Assim, não se tem claro qual a função desta proteína e, portanto, o objetivo deste trabalho é construir ferramentas para a caracterização funcional da proteína CHAP1 de *Trypanosoma cruzi*. Inicialmente, foi realizada a expressão heteróloga da proteína CHAP1 visando a posterior produção de um anticorpo policlonal. A proteína foi expressa e purificada da fração insolúvel do extrato proteico bacteriano, no entanto, apesar dos diversos testes de expressão para a obtenção da proteína na forma nativa não se obteve expressão em quantidade suficiente para a purificação. Apesar da imunização de camundongos ter sido realizada o soro obtido não foi capaz de reconhecer a proteína nos ensaios realizados. Em paralelo foi construído um plasmídeo com o intuito de fazer a superexpressão da *TcCHAP1* no parasito. Este plasmídeo foi usado na transfecção de *T. cruzi* e após seleção de uma população homogênea, os parasitos mutantes foram desafiados com peróxido de hidrogênio. Os parasitos superexpressando *TcCHAP1* não apresentaram diferenças morfológicas nem alteração na capacidade de sobreviver ao estresse oxidativo promovido pela exposição ao peróxido quando comparados com os parasitos selvagens. Desta forma, a proteína *TcCHAP1* não parece estar envolvida no metabolismo redox extrínseco. Também foi realizada uma tentativa de deleção do gene que codifica para *TcCHAP1*. A estratégia incluiu o desenho dos iniciadores necessários para a construção dos sgRNAs e os templates de reparo para *TcCHAP1*, assim como a transfecção do mix de deleção. Os parasitos passaram por processo de seleção por antibióticos, porém não foi possível observar a deleção do gene.

Palavras-chave: Tripanotiona Sintetase. Sistema Antioxidante. Tripanotiona.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is the protozoan etiologic agent of Chagas disease. This parasite has a heteroxenic life cycle, comprising a mammalian host and an invertebrate. To establish the infection and maintain its metabolism, *T. cruzi* needs to stabilize the levels of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNA) from the immune system of its hosts, as well as being sought in an intrinsic manner. In order not to suffer from this oxidative and nitrosative stress, *T. cruzi* has an exclusive antioxidant system based on trypanothione, a thiol formed by two glutathione and a spermidine, which is synthesized by a two-step reaction, both catalyzed by the trypanothione synthase enzyme (TryS). This enzyme is essential for the parasite's metabolism. In genomic studies of our research group, the presence of two other sequences noted in the trypanosomatid databases such as TryS was verified, but they do not have the synthesis domain, only the CHAP domain and for that reason these sequences were renamed as *TcChap1* and *TcChap2*. *TcChap1* differs from TryS in that it is smaller and has an address for mitochondria. Thus, it is not clear what the function of this protein is, therefore, the objective of this work is to build tools for the functional characterization of the CHAP1 protein of *Trypanosoma cruzi*. Initially, a heterologous expression of the CHAP1 protein treated was carried out with the subsequent production of a polyclonal antibody. The protein was expressed and purified from the insoluble fraction of the bacterial protein extract, however, despite several expression tests for the consequence of the protein in its native form, it is not expressed in sufficient quantity for purification. Although the immunization of mice was performed, the serum was not able to recognize the protein in the tests performed. In parallel, a plasmid was constructed in order to overexpress *TcCHAP1* in the parasite. This plasmid was used in the transfection of *T. cruzi* and after selecting a homogeneous population, the mutant parasites were challenged with hydrogen peroxide. Parasites overexpressing *TcCHAP1* do not dissipate morphological differences or change in the ability to survive the oxidative stress caused by exposure to peroxide when compared to wild parasites. Thus, the *TcCHAP1* protein does not appear to be involved in extrinsic redox metabolism. An attempt was also made to delete the gene encoding *TcCHAP1*. The strategy included the design of the primers for the construction of the sgRNAs and the repair templates for *TcCHAP1*, as well as the transfection of the deletion mix. The parasites underwent a selection process with antibiotics, but it was not possible to observe the deletion of the gene.

Keywords: Trypanothione synthetase. Antioxidant System. Trypanothione.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Vias biossintéticas associadas à tripanotiona em *Trypanosoma cruzi*. Nos círculos estão apontadas as enzimas envolvidas nos diferentes processos: TryS- Tripanotiona sintetase; TR- tripanotiona redutase; GspS – Glutationil espermidina sintetase; APX- Ascorbato peroxidase; TXNPx- Triparedoxina peroxidase; GPX- Glutationa peroxidase. Fonte: Adaptado de Xiao et al. (2009). 18
- Figura 2: Evolução do gene Tripanotiona Sintetase em tripanosomatídeos. Proposta de evolução da TryS vindo da GspS. A caixa fragmentada indica o pseudogene GspS identificado em *Leishmania major* (Friedline) e as caixas em cinza indicam os genes da TryS. Fonte: OZA et al. (2005)..... 19
- Figura 3: Representação dos plasmídeos contendo os genes de resistência a Blastidina e Puomicina. A) pTCBLAST; B) pTPURO_v1. Fonte: (COSTA et al., 2018)..30
- Figura 4 . Representação do plasmídeo pLEWCas9. Fonte: (COSTA et al., 2018). .30
- Figura 5: Amplificação, clonagem e subclonagem do gene Chap1 de *T. cruzi*. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. PM - padrão de peso molecular (Fago lambda digerido com a enzima *PstI*); A) Produto de amplificação do gene Chap1 da cepa Y de *T. cruzi* (1); B) Produto de amplificação de PCR das colônias crescidas a partir da ligação do gene no vetor de clonagem pGEM-T-easy. O quadro vermelho indica as amostras positivas.; C) Produtos de amplificação da PCR das colônias referentes ao processo de subclonagem da Chap1 no vetor de expressão pET-47b. As setas indicam amostras positivas.....32
- Figura 6: Alinhamento das sequências nucleotídicas e aminoacídicas de *TcCHAP1*. A) Alinhamento da sequência nucleotídica do gene *Chap1* das cepas Dm28C, CL Brener e Y de *Trypanosma cruzi*. Em amarelo destaca-se os nucleotídeos que não se repetem nas sequências. B) Alinhamento da sequência aminoacídica da proteína *TcCHAP1* das cepas Dm28C, CL Brener e Y. Em amarelo está identificada a sequência corresponde ao possível peptídeo sinal da proteína e em laranja a região corresponde ao domínio CHAP. Os asteriscos (*) correspondem a nucleotídeos ou aminoácidos idênticos na mesma posição do alinhamento e o símbolo (:) indica aminoácidos conservados..... 32
- Figura 7: Expressão heteróloga da proteína *TcCHAP1* e a confirmação por Western Blot. A) Gel SDS-PAGE 12% da expressão heteróloga da proteína *TcCHAP1* em células *E. coli* BL21(DE3) realizada em diferentes tempos e temperaturas; PM- Peso Molecular (Precision Plus Protein Dual Color Standard, BioRad®); B) *Western Blot* para detecção de cauda de histidinas na proteína expressa *TcCHAP1* nas condições de 27°C/12h e 37°C/6h..... 34

Figura 8: Purificação da proteína *TcCHAP1*. Gel SDS-PAGE 12%, com amostras de purificação da *TcCHAP1* a partir da fração insolúvel do extrato proteico bacteriano. PM: Padrão de peso molecular (Precision Plus Protein Dual Color Standards, BioRad); Sob: Sobrenadante; FT: Throw (Porção proteica não ligante a resina); L1: Primeira lavagem; L2: Segunda lavagem; L3: Terceira lavagem; E1: Primeira eluição; E2: Segunda eluição; E3: Terceira eluição; E4: Quarta eluição; E5: Quinta eluição. As setas indicam bandas de tamanho menor do que o esperado. 34

Figura 9: Expressão heteróloga da *TcCHAP1* em células *E. coli* BL21 (DE3). A) Gel SDS-PAGE 10% com amostras de extrato solúvel de proteínas após a indução da expressão heteróloga da *TcCHAP1*. PM: Peso molecular (Precision Plus Protein Dual Color Standards, BioRad); 1: Expressão induzida a 27°C durante 12h; 2: Expressão induzida a 37°C durante 6h. B) Ensaio de *Western blot* da expressão induzida a 37 °C durante 6h, utilizando anticorpo primário anti-cauda de histidinas. 35

Figura 10: Purificação da proteína *TcCHAP1* a partir da fração solúvel do extrato proteico bacteriano. Gel SDS-PAGE 12% contendo amostras do processo de da *TcCHAP1*. PM: Peso molecular (Precision Plus Protein Dual Color Standards, BioRad); Sob: Sobrenadante; FT: Flow- through (Porção proteica não ligante a resina); L1: Primeira lavagem; L2: Segunda lavagem; L3: Terceira lavagem; E1: Primeira eluição; E2: Segunda eluição; E3: Terceira eluição; E4: Quarta eluição; E5: Quinta eluição. 36

Figura 11: Expressão heteróloga da *TcCHAP1* em células *E. coli* BL21 (DE3) utilizando a adição de álcool benzílico. A) Gel SDS-PAGE 10% com amostras de extrato solúvel de proteínas após a indução da expressão heteróloga. PM: Padrão de Peso molecular (Precision Plus Protein Dual Color standards, BioRad); B) Ensaio de *Western blot* de amostras de extrato solúvel proteico após a indução da expressão heteróloga da *TcCHAP1*, utilizando anticorpo primário anti-cauda de histidinas. 1: Amostra mantida a 4°C durante 3 dias sem adição de álcool benzílico; 2: Amostra mantida a 15°C durante 12h adicionado de 10mM de álcool benzílico; 3: Amostra mantida a 27 °C durante 3 horas adicionado de 10mM de álcool benzílico. 37

Figura 12: Expressão heteróloga da *TcCHAP1* em bactérias *E. coli* linhagem Rosetta-gami A) Gel SDS-PAGE 10% com amostras de extrato total de proteínas após a indução da em diferentes tempos de incubação. PM: Padrão de Peso molecular (Precision Plus Protein Dual Color Standards, BioRad); 1: Controle não induzido pET47b; 2: pET47 sem o inserto; 3: Controle não induzido; 4: 15°C/3h; 5: 27°C/3h; 6: 37°C/3h; 7: 15°C/6h; 8: 27°C/6h; 9: 37°C/6h;

10: 15°C/12h; 11: 27°C/12h; 12: 37°C/12h; B) Ensaio de Western blot das mesmas amostras utilizando anticorpo primário anti-cauda de histidina. CP: Controle positivo (proteína recombinante com cauda de histidinas);.....38

Figura 13: Representação gráfica do gene *TcChap1* e da região utilizada para a subclonagem e produção do fragmento proteico (em azul). Os sítios para as enzimas *Bam*HI e *Sma*I ao longo do gene estão representados.38

Figura 14: Subclonagem do fragmento do gene *TcChap1*. A) Gel de agarose 2% contendo amostra da digestão da construção pGEM-*TcCHAP1*, com as enzimas *Bam*HI e *Sma*I. PM: PadrãoPeso molecular Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad); B) Gel de agarose 1% contendo amostras de PCR das colônias obtidas. As setas indicam amostras positivas. CN: Controle negativo da reação de PCR.....39

Figura 15: Expressão heteróloga do fragmento de *TcCHAP1* em células *E. coli* M15. A) Gel SDS-PAGE 12% com amostras de extrato total de proteínas após a indução da expressão em diferentes condições. PM: Padrão de Peso molecular Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad); CNI: Controle não induzido; Amostras induzidas em diferentes condições: 1- 3h/15 °C; 2- 3h/27 °C; 3- 3h/37 °C; 4- 6h/15 °C; 5- 6h/27 °C; 6- 6h/37 °C; 7- 12h/15 °C; 8- 12h/27 °C; 9- 12/37 °C; B) Gel SDS-PAGE 12% com amostras de extrato solúvel e insolúvel de proteínas após a indução da expressão em diferentes condições. FEC: Controle de indução com o plasmídeo sem o inserto; 1e 2- Extrato proteico total das condições 3h/37 °C e 6h/ 27 °C; 3 e 4- Fração solúvel das condições 3h/37 °C e 6h/ 27 °C; 5 e 6- Fração insolúvel das condições 3h/37 °C e 6h/ 27 °C. CP: Controle positivo; C) Ensaio de *Western blot* das amostras referentes ao gel B, utilizando anticorpo primário anti-cauda de histidinas.....40

Figura 16: Construção do plasmídeo pROCKmNG-*TcChap1* para a superexpressão. A) Gel de agarose 1% contendo amostra de amplificação do gene *TcChap1*. PM: Padrão de peso molecular (Fago lambda digerido com a enzima *Pst*I); CN: Controle negativo. B) Gel de agarose 1% contendo amostra de digestão com as enzimas *Xba*I e *Hind*III. pROCK: plasmídeo pROCKmNG digerido; DIG: plasmídeo pGEM-*TcChap1* digerido. C): Gel de agarose 1% contendo amostras de PCR de colônia para confirmação da inserção do inserto ao plasmídeo. AZUL: Controle de colônia sem inserto; 1-3: Amostras de PCR de colônia positivas para o inserto. D: Representação esquemática da construção final do plasmídeo pROCKmNG-*TcChap1*41

Figura 17: Avaliação da fluorescência do *T. cruzi* Y superexpressando a proteína *TcCHAP1*. A e B) Avaliação dos parasitos por microscopia de fluorescência. C) Citometria de fluxo.....43

Figura 18: Ensaio de sensibilidade de *T. cruzi* superexpressando a *TcCHAP1* ao estresse oxidativo induzido por diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio. *T. cruzi* WT: parasitos selvagens; clone 6 e clone 9: culturas de parasitos superexpressando a *TcCHAP1*. IC50: Concentração de H₂O₂ necessária para matar 50% dos parasitos 44

Figura 19: Análise do fenotípica e genotípica dos parasitos após a transfecção para a deleção do gene que codifica para *TcCHAP1*. A) *T. cruzi* da cepa Y corados com Giemsa em aumento de 1.000X; WT: selvagem; *TcCHAP1* KO: transfectados com o mix de deleção; B) Gel de agarose 1% do resultado da amplificação por PCR do gene que codifica para *TcChap1* nos parasitos selvagens (WT) e transfectados com o mix de deleção (KO). Controle negativo da reação (CN)..... 45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg – Micrograma

μl – Microlitro

ATP: Adenosina tri-fosfato

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DUOX: Dual oxidase

ERN: Espécies reativas de nitrogênio

ERO: Espécies reativas de oxigênio

GspS: Glutathionilperoxidase Sintetase

H_2O_2 : Peróxido de hidrogênio

iNOS: Óxido nítrico-sintetase 2

l – Litro

LIT: Liver Infusion Tryptose

ml – Mililitro

mM – Milimolar

ng – Nanograma

NO: Óxido Nítrico

NOS: Óxido nítrico-sintetase

ONOO^- : Peroxinitrito

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

RNA – Ácido Ribonucleico

SBF: Soro Bovino Fetal

sgRNA: RNA guia

TryS: Tripanotona Sintetase

UTR: Regiões não codificantes (Do inglês *Untranslated regions*)

WT – Selvagem (do inglês *Wild Type*)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	DOENÇA DE CHAGAS	15
1.2	<i>Trypanosoma cruzi</i>	15
1.3	SISTEMA ANTIOXIDANTE	16
1.4	TRIPANOTIONA SINTETASE	19
1.5	OBJETIVOS	20
1.5.1	Objetivo Geral.....	20
1.5.2	Objetivos Específicos	20
2	MATERIAL E MÉTODOS	20
2.1	PARASITOS	21
2.2	DESENHO DE INICIADORES PARA PCR DO GENE CHAP1 DE <i>T. cruzi</i>	21
2.3	EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO	Erro! Indicador não definido.
2.4	AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DO GENE <i>TcChap1</i>	21
2.5	SEQUENCIAMENTO DO GENE <i>TcChap1</i> NO VETOR DE EXPRESSÃO	23
2.6	EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA PROTEÍNA <i>TcCHAP1</i>	23
2.7	VERIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA <i>TcCHAP1</i> POR WESTERN BLOT	23
2.8	PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA <i>TcCHAP1</i>	24
2.9	SUBCLONAGEM E EXPRESSÃO DE UM FRAGMENTO DA PROTEÍNA CHAP1 DE <i>T. cruzi</i>	24
2.10	AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E SUBCLONAGEM DO GENE TCCHAP1 PARA A SUPEREXPRESSÃO EM <i>T. cruzi</i>	26
2.11	OBTENÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL ANTI- <i>TcCHAP1</i>	Erro!
	Indicador não definido.	
2.12	ENSAIO DE ELISA PARA TITULAÇÃO DE SORO POLICLONAL CONTRA PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	Erro! Indicador não definido.

2.13	TRANSFEÇÃO DO PLASMÍDEO pROCKMNG_ <i>Tc</i> CHAP1 EM <i>T. cruzi</i>	27
2.14	CITOMETRIA DE FLUXO PARA QUANTIFICAÇÃO DA POPULAÇÃO MUTANTE.....	28
2.15	AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE À PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO	28
2.16	DESENHO DOS RNAS GUIA (sgRNA) PARA A DELEÇÃO DO GENE <i>TcChap1</i> PELO MÉTODO DE CRISPR-CAS9	28
2.17	TRANSFEÇÃO DE <i>T. cruzi</i> COM O MIX DE DELEÇÃO PARA <i>TcChap1</i> (CASSETES DE TRANSCRIÇÃO SGRNA E HOMOLOGIA E O PLASMÍDEO COM A SEQUÊNCIA PARA A EXPRESSÃO DO GENE CAS9)	29
2.18	VERIFICAÇÃO DE DELEÇÃO DE GENES ENDÓGENOS.....	31
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
3.1	EXPRESSÃO HETERÓLOGA E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA CHAP1 DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	31
3.2	SUPEREXPRESSÃO DA PROTEÍNA CHAP1 EM <i>Trypanosoma cruzi</i>	40
3.3	DELEÇÃO DO GENE CHAP1 DE <i>T. cruzi</i>	44
4	CONCLUSÃO.....	46
	REFERÊNCIAS.....	47

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas foi descrita por Carlos Chagas no ano de 1909, o qual também descreveu o seu agente etiológico e seu ciclo biológico. A doença é caracterizada por apresentar duas fases clínicas, uma fase aguda e uma fase crônica. A fase aguda pode ser assintomática ou se manifestar com sintomas como febre, mal-estar, miocardite, dentre outros, além de apresentar uma alta parasitemia. A fase crônica pode, assim como na aguda, ser assintomática, porém pode desencadear complicações digestivas e/ou cardíacas entre 20 a 40 anos após a infecção, além de ter uma baixa quantidade de parasitos no sangue e maior quantidade nas vísceras do paciente (JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Hoje em dia estima-se que existam de 6 a 7 milhões de pessoas em todo o mundo infectadas pelo agente etiológico, o *Trypanosoma cruzi*. Na América Latina, onde esse parasito é endêmico estima-se que cause a morte de mais que 10 mil pessoas por ano e a incapacidade de um número significativo de pessoas infectadas, sendo assim um dos maiores problemas de saúde pública nessa região. Apesar de ser endêmico da América Latina, a doença tem sido detectada, nas últimas duas décadas, em regiões consideradas não endêmicas devido a eventos como migração de pessoas infectadas. A transmissão autóctone nessas regiões ocorre por meio de transfusão sanguíneas e transplantes, enquanto em áreas endêmicas ocorre principalmente por transmissão vetorial ou consumo de frutas *in natura* em regiões com maior incidência do vetor infectado (WHO, 2021).

A doença de Chagas é considerada uma doença negligenciada, por esse termo entende-se que é uma doença que prevalece em regiões em condições de pobreza e causa dificuldade no desenvolvimento do país, contribuindo assim para desigualdade social. Por ser uma doença negligenciada, a indústria farmacêutica não possui grande interesse em reverter os conhecimentos desenvolvidos pela ciência em avanços terapêuticos como novos fármacos, métodos diagnósticos e vacinas, embora exista financiamento em pesquisa, e avanços importantes no conhecimento dessa doença (Ministério da Saúde, 2010).

1.2 *Trypanosoma cruzi*

O agente etiológico da doença de Chagas, o *Trypanosoma cruzi* é um protozoário pertencente a classe Kinetoplastea, grupo caracterizado por apresentar organismos unicelulares

e eucariotos e por possuírem uma estrutura de DNA mitocondrial única, região chamada de cinetoplasto. É um grupo bastante diverso, compreendendo organismos de vida livre ou patógenos de diversos grupos de animais e até plantas. O *T. cruzi* é um patógeno com ciclo heteroxênico, ou seja, possui uma fase em um hospedeiro mamífero e uma fase em um hospedeiro invertebrado, sendo que o mamífero pode ser o ser humano. Durante o repasto sanguíneo o inseto triatomíneo (popularmente conhecido como barbeiro) ingere formas tripomastigotas do parasito, presentes no sangue do hospedeiro mamífero infectado. No trato intestinal do triatomíneo, as formas tripomastigotas se diferenciam em formas epimastigotas, a forma replicativa do parasito no inseto. Após diversas divisões celulares e o aumento da população de parasitos, essas formas atingem a porção final do intestino do inseto, e passam a se diferenciar novamente, dessa vez nas formas tripomastigotas metacíclicas, forma infectiva do parasito. Durante um novo repasto sanguíneo, o barbeiro defeca, e nessas fezes se encontram os parasitos. Ao entrar em contato com a corrente sanguínea através de cortes ou feridas, ou até mesmo pelo contato com mucosas, o parasito infecta o mamífero, invadindo diversos tipos celulares. As células do hospedeiro internalizam o parasito em vacúolos, os quais são evadidos pelo *T. cruzi* que passa a se diferenciar novamente em uma forma replicativa, as formas amastigotas, que novamente se multiplicam no citoplasma celular. Os parasitos voltam a se diferenciar na forma infectiva (tripomastigota) que rompem a célula hospedeira e caem na corrente sanguínea. Essas formas por sua vez infectam outras células ou são capturadas pelo triatomíneo, reiniciando o ciclo (DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010).

1.3 SISTEMA ANTIOXIDANTE

O *T. cruzi* ao infectar seus hospedeiros ativa diversas vias de resposta imunológicas, que tem como intuito de impedir a infecção das células e a sua proliferação. A primeira linha de defesa contra microrganismos é a explosão respiratória, que consiste na produção rápida de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN) que por sua vez interagem e modificam biomoléculas, como proteínas, lipídeos e até ácidos nucleicos podendo levar a morte do parasito. Esse tipo de resposta no mamífero acontece pela redução do elétron do O₂ catalisado pela enzima NADPH oxidase, ao ser ativada nos macrófagos durante a infecção pelo próprio *T. cruzi*. Além da NADPH oxidase, a enzima óxido nítrico-sintase 2 (iNOS), responsável por produzir óxido nítrico (NO), é ativada gerando outras espécies reativas que participam também da resposta a infecção pelo parasito (ALVAREZ et al., 2011;

JIMENEZ, 2014.). Essas espécies são liberadas dentro do vacúolo fagocítico, formado a partir da invasão do parasito na célula, durante aproximadamente o tempo entre 60 e 90 minutos. Já no inseto a resposta oxidativa ao parasito acontece no intestino, onde são ativadas as enzimas Dual Oxidase (DUOX), pertencente a família das enzimas NADPH oxidases, e a óxido nítrico sintetase (NOS), produzindo respectivamente ERO e ERN, resultando na produção de radicais O^{2-} e peroxinitrito ($ONOO^-$) (SIES, 2014).

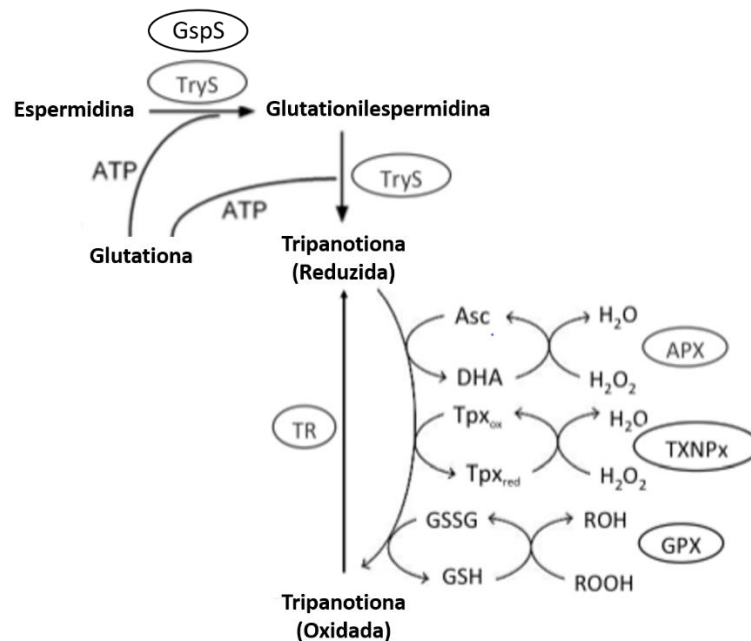
Sabe-se que o Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2), nas células eucarióticas, é uma molécula importante na sinalização celular, atuando na regulação metabólica e sendo a primeira linha de sinalização independente de transcrição. Além disso, organismos aeróbicos produzem EROs decorrente da produção de ATP pela cadeia respiratória, dessa forma produzindo H_2O_2 para sinalização celular. O *T. cruzi*, assim como outros organismos aeróbicos, produz EROs de forma intrínseca e seu ciclo de vida o expõe a EROs e ERNs de origem extrínseca. Essas espécies, como citado anteriormente, funcionam como importantes sinalizadores celulares, porém seu excedente pode ser extremamente prejudicial para a célula, uma vez que espécies reativas interagem com biomoléculas podendo levar a morte celular. Dessa maneira, para garantir o sucesso da sua infecção o *T. cruzi* precisa manter os níveis de EROs e ERNs controlados, evitando o estresse oxidativo e estresse nitrosativo.

Os tripanosomatídeos possuem um sistema antioxidante encontrado exclusivamente neste grupo e em algumas espécies de bactérias, baseado no tiol Tripanotiona (IRIGOÍN et al., 2008; KRAUTH-SIEGEL; COMINI; SCHLECKER, 2007; TOMÁS; CASTRO, 2013; TURRENS, 2004). A Tripanotiona é um tiol de baixo peso molecular, considerado um análogo funcional da glutathiona nos mamíferos, ela atua na neutralização de espécies reativas, atuando como um doador de elétrons em diferentes processos celulares, assim como na decomposição de agentes oxidantes em diversas vias metabólicas (BOCEDI et al., 2010; FAIRLAMB et al., 1985; IRIGOÍN et al., 2008; KRAUTH-SIEGEL; LEROUX, 2012; MANTA et al., 2013)

A Tripanotiona é um tiol formado por duas moléculas de glutathiona conjugadas a uma molécula de espermidina, portanto a sua biossíntese se dá por duas etapas (Figura 1). A primeira etapa consiste na ligação de uma glutathiona a espermidina resultando no intermediário glutathionilespermidina, etapa que pode ser catalisada pela enzima Tripanotiona Sintetase (TryS) ou pela enzima Glutathionilespermidina Sintetase (GspS). Na segunda etapa ocorre a ligação da segunda glutathiona ao intermediário e é mediada exclusivamente pela TryS. Já foi observado

que a apenas a TryS é necessária para essa síntese, sendo independente da GspS em diversos tripanossomatídeos (KRAUTH-SIEGEL; LEROUX, 2012; MANTA et al., 2013).

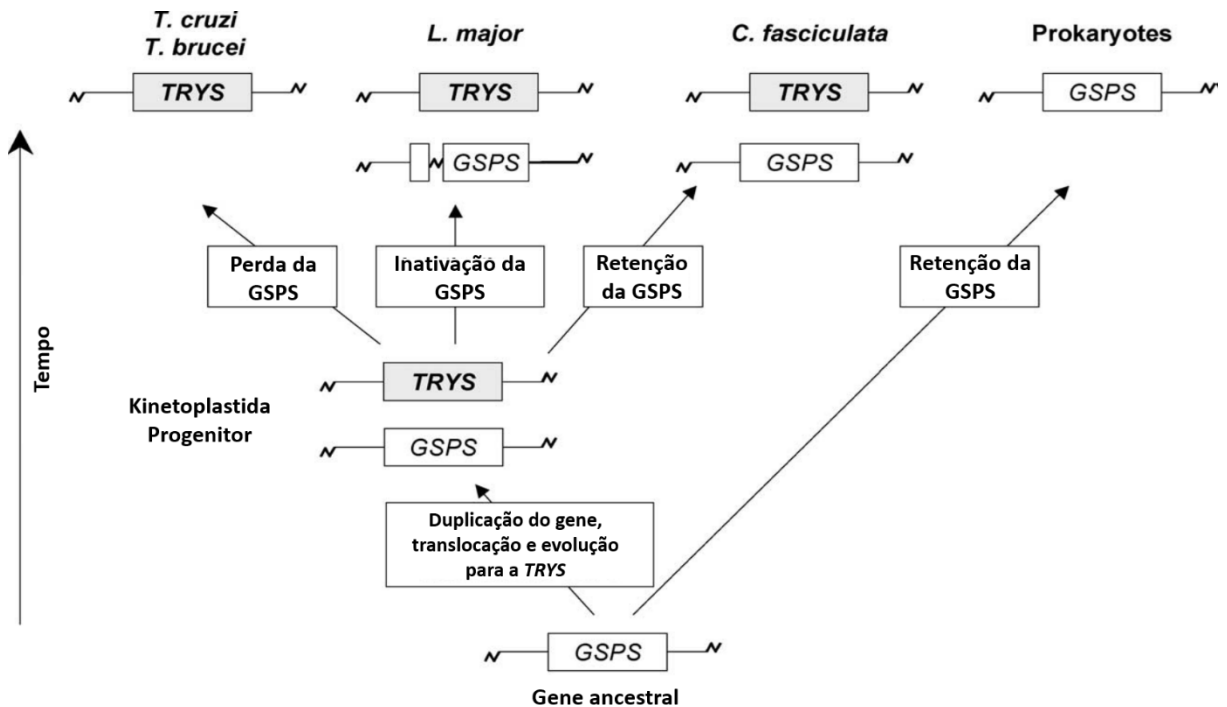
Figura 1: Vias biossintéticas associadas à tripanotiona em *Trypanosoma cruzi*. Nos círculos estão apontadas as enzimas envolvidas nos diferentes processos: TryS- Tripanotiona sintetase; TR- tripanotiona redutase; GspS – Glutationil espermidina sintetase; APX- Ascorbato peroxidase; TXNPx- Triparedoxina peroxidase; GPX- Glutationa peroxidase.



Fonte: Adaptado de Xiao et al. (2009).

Nos genomas das espécies desse grupo os genes que codificam para as enzimas TryS e GspS estão presentes de formas diferentes. Em *Trypanosoma brucei* é ausente o gene GspS, sendo presente apenas o gene TryS. Já *Leishmania infantum*, *Crithidia fasciculata* e *T. cruzi* apresentam os dois genes íntegros, e da mesma maneira a síntese de Tripanotiona pode ocorrer independente da GspS. Em *Leishmania major*, *Leishmania tarentolae* e *Leishmania braziliensis* o gene TryS está presente, porém o gene GspS encontra-se como um pseudogene, ou seja, o gene não é funcional. Como os ancestrais procariotos possuem uma cópia do gene GspS a hipótese que é que os tripanossomatídeos tenham herdado o gene por endossimbiose e então ocorrido a duplicação do gene gerando GspS e TryS. Durante o tempo evolutivo das espécies, a TryS tornou-se cada vez mais substrato específico enquanto o gene GspS foi perdido por algumas espécies do grupo (Figura 2) (OZA et al., 2005; SOUSA et al., 2014; BELTRAME-BOTELHO, 2017).

Figura 2: Evolução do gene Tripanotiona Sintetase em tripanosomatídeos. Proposta de evolução da TryS vindo da GspS. A caixa fragmentada indica o pseudogene GspS identificado em *Leishmania major* (Friedline) e as caixas em cinza indicam os genes da TryS.



Fonte: OZA et al. (2005), Adaptado.

1.4 TRIPANOTIONA SINTETASE

A Tripanotiona Sintetase é uma enzima com dupla função, ela é capaz de fazer a síntese da tripanotiona a partir de glutatona e espermidina e é capaz de catalisar a reação inversa onde a tripanotiona é decomposta de volta nos precursores. A dupla capacidade catalítica da tripanotiona sintetase se deve a dois domínios catalíticos da enzima: O domínio grasp, domínio que catalisa a formação de ligações amida dependente de ATP, responsável pela catalisação da síntese de tripanotiona. E o domínio CHAP, domínio amidase responsável portanto pela hidrólise da tripanotiona, sendo essa reação dependentes de cisteína e histidina. Em um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa em 2017, aspectos evolutivos das enzimas envolvidas no metabolismo antioxidante de tripanosomatídeos foram analisados. Foi observado nesse estudo que existe uma cópia gênica muito conservada, dentre os organismos do grupo, que codifica para a enzima TryS. No entanto, além dessa sequência, foram observados outros dois genes anotados nos bancos de dados de alguns organismos como tripanotiona sintetase. As

análises destes dois genes apontaram a ausência do domínio grasp, o que representa a ausência das características típicas de uma tripanotina sintetase. Esses dois genes, mantiveram conservado o domínio CHAP, estando este mantido na mesma posição da TryS típica. Dessa maneira, essas duas sequências receberam um novo nome devido as suas diferenças, sendo denominadas *TcCHAP1* e *TcCHAP2*. Além dessas características apresentadas, a *TcCHAP1* difere da TryS (~640aa) por ser muito menor (~250aa) e por possuir um sinal de endereçamento para a mitocôndria (BELTRAME et al., 2016). Diante destas evidências, a hipótese deste trabalho é que a *TcCHAP1* tenha função distinta da TryS atuando principalmente na mitocôndria, organela onde ocorre alta produção de EROs e ERNs intrínsecos. Desta forma, o objetivo deste trabalho é obter ferramentas úteis para a caracterização funcional da proteína *TcCHAP1*.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo Geral

Construir ferramentas para a caracterização funcional da proteína CHAP1 de *Trypanosoma cruzi*.

1.5.2 Objetivos Específicos

Expressar de forma heteróloga e purificar, a partir de vetores, a proteína CHAP1 de *Trypanosoma cruzi*.

Avaliar a função da proteína CHAP1 a partir da construção de parasitos *knockout* para o gene *TcChap1*.

Avaliar a proliferação de epimastigotas de *T. cruzi* superexpressando a proteína CHAP1, diante de estresse oxidativo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PARASITOS

Para a obtenção de parasitos da cepa Y de *T. cruzi* (esta cepa encontra-se depositada no criobando com laboratório de protozoologia MIP/CCB/UFSC), formas epimastigotas foram cultivadas em meio LIT (do inglês *Liver Infusion Tryptose*) com 10% de soro bovino fetal (SBF), a 27°C, e mantidos através de passagens semanais.

2.2 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

Para que o DNA genômico dos parasitos fosse extraído foi preciso centrifugar as formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* em fase exponencial de crescimento, que posteriormente foram lavadas por duas vezes com PBS pH 7,4. Foi adicionado 500 µl tampão de lise (100 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 8,0, 1% SDS) e 2,5 µL de proteinase K em uma concentração de 20 mg/ml, sendo assim mantidos por 16 h a 42 °C. A extração de DNA foi feita por método de fenol-clorofórmio como descrito por Russel, Sambrook, (2001). Para a visualização do DNA, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 0,8% posteriormente corado com brometo de etídio.

2.3 DESENHO DE INICIADORES PARA PCR DO GENE CHAP1 DE *T. cruzi*

Para o desenho dos iniciadores foi utilizada a sequência do gene que codifica para a CHAP1 de *T. cruzi*, alocada no banco de dados TriTrypDB com o número de entrada TcCLB.504427.10, conforme descrito por Beltrame-Botelho (2016). A partir dessa sequência, foram desenhados iniciadores específicos para a amplificação do gene com o auxílio do pacote DNASTAR (Lasergene) (*TcCHAP1F* – 5' –GCG GCC GCT ATG ATA ACC GAA AAA ATA ACA CG – 3'; *TcCHAP1R* – 5' – GAG CTC CAT TGG ACG GAA TGT GAG TG – 3'). Para facilitar a posterior clonagem no vetor de expressão pET-47b (Novagen), estes iniciadores foram desenhados adicionando-se sítios clivagem para as enzimas *NotI* (BioLabs) e *SstI* (Gibco)

2.4 AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DO GENE *TcChap1*

A amplificação do gene *TcChap1* se deu através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando-se a enzima *Taq* DNA polimerase em tampão próprio (1X), os iniciadores senso (*TcCHAP1F*) e antissenso (*TcCHAP1R*) ambos na concentração de 10 pmol/ μ l, dNTP (2 mM), MgCl (50 mM). O programa de ciclagem foi com uma etapa de desnaturação inicial de 95 °C durante cinco minutos seguido de 35 ciclos de desnaturação (95 °C durante 1 minuto), ligação dos iniciadores (60 °C durante 1 minuto) e extensão (72 °C durante 1 minuto) e finalizando com uma extensão final a 72 °C durante 10 minutos.. O produto de PCR foi então clonado no vetor de clonagem pGEM-T easy® (Promega) segundo especificações do fabricante. Posteriormente, o plasmídeo foi então utilizado na transformação de células *E. coli* cálcio-competentes da linhagem DH5 α utilizando o método de choque térmico. Após a transformação foi adicionado meio de cultura SOC (2 g/L Triptona, 0,5 g/L Extrato de Levedura, 1 mM NaCl, 0,25 mM KCl, 2 mM Mg²⁺, 2 mM Glicose) e então as bactérias foram incubadas a 37 °C sob agitação para o crescimento bacteriano durante 1 hora. Posteriormente as bactérias foram plaqueadas em meio LB sólido (10 g/L Triptona, 5 g/L Extrato de Levedura, 0,17 mM NaCl) contendo X-gal (20 μ g/ml), IPTG (40 μ g/ml) e ampicilina (100 μ g/ml) e mantida por 12 horas a 37° C. Para verificar as colônias positivas para o inserto foi observado a coloração das colônias (sendo azul as colônias negativas e as brancas colônias positivas, segundo o manual do sistema pGEM-T easy® (Promega), seguido de PCR utilizando iniciadores específicos para o vetor e observação dos tamanhos dos fragmentos amplificados por eletrofose em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio para a confirmação da presença do inserto. As colônias que apresentaram positividade para a presença do plasmídeo foram crescidas em 10 ml de meio LB líquido durante 16 h a 37 °C sob agitação e então submetidas a extração plasmidial por lise alcalina (Mini-prep) (RUSSELL; SAMBROOK, 2001) Para a sub-clonagem do gene de interesse no vetor de expressão, tanto o produto da extração plasmidial quanto o vetor pET-47b foram submetidos a digestões com as enzimas *NotI* e *SstI*, em tampão específico para cada uma das enzimas a 37 °C durante 16 horas. Posteriormente foi feita a ligação mediada pela enzima T4 ligase (Promega) segundo as especificações do fabricante. O plasmídeo construído foi então transformado em bactérias *E. coli* da linhagem DH5 α por método de choque térmico. Logo após foi adicionado de meio SOC e crescido durante 1 hora a 37° C sob agitação constante e posteriormente a suspensão celular foi plaqueada em meio LB sólido acrescido de antibiótico Kanamicina (15 μ g/ml). As colônias foram testadas para a presença da construção plasmidial através de PCR diretamente das colônias, utilizando iniciadores direcionados ao vetor de expressão.

2.5 SEQUENCIAMENTO DO GENE *TcChapI* NO VETOR DE EXPRESSÃO

Para o sequenciamento do gene de interesse foi utilizado o equipamento Applied Biosystems 3500 segundo especificações do fabricante. Este procedimento foi realizado no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB). A reação para o sequenciamento foi realizada utilizando DNA plasmidial extraído dos clones positivos, iniciadores dirigidos ao vetor pET47-b (T7F e T7R) e o Kit BigDye Terminator 3.1 conforme especificações do fabricante. Para a análise da qualidade das sequências obtidas foi utilizado o pacote Phred/Phrap/Consed (<http://www.phrap.org>) sendo consideradas somente as sequências com qualidade Phred>20.

2.6 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA PROTEÍNA *TcCHAP1*

Primeiramente, foi feita a transformação de células *E. coli* da linhagem BL21(DE3) com o plasmídeo resultante do processo de sub-clonagem. Uma colônia foi selecionada e submetida a uma PCR para a confirmação da presença do plasmídeo nas colônias da placa. Após a confirmação foi colocada uma colônia em meio de cultura LB acrescido de 15 µg/ml de kanamicina e mantido sob agitação a 37° C durante 16 horas para a preparação do pré-inóculo. Posteriormente foi adicionado o pré-inóculo em 10 ml de meio LB acrescido de 15µg/ml de kanamicina em uma diluição de 1:10, e deixado sob agitação a 37° C até que a densidade óptica (DO 600) alcançasse entre 0,5 e 0,6. Assim que a DO esperada foi alcançada, foi coletado 1ml de cultura para o controle não induzido, e ao restante foi adicionado 1mM de IPTG (isopropil-D-tiogalactopiranosídeo). Essa cultura foi mantida sob agitação por diferentes tempos (3 horas, 6 horas e 12 horas) e temperaturas (15 °C, 27° C e 37° C). Em cada tempo, as bactérias foram coletadas através de centrifugação a 2000 x g por 10 minutos.

2.7 VERIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA *TcCHAP1* POR *WESTERN BLOT*

Os extratos proteicos totais das bactérias foram resolvidos em gel de poliacrilamida 10%, e então transferidos para membrana de nitrocelulose Hybond-ECL (GE Healthcare) durante 30 minutos a 25V com o aparelho ECLTM Semy-Dry (GE healthcare). As membranas foram bloqueadas usando uma solução de leite desnatado 5% (150 mM de NaCl; 25 mM Tris-

HCl pH 7,4; 1% Tween 20; 5% leite desnatado) durante 1 hora sob agitação em temperatura ambiente. Em seguida a membrana foi lavada cinco vezes com Blotting Buffer (150 mM de NaCl; 25 mM Tris- HCl pH 7,4; 1% Tween 20) e então incubada com o anticorpo anti-histag® (Sigma) em uma diluição de 1:10.000 em solução de leite desnatado 2% durante 90 minutos. A membrana foi então lavada novamente conforme descrito, e incubada com solução de anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a uma peroxidase (Sigma Aldrich) em uma diluição de 1:5.000 durante 1 hora, e então lavadas novamente. Para a revelação foi utilizado o reagente ECL (Thermo Scientific) em filmes radiográficos e então revelado com auxílio do equipamento SRX101A (Konica-Minolta) conforme recomendações do fabricante.

2.8 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA *Tc*CHAP1

Para a purificação da proteína recombinante, o precipitado de células foi suspenso em tampão B (8M uréia, 100mM NaH₂PO₄, 100mM Tris HCl pH8, solução em pH 8,0) e então mantido sob agitação por 1 hora a 60° C, agitando vigorosamente a cada 15 minutos. Em seguida foi adicionado RNase em uma concentração de 10 µg/ml. O lisado foi centrifugado a 12.000 X g por 30 minutos a 4° C e o sobrenadante foi separado. O sobrenadante foi colocado em contato com a resina Ni-NTA Agarose (Qiagen) previamente equilibrada e mantida sob agitação durante 1 hora a 4° C. Posteriormente, a coluna foi centrifugada a 700 X g por dois minutos até que o líquido passasse pela coluna e então reservado (*Flow Through*). Para a lavagem da resina foi adicionado tampão de lavagem (8M uréia, 100mM NaH₂PO₄, 100mM Tris HCl pH8, solução em pH 6,3) e então centrifugado novamente, sendo este procedimento repetido três vezes. Após as lavagens, a proteína foi eluída adicionando-se tampão de eluição (8M uréia, 100mM NaH₂PO₄, 100mM Tris HCl pH8, solução em pH 4,5) e então centrifugando, sendo este procedimento repetido cinco vezes. Para verificar o sucesso da purificação foi feita uma eletroforese em gel SDS PAGE12%.

2.9 SUBCLONAGEM E EXPRESSÃO DE UM FRAGMENTO DA PROTEÍNA CHAP1 DE *T. cruzi*

Para a subclonagem do fragmento do gene da *Tc*Chap1 (*Tc*Chap1Frag) primeiramente foi realizada a excisão do fragmento, a partir da construção pGEM_*Tc*Chap1, utilizando as enzimas de restrição *Bam*HI (Promega) e *Sma*I (BioLabs). A digestão ocorreu a 37 °C por 16

horas, segundo as especificações do fabricante. Assim como na excisão do fragmento, o vetor pQE32 foi digerido com as mesmas enzimas citadas e posteriormente, foi feita a ligação do fragmento ao vetor, utilizando a enzima T4 ligase (Promega) segundo as especificações do fabricante. O plasmídeo construído foi utilizado na transformação de bactérias *E. coli* da linhagem DH5 α utilizando-se o protocolo de choque térmico, assim, logo após o procedimento de choque, foi adicionado de meio SOC e mantido, durante 1 hora a 37 °C, sob agitação constante para o crescimento bacteriano. Posteriormente a suspensão celular foi plaqueada em meio LB sólido acrescido de antibiótico Ampicilina (100 μ g/ml). As colônias foram testadas para a presença da construção através de PCR de colônia com iniciadores direcionados ao vetor de expressão.

O plasmídeo pQE32-*TcChap1Frag* foi utilizado na transformação de células *E. coli* linhagem M15. Uma colônia foi utilizada para o preparo do pré-inóculo, o qual foi incubado durante 16 horas a 37°C. O inóculo foi preparado com uma proporção de 1:9 de pré-inóculo em meio LB acrescido de antibióticos (ampicilina 100 μ g/ml e kanamicina 15 μ g/ml), sendo então mantido sob agitação a 37 °C até que atingisse a DO 600nm de 0,5. Neste ponto foi adicionado 1 mM de IPTG para a indução da expressão gênica, e as culturas foram então mantidas por diferentes tempos (3, 6 e 12 horas) e temperaturas (15, 27 e 37 °C) para o teste de melhor condição de expressão. Após o tempo de incubação, as bactérias foram centrifugadas, acrescidas de PBS e resolvidas em eletroforese SDS-PAGE 12%.

Para verificar se o fragmento se encontrava na fração proteica solúvel ou insolúvel, após a expressão, as bactérias foram centrifugadas e lisadas por ultrassom (Ultrasonic Dismembrator, Fisher), sendo as frações proteicas resolvidas em eletroforese SDS-PAGE 12%. A expressão do fragmento proteico foi analisada posteriormente por *Western blot* conforme descrito anteriormente.

2.10 OBTENÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL ANTI-*TcCHAP1*

Para a geração do anticorpo policlonal foram imunizadas quatro fêmeas de camundongos da linhagem BALB/c, em quatro doses por via subcutânea com intervalo de 10 dias. Foi utilizado uma concentração de 50 μ g de proteína recombinante purificada em cada uma das imunizações. Na primeira imunização foi utilizada proteína emulsificada em adjuvante completo de Freund (v/v) (Sigma-Aldrich) enquanto nas outras aplicações foi utilizada a proteína misturada com Alu-Gel S (Hidróxido de alumínio 1,3%) (Serva). Durante o período

de imunização foi feita a verificação da geração de anticorpo através da metodologia de *Western blot* como descrito anteriormente, utilizando uma diluição do soro de 1:250. Depois de 10 dias da última imunização foi feita a punção cardíaca para a retirada do sangue para então fazer a separação do soro contendo os anticorpos.

2.11 ENSAIO DE ELISA PARA TITULAÇÃO DE SORO POLICLONAL CONTRA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Em placa de 96 poços foi feita a sensibilização com 200 µl contendo 50 ng de proteína recombinante por poço diluído em tampão carbonato, a 37 °C durante 3 horas. Foram feitas três lavagens utilizando 200 µl de PBS-Tween 0,05% e posteriormente o bloqueio incubando a placa com 300 µl de PBS-BSA 3% durante 16 horas a 4 °C. A placa foi lavada cinco vezes conforme descrito e então adicionado o soro diluído em PBS-BSA 3% em três concentrações: 1:100, 1:200 e 1:500 para um volume final de 100 µl, e a solução foi incubada durante uma 1 hora a 37 °C. Foi feita uma terceira lavagem e então incubado o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase, diluído 1:7.500 com PBS-BSA 3% durante 1 hora a 37 °C. Foi feita uma nova lavagem e então adicionado 100 µl solução substrato-cromógeno (TMB) e incubado cinco minutos no escuro. A reação foi parada com 50 µl de solução de parada e feita a leitura em equipamento Multileitora Infinite M200 TECAN localizado no LAMEB UFSC a 492 nm.

2.12 AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E SUBCLONAGEM DO GENE *TcChap1* PARA A SUPEREXPRESSÃO EM *T. cruzi*

Para a superexpressão da *Chap1* novos iniciadores foram desenhados com o programa Primer Select do pacote DNASTAR® (Lasergene). O gene *Chap1* foi amplificado através de PCR com os iniciadores específicos (*TcCHAP1_SE_F*: 5` TCT AGA ATG ATA ACC GAA AAA ATA ACA CG 3`; *TcCHAP1_SE_R*: 5` AAG CTT GAA TTC CAT TGG ACG GAA TGT GAG TG 3) a enzima *Taq* DNA polimerase em tampão próprio, dNTP em uma concentração de 0,2 mM e cloreto de magnésio em uma concentração de 1,5 mM. O produto de PCR foi verificado por eletroforese e então clonado no vetor pGEM-T easy® (Promega) segundo especificações do fabricante. O produto de ligação foi utilizado na transformação de *E. coli* eletrocompetentes DH5- α . As colônias positivas para a presença do plasmídeo com o

inserto, verificadas a partir de PCR diretamente das colônias, tiveram o plasmídeo extraído por lise alcalina (RUSSELL; SAMBROOK, 2001). O gene então foi subclonado no vetor pROCK mNeonGreen (pROCKmNG), utilizando as enzimas de restrição *XbaI* (Promega) e *HindIII* (Gibco). Tanto o inserto quanto o vetor foram digeridos com as enzimas para a posterior ligação de pontas coesivas mediante a ação da T4 DNA ligase (Promega). O produto de ligação foi utilizado na transformação de bactérias *E. coli* da linhagem DH5- α . As colônias foram submetidas a PCR como descrito anteriormente, utilizando iniciadores para o vetor e o inserto. As colônias com resultado positivo para a presença do gene foram submetidas a lise alcalina (RUSSELL; SAMBROOK, 2001) para a obtenção do plasmídeo. Foi realizado o sequenciamento das amostras para a verificação da correta inserção e fase de leitura do gene conforme metodologia descrita anteriormente. Após as análises de qualidade das amostras sequenciadas a confirmação da identidade da sequência obtida foi feita a partir do alinhamento utilizando o programa ClustalW.

2.13 TRANSFEÇÃO DO PLASMÍDEO pROCKmNG_*TcChap1* EM *T.cruzi*

Para a transfecção do plasmídeo construído para a superexpressão do gene *TcChap1*, foram separados 10^8 parasitos em fase exponencial de crescimento e lavados duas vezes utilizando PBS 1X. Os parasitos foram então suspensos em tampão BSF 1X contendo 10 μ g de DNA plasmidial e transferidos para uma cubeta de eletroporação (0,2 cm). A eletroporação foi realizada utilizando o equipamento Nucleofactor (Lonza) utilizando-se o programa X-014. Após o processo de eletroporação, os parasitos foram transferidos para meio ágar-sangue contendo 3 ml de meio LIT suplementado de 20% de Soro Bovino Fetal. Após 24 h de crescimento da cultura, foi adicionado o antibiótico de seleção (G-418) na concentração de 50 μ g/ml. Como controle, além dos parasitos selvagens, foram utilizados parasitos transfectados com o plasmídeo vazio e mantidos nas mesmas condições. A avaliação morfológica da cultura foi realizada a partir de esfregaços corados com Giemsa (Merck) e parasitos visualizados em microscópio de fluorescência (BX-40 – Olympus). Para a seleção de uma população com fluorescência homogênea foi utilizado o método de diluição limitante, onde foi utilizada câmara de Neubauer para determinar a quantidade de parasitos, e então em uma placa de 96 poços os parasitos foram diluídos até obter uma concentração de 0,5 parasitos por poço (em 200 μ l) em meio LIT.

2.14 CITOMETRIA DE FLUXO PARA QUANTIFICAÇÃO DA POPULAÇÃO MUTANTE

Formas epimastigotas transfectadas com o plasmídeo pROCKmNG_*TcChap1* (100 µl) foram diluídas em PBS pH 7,4 e colocados em tubos próprios para a leitura no equipamento (FACS Canto II, BD Bioscience) de acordo com instruções do fabricante. Foram adquiridos pelo menos 20.000 eventos com laser de argônio (488 nm) e filtros de emissão FITC (515-545 nm) e PerCP (670-735 nm). Os resultados obtidos foram analisados pelo programa FlowJo 10.0.7r2 (Tree Star).

2.15 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE À PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Inicialmente foram separados e adicionados em uma placa de 96 poços de fundo chato 5×10^5 parasitos em 100 µl de meio LIT das linhagens selvagem (cepa Y) e transfectados com o plasmídeo pROCKmNG_*TcChap1*. Foi preparado o peróxido de hidrogênio para uma concentração final de 58,02 mM em PBS estéril. Posteriormente, foi feita uma segunda diluição em meio LIT para a concentração final de 6 mM, sendo adicionado 100 µl da solução de peróxido na primeira coluna e então feita uma diluição seriada partindo da concentração de 3 mM até a concentração de 5,85 µM com um fator de diluição 2. O peróxido de hidrogênio foi então transferido para a placa de parasitos e então os parasitos em contato com o peróxido de hidrogênio foram incubados a 27 °C durante 72 horas. Para avaliar a sobrevivência dos parasitos foi adicionado Alamar Blue (ThermoFischer), reagente colorimétrico com propriedade redox, sendo que sua coloração se torna rosada na forma reduzida. Os parasitos foram incubados a 37 °C durante 4 horas. Foi realizada a leitura no equipamento Multileitora Infinite M200 TECAN no LAMEB UFSC com gain ótimo e ganho fixo, nos comprimentos de onda 530 e 590 nm.

2.16 DESENHO DOS RNAS GUIAS (SGRNA) PARA A DELEÇÃO DO GENE *TcChap1* PELO MÉTODO DE CRISPR-CAS9

O desenho dos sgRNAs foi feito a partir do *software Eukaryotic Pathogen CRISPR guide RNA/DNA Design Tool* (<http://grna.ctegd.uga.edu>) (TARLETON; PENG, 2015), no qual foram identificadas regiões para a clivagem tanto na porção 5' quanto na 3' do gene, visando a retirada do gene como um todo do genoma do parasito, utilizando-se a opção *SpCas9*

(sequência-alvo de 20 pb anterior a um site NGG PAM). O desenho das sequências doadoras foi realizado identificando-se os locais de clivagem e com base nisso, desenhado um braço de homologia de 30 nucleotídeos nas extremidades clivadas e uma sequência para amplificação dos genes de resistência a Puromicina e Blasticidina. Os sgRNAs e cassetes de reparo foram preparados segundo Costa e colaboradores (2018).

2.17 TRANSFEÇÃO DE *T. cruzi* COM O MIX DE DELEÇÃO PARA *TcChap1* (CASSETES DE TRANSCRIÇÃO SGRNA E HOMOLOGIA E O PLASMÍDEO COM A SEQUÊNCIA PARA A EXPRESSÃO DO GENE Cas9)

Para gerar os cassetes de transcrição dos sgRNA foram feitas PCR utilizando iniciador senso gene específico (*TcChap1_5sgRNA*: 5' GAA ATT AAT ACG ACT CAC TAT AGG ATG CAA TAT TGG AAA GGA ATC GGG GTT TTA GAG CTA GAA ATA GC 3' ou *TcChap1_3sgRNA* 5' GAA ATT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAA CGG ATT ACA CCT TCT GTG GGG TTT TAG AGC TAG AAA TAG C 3) combinados ao iniciador CRISPR antissenso (sgRNA scaffold) (CRISPRsgREV: 5' AAA AGC ACC GAC TCG GTG CCA CTT TTT CAA GTT GAT AAC GGA CTA GCC TTA TTT TAA CTT GCT ATT TCT AGC TCT AAA AC 3'). As reações foram realizadas com 2 µM dos iniciadores, 1 X GoTaq® Master Mix (Promega) em um volume final 20 µl. A amplificação ocorreu com a seguinte ciclagem: 30 segundos a 98 °C, seguido por 35 ciclos de 10 segundos a 98 °C, 30 segundos a 60 °C, 15 segundos a 72 °C em um termociclador *Verity* (*Applied Biosystems*).

Para amplificar os cassetes de reparo foram adicionados 30 ng do plasmídeo pTCBLAST ou do plasmídeo pTPURO_v1 (Figura 3), 2 µM dos iniciadores específicos (*TcChap1_UpFw* 5' CTG CTG TTG TTT CCC TTT ATC TCC ACA GAC GTA TAA TGC AGA CCT GCT GC 3' e *TcChap1_DownRev*: 5' TGA ATT AAG TTC GTT AAC TCT CCT CTG CGA TCC AAT TTG AGA GAC CTG TGC 3') e 3% (v/v) de DMSO ao 1X GoTaq® Master Mix (Promega), em 40 µl de volume total. Os ciclos de amplificação ocorreram a seguinte forma: cinco minutos a 98° C, seguidos por 40 ciclos de 30 segundos a 98° C, 30 segundos a 65° C, dois minutos a 72° C, seguidos por um passo final de 7 minutos a 72° C.

Para transfecção, os cassetes de transcrição dos sgrNA e os cassetes de reparo foram misturados (20 µl por cassetes de transcrição dos sgrNA e 40 µl de cassetes de reparo usando os volumes de reação padrão acima). O DNA foi purificado usando o kit PCR *Clean-up and Gel Extraction kit* (*Macherey-Nagel*) e eluído em 40 µl de água livre de nucleases. Um total de

10^8 parasitos foram transfectados em cubetas de 0,2 cm usando o programa X-014 em aparelho Nucleofector® (Lonza) com 40 μ l de mistura de DNA (sgRNAs e cassetes de reparo), 5 μ l do plasmídeo pLEWCas9 (Figura 4) (400 ng/ μ l) e 200 μ l de tampão Tb-BSF, perfazendo um volume final de 250 μ l. Após a nucleofecção, os parasitos foram transferidos para tubos contendo 5 ml de meio NNN-LIT 20% SBF e incubados por 16 horas a 27 °C. Os agentes seletivos foram adicionados após 24 horas (puromicina, 0,166 μ g/ml; blasticidina, 0,2 μ g/ml), sendo as concentrações das drogas aumentadas semanalmente até a concentração final de puromicina, 2 μ g/ml; blasticidina, 4 μ g/ml.

Figura 3: Representação dos plasmídeos contendo os genes de resistência a Blasticidina e Puromicina. A) pTCBLAST; B) pTPURO_v1. Fonte: (COSTA et al., 2018)

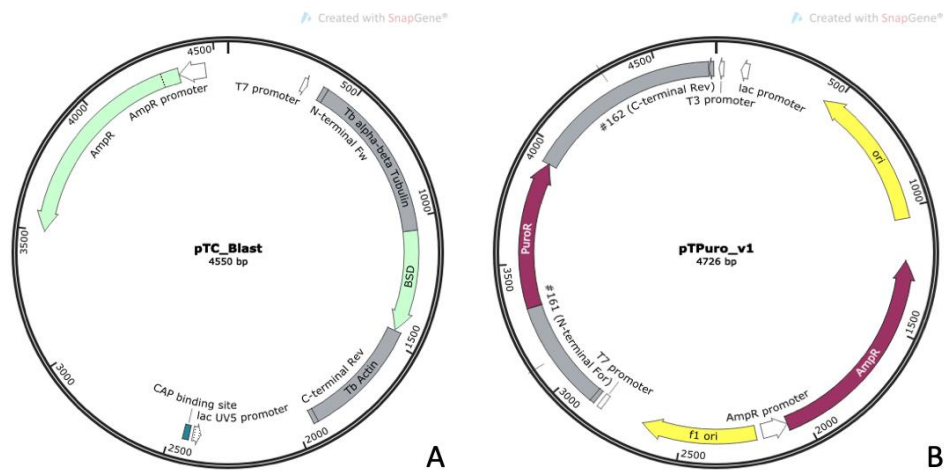
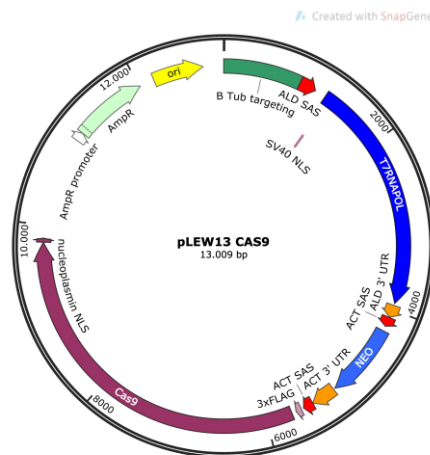


Figura 4 . Representação do plasmídeo pLEWCas9. Fonte: (COSTA et al., 2018).



2.18 VERIFICAÇÃO DA DELEÇÃO DO GENE *TcChap1*

Os parasitos transfectados foram coletados por centrifugação e após extração de DNA foi realizada uma PCR utilizando iniciadores específicos para o gene (*TcCHAP1F*: 5' GCG GCC GCT ATG ATA ACC GAA AAA ATA ACA CG 3' e *TcCHAP1R*: 5' GAG CTC CAT TGG ACG GAA TGT GAG TG 3') em reação de PCR contendo: 50 ng do DNA total de *T. cruzi*, 10 pmol de cada um dos iniciadores, 200 µM de dNTP, 1 unidade de GoTaq® *Master Mix* (Promega) em seu tampão apropriado em um volume final de 10 µl. A amplificação ocorreu com uma ciclagem que inclui uma etapa de desnaturação do DNA a 94 °C durante três minutos, 35 ciclos com as etapas de desnaturação (92 °C por 30 segundos), ligação dos iniciadores a sequência alvo (60 °C, por 30 segundos) e alongamento da cadeia de DNA pela polimerase (72 °C por 1 minuto), sendo estes passos realizados em um termociclador *Verity* (*Applied Biosystems*). Os produtos de PCR foram resolvidos por eletroforese em géis de agarose 1% corados por brometo de etídio (1 µg/ml). Para tentativa de visualização de alguma mudança morfológica, os parasitos foram coletados 30 dias após a transfecção, fixados, corados com Giemsa e visualizados em microscópio óptico.

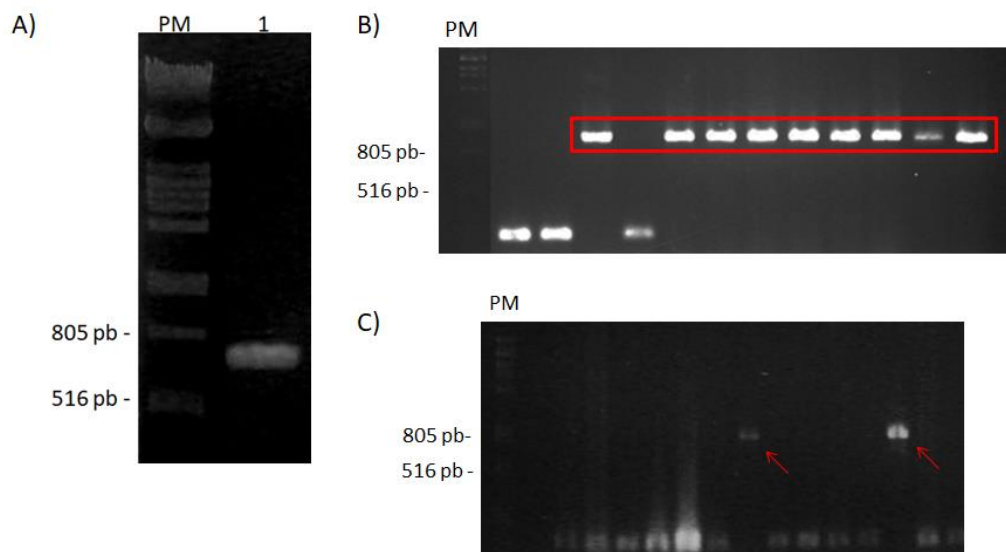
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 EXPRESSÃO HETERÓLOGA E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA CHAP1 DE *Trypanosoma cruzi*

A PCR para a amplificação do gene foi inicialmente testada com as concentrações de 10, 30 e 50 ug de DNA total extraído da cepa Y de *T. cruzi*. Nessas três condições não foi observada nenhuma diferença nos produtos de amplificação, sendo adotado desse momento em diante, a concentração de 30 ug de DNA total. A amplificação do gene, utilizando os iniciadores *TcCHAP1_F* e *TcCHAP1_R* apresentou uma banda única, com o tamanho compatível com as análises *in silico* de 711 pares de base (Figura 5A). O produto de amplificação foi purificado e utilizado em uma reação de ligação com o plasmídeo de clonagem pGEM-T easy®. Para confirmação das colônias positivas para o inserto foi realizado uma PCR diretamente das colônias. Foram identificadas algumas colônias apresentando um fragmento de DNA um pouco maior que o tamanho do gene da *TcChap1*, indicando a presença do inserto no plasmídeo (Figura 5B). Posteriormente foi realizada a subclonagem no vetor pET-47b sendo possível

observar na figura 5C o resultado da PCR no qual visualiza-se duas colônias positivas para o inserto.

Figura 5: Amplificação, clonagem e subclonagem do gene *Chap1* de *T. cruzi*. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. PM - padrão de peso molecular (Fago lambda digerido com a enzima *PstI*); A) Produto de amplificação do gene *Chap1* da cepa Y de *T. cruzi* (1); B) Produto de amplificação de PCR das colônias crescidas a partir da ligação do gene no vetor de clonagem pGEM-T-easy. O quadro vermelho indica as amostras positivas.; C) Produtos de amplificação da PCR das colônias referentes ao processo de subclonagem da *Chap1* no vetor de expressão pET-47b. As setas indicam amostras positivas.



O plasmídeo resultante *TcChap1_pET47b* foi sequenciado, sendo que sequência obtida confirmou a identidade e a correta inserção do gene. A sequência obtida (cepa Y) foi alinhada com o gene *Chap1* disponível no banco de dados para as cepas CL Brener e Dm28C, obtendo-se muita semelhança, apresentando 14 nucleotídeos distintos ao longo da sequência e sem a presença de gaps (Figura 6A). Em relação as sequências aminoacídicas inferidas a partir das sequências nucleotídicas (Figura 6B), o alinhamento indicou 7 aminoácidos distintos, sendo que desses, 5 aminoácidos são considerados conservados. Com esses dados, infere-se que o gene é altamente conservado na espécie.

Figura 6: Alinhamento das sequências nucleotídicas e aminoacídicas de *TcCHAP1*. A) Alinhamento da sequência nucleotídica do gene *Chap1* das cepas Dm28C, CL Brener e Y de *Trypanosma cruzi*. Em amarelo destaca-se os nucleotídeos que não se repetem nas sequências. B) Alinhamento da sequência aminoacídica da proteína

*Tc*CHAP1 das cepas Dm28C, CL Brener e Y. Em amarelo está identificada a sequência que corresponde ao possível peptídeo sinal da proteína e em laranja a região que corresponde ao domínio CHAP. Os asteriscos (*) correspondem a nucleotídeos ou aminoácidos idênticos na mesma posição do alinhamento e o símbolo (:) indica aminoácidos conservados.



Com a construção do plasmídeo de expressão concluída, a próxima etapa foi a expressão heteróloga da proteína *Tc*CHAP1. Foi induzida a expressão da proteína em bactérias *E. coli* da linhagem BL21 (DE3) em diferentes condições e então o extrato proteico total das bactérias foi resolvido por gel SDS-PAGE. Uma banda de maior intensidade entre 25 e 30 kDa foi observada, o que corrobora com as análises *in silico* que indicam um peso molecular de 27 kDa (Figura 7A). Para a confirmação da expressão, foi realizado um Western blot direcionado a cauda de histidinas adicionada pelo plasmídeo, apresentando bandas novamente com o peso molecular esperado, confirmando a expressão da proteína de interesse (Figura 7B). Foi feita

uma tentativa de purificar tanto a proteína na sua forma nativa, quanto a partir da fração proteica insolúvel das bactérias (desnaturada) para prosseguir paralelamente com ensaios enzimáticos e obtenção de anticorpo policlonal para a proteína *Tc*CHAP1. Como resultado da purificação a partir da fração insolúvel foi obtido uma proteína do tamanho esperado, porém também houve a detecção no gel de bandas de tamanho menor, indicando degradação parcial da proteína (Figura 8). A proteína purificada foi utilizada na imunização de camundongos Balb-C, mas o soro obtido apresentou um título de anticorpos muito baixos, não mostrando ser reativo no ensaio de ELISA (Dados não mostrados).

Figura 7: Expressão heteróloga da proteína *Tc*CHAP1 e a confirmação por Western Blot. A) Gel SDS-PAGE 12% da expressão heteróloga da proteína *Tc*CHAP1 em células *E. coli* BL21(DE3) realizada em diferentes tempos e temperaturas; PM- Peso Molecular (Precision Plus Protein Dual Color Standard, BioRad®); B) *Western Blot* para detecção de cauda de histidinas na proteína expressa *Tc*CHAP1 nas condições de 27°C/12h e 37°C/6h.

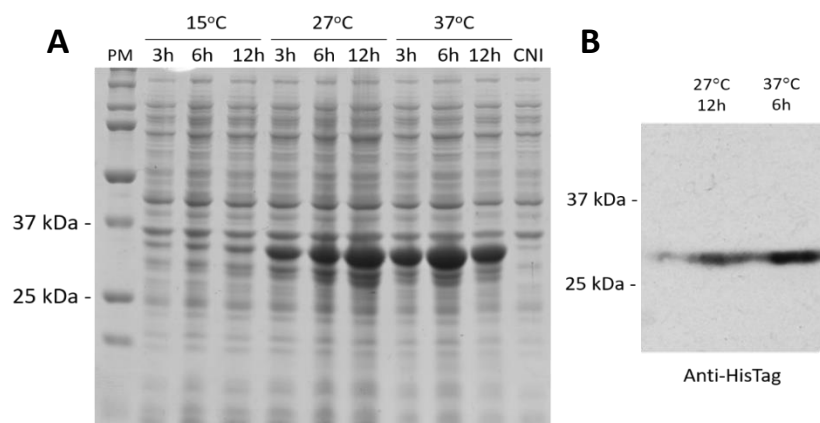
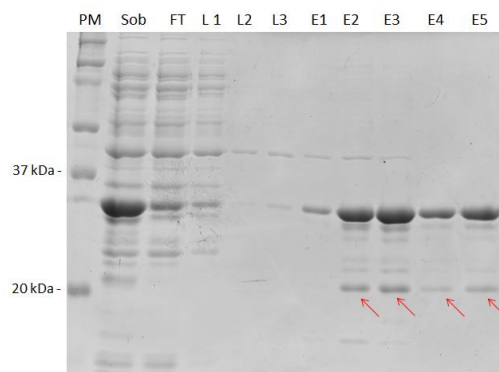


Figura 8: Purificação da proteína *Tc*CHAP1. Gel SDS-PAGE 12%, com amostras de purificação da *Tc*CHAP1a partir da fração insolúvel do extrato proteico bacteriano. PM: Padrão de peso molecular (*Precision Plus Protein Dual Color Standards, BioRad*); Sob: Sobrenadante; FT: *Throw* (Porção proteica não ligante a resina); L1: Primeira lavagem; L2: Segunda lavagem; L3: Terceira lavagem; E1: Primeira eluição; E2: Segunda eluição; E3: Terceira eluição; E4: Quarta eluição; E5: Quinta eluição. As setas indicam bandas de tamanho menor do que o esperado.



Para a avaliação da atividade enzimática da proteína se faz necessária a purificação da proteína contida na fração solúvel do extrato proteico, uma vez que é na fração solúvel que se encontra a proteína na sua forma nativa, ou seja, dobrada corretamente e capaz de desempenhar atividade catalítica se verdadeira. A expressão da *TcCHAP1* ocorreu na fração solúvel como pode ser observado na figura 9A, inclusive confirmado por *Western blot* (Figura 9B). No entanto, a tentativa de purificação da forma nativa da proteína demonstrou a presença de inúmeros contaminantes nas eluições e um rendimento muito baixo de purificação da proteína de interesse (Figura 10), sendo impossível seguir com os ensaios de atividade.

Uma vez que foi observado uma grande quantidade de proteína presente na fração insolúvel do extrato proteico, infere-se que o fracasso da expressão de seu por conta da incapacidade das células de fazer o correto dobramento da proteína. A expressão heteróloga é um processo de superexpressão de uma proteína em um organismo distinto, nesse caso por exemplo, a expressão de uma proteína existente no genoma de *T. cruzi* sendo expressa em bactérias *E. coli*, sendo assim, quando há a expressão em condições divergentes de pH, osmolaridade e pela intensa produção proteica ocorre o favorecimento das interações das regiões hidrofóbicas, desencadeando a formação de corpos de inclusão, isto é, a formação de acúmulo de proteínas na sua forma desnaturada, sendo que a maioria das proteínas se encontram nessa forma, enquanto as proteínas na forma nativa estão ausentes ou em quantidades mínimas (CARRIÓ; VILLAVERDE, 2002; HARRISON, 2000).

Figura 9: Expressão heteróloga da *TcCHAP1* em células *E. coli* BL21 (DE3). A) Gel SDS-PAGE 10% com amostras de extrato solúvel de proteínas após a indução da expressão heteróloga da *TcCHAP1*. PM: Peso molecular (*Precision Plus Protein Dual Color Standards, BioRad*); 1: Expressão induzida a 27°C durante 12h; 2: Expressão induzida a 37°C durante 6h. B) Ensaio de *Western blot* da expressão induzida a 37 °C durante 6h, utilizando anticorpo primário anti-cauda de histidinas

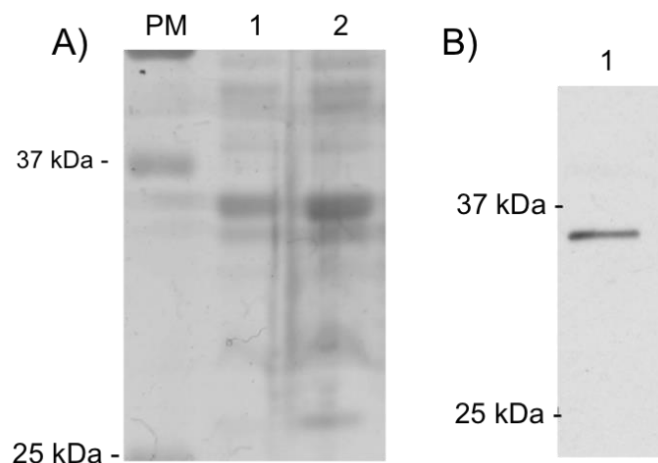
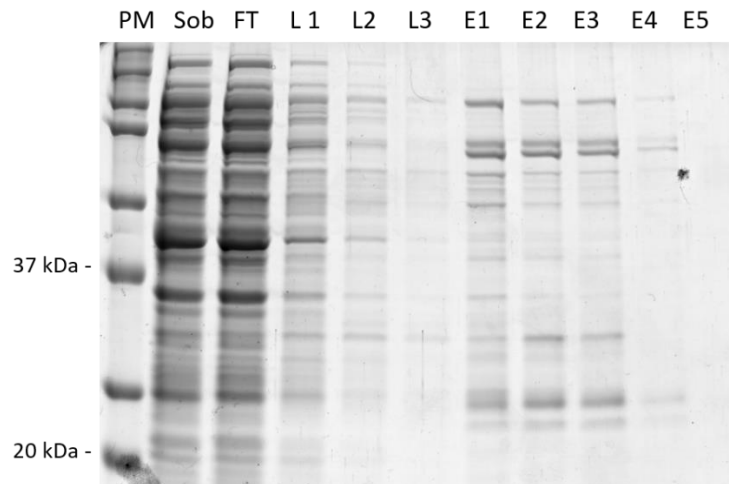


Figura 10: Purificação da proteína *TcCHAP1* a partir da fração solúvel do extrato proteico bacteriano. Gel SDS-PAGE 12% contendo amostras do processo de da *TcCHAP1*. PM: Peso molecular (*Precision Plus Protein Dual Color Standards, BioRad*); Sob: Sobrenadante; FT: *Flow-through* (Porção proteica não ligante a resina); L1: Primeira lavagem; L2: Segunda lavagem; L3: Terceira lavagem; E1: Primeira eluição; E2: Segunda eluição; E3: Terceira eluição; E4: Quarta eluição; E5: Quinta eluição.



O sistema escolhido para a expressão proteica utiliza bactérias *E. coli* em associação com a utilização de causa de histidina para facilitar a purificação posteriormente, por ser um sistema de simples utilização em relação a sistemas eucarióticos. Apesar disso, o sistema apresenta certa ineficiência ao produzir proteínas que estejam disponíveis na sua fração solúvel, principalmente quando se trata de proteínas de origem eucariótica (HARRISON, 2000; TAKHAR-LAIL; GHORBANI, 2014). É descrito na literatura alternativas para a renaturação de proteínas presentes na fração insolúvel, utilizando denaturantes como ureia e guanidina e agentes edutores como β -mercaptoetanol (SINGH; PANDA, 2005), porém, mesmo com o processo de renaturação, o rendimento de proteínas recuperadas por essa técnica é extremamente baixa, sendo mais interessante investir na otimização da expressão proteica em condições que favoreçam o correto dobramento da proteína (HARRISON, 2000). A partir disso foi pensado em algumas estratégias para otimizar a produção de proteína na forma nativa. Foi utilizado um protocolo com a adição de álcool benzílico durante a expressão heteróloga. O álcool benzílico é um reagente inorgânico com capacidade de induzir a atividade de chaperonas nativas para o correto dobramento de proteínas recém sintetizadas (DE MARCO et al., 2005), porém foi novamente observado um rendimento insuficiente para seguir com os ensaios de atividade catalítica, apesar da visualização da banda de tamanho esperado no *Western blot* em uma das condições testadas (Figura 11). Outra estratégia para otimização da expressão foi a

utilização de outra linhagem bacteriana, a Rosetta-gamiTM (DE3) pLysS (Novagen), linhagem que possui modificações genéticas que permitem a expressão de códons usados raramente em bactérias *E. coli* e possui também mutações nos genes de tiorredoxina redutase e glutathione redutase permitindo a melhor formação de ligações dissulfeto no citoplasma e assim permitindo um melhor dobramento de proteínas (ZARKAR et al., 2020). No ensaio de *Western blot* pode-se observar a ausência de expressão heteróloga da proteína de interesse (Figura 12). Este rendimento pode ter ocorrido uma vez que a linhagem celular utiliza de resistência ao antibiótico kanamicina para manter os aprimoramentos celulares, a mesma resistência requerida pelo vetor de expressão da *TcCHAP1* sendo esse um fator complicador para o controle da permanência do vetor nas bactérias.

Figura 11: Expressão heteróloga da *TcCHAP1* em células *E. coli* BL21 (DE3) utilizando a adição de álcool benzílico. A) Gel SDS-PAGE 10% com amostras de extrato solúvel de proteínas após a indução da expressão heteróloga. PM: Padrão de Peso molecular (*Precision Plus Protein Dual Color standards, BioRad*); B) Ensaio de *Western blot* de amostras de extrato solúvel proteico após a indução da expressão heteróloga da *TcCHAP1*, utilizando anticorpo primário anti-cauda de histidinas. 1: Amostra mantida a 4°C durante 3 dias sem adição de álcool benzílico; 2: Amostra mantida a 15°C durante 12h adicionado de 10mM de álcool benzílico; 3: Amostra mantida a 27 °C durante 3 horas adicionado de 10mM de álcool benzílico.

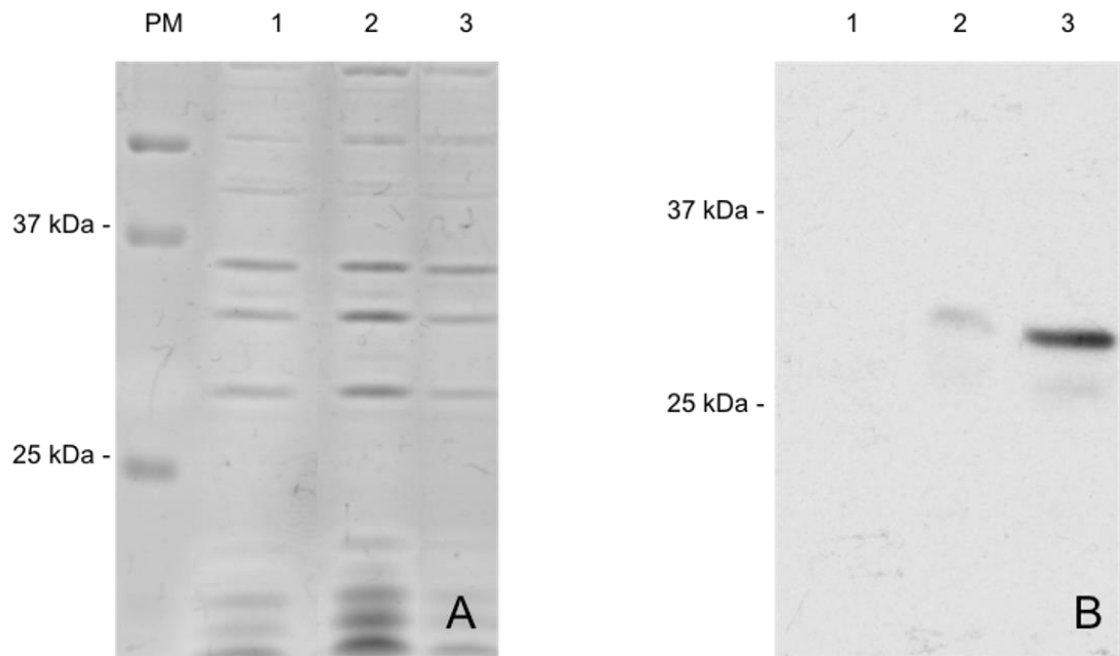
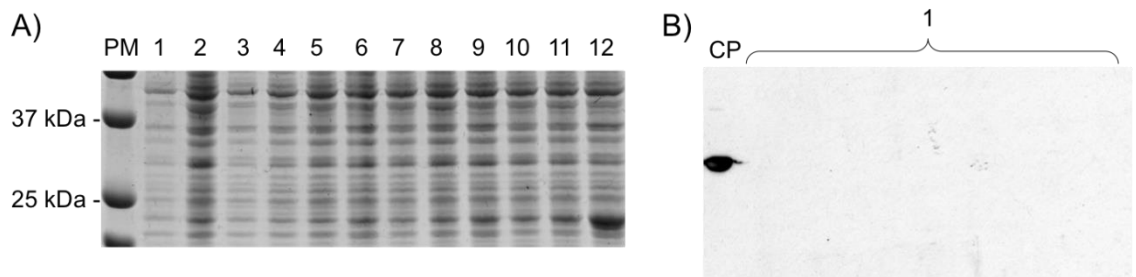


Figura 12: Expressão heteróloga da *TcCHAP1* em bactérias *E. coli* linhagem Rosetta-gami A) Gel SDS-PAGE 10% com amostras de extrato total de proteínas após a indução da em diferentes tempos de incubação. PM: Padrão de Peso molecular (*Precision Plus Protein Dual Color Standards, BioRad*); 1: Controle não induzido pET47b; 2: pET47 sem o inserto; 3: Controle não induzido; 4: 15°C/3h; 5: 27°C/3h; 6: 37°C/3h; 7: 15°C/6h; 8: 27°C/6h; 9: 37°C/6h; 10: 15°C/12h; 11: 27°C/12h; 12: 37°C/12h; B) Ensaio de Western blot das mesmas amostras utilizando anticorpo primário anti-cauda de histidina. CP: Controle positivo (proteína recombinante com cauda de histidinas);



Como citado anteriormente, a *TcCHAP1* foi purificada a partir da fração insolúvel e utilizada na tentativa para a produção de anticorpo policlonal, porém não se obteve sucesso uma vez que a titulação de anticorpos se mostrou muito baixa, apresentando nenhum tipo de marcação nos ensaios de *Western blot* e ELISA. Uma nova estratégia foi delineada para a produção e imunização dos camundongos com apenas um fragmento proteico da *TcCHAP1* (Figura 13). Foi construído um plasmídeo de expressão (pQE32_*TcChap1Frag*), contendo um fragmento de 276 pares de base do gene *Chap1* correspondendo um fragmento proteico de 10,7 kDa (92 aminoácidos). Durante o processo de construção deste plasmídeo, o vetor de clonagem contendo o gene *TcChap1* completo (pGEM_*TcChap1*) foi submetido a digestão enzimática gerando 3 fragmentos visíveis em gel de eletroforese (Figura 14). O fragmento correspondente a 276 pares de base foi excisado e ligado ao plasmídeo pQE32. O produto de ligação foi utilizado na transformação de bactérias, e então verificado a presença do plasmídeo através de PCR de colônia, resultando em um fragmento de DNA de 430 pares de base aproximadamente relativos a presença do inserto (276 pb) mais o vetor (157pb), enquanto as negativas apresentaram aproximadamente 157 pares de base (Figura 14B). A fase de leitura do gene foi conferida por sequenciamento e posteriormente o alinhamento da sequência obtida com a sequência predita mostrou correta inserção e fase de leitura.

Figura 13: Representação gráfica do gene *TcChap1* e da região utilizada para a subclonagem e produção do fragmento proteico (em azul). Os sítios para as enzimas *Bam*HI e *Sma*I ao longo do gene estão representados.

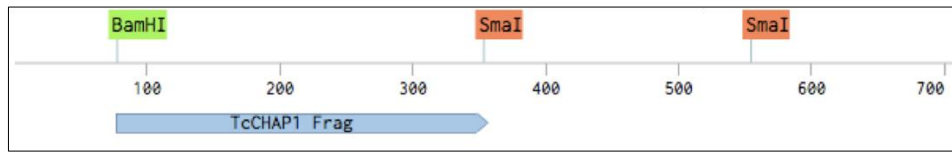
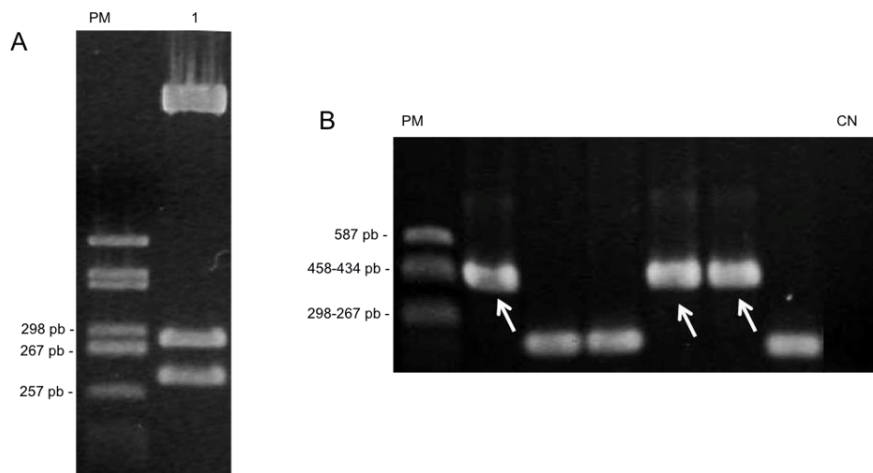


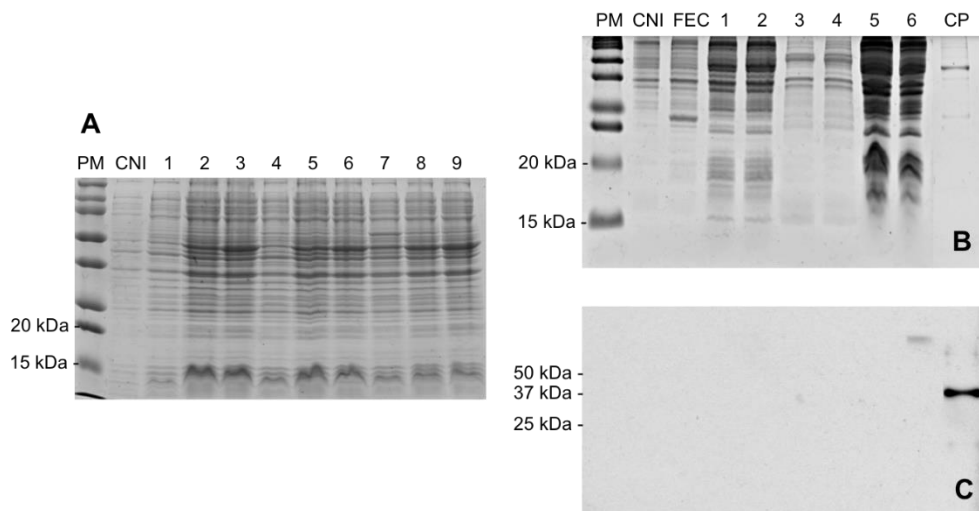
Figura 14: Subclonagem do fragmento do gene *TcChap1*. A) Gel de agarose 2% contendo amostra da digestão da construção pGEM-*TcCHAP1*, com as enzimas *Bam*HI e *Sma*I. PM: Padrão Peso molecular Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad); B) Gel de agarose 1% contendo amostras de PCR das colônias obtidas. As setas indicam amostras positivas. CN: Controle negativo da reação de PCR.



Foi induzida a expressão em bactérias *E. coli* da linhagem M15 do fragmento em diferentes condições e após eletroforese em gel SDS-PAGE foi verificada uma aparente expressão do fragmento, sendo observadas bandas de um tamanho aproximado de 13 kDa (Figura 15A), tamanho esperado para o fragmento proteico. A partir desse resultado foram escolhidas as condições de 3 horas a 27 °C e 6 horas a 27 °C que apresentaram maior quantidade de proteínas. Foram utilizadas destas condições para realizar novamente a expressão desse fragmento, e foram separadas as frações solúvel e insolúvel de proteínas das bactérias. As proteínas foram então resolvidas em SDS-PAGE 12% (Figura 15B) e então realizado o ensaio de *Western blot* para a detecção da cauda de histidinas (Figura 15C). Foi observada a ausência do fragmento proteico em ambas as frações testadas e ambas as condições de expressão, sendo então necessária a otimização de expressão do fragmento para definir as melhores condições de expressão. É relatado na literatura que a ausência ou a pouca expressão proteica pode ser influenciada pela estabilidade do plasmídeo utilizado. Essa instabilidade do plasmídeo pode ser afetada pela concentração de IPTG utilizada, que se for muito alta pode aumentar a quantidade

de ácido acético na célula, ou ainda pela própria expressão proteica que pode promover uma pressão metabólica na célula, assim afetando a estabilidade do plasmídeo e por consequência afetando o rendimento da produção de proteína. Foi observado tal fenômeno em células M15 utilizando o plasmídeo PQE-30, assim como em bactérias *E. coli* da linhagem BL21 (DE3) utilizando-se do plasmídeo pET30a (MARISCH et al., 2013; RIBEIRO et al., 2019). Além disso, há registros de que há um baixo rendimento na expressão heteróloga de pequenas proteínas, geralmente utilizando-se *tags* para facilitar a expressão e purificação de pequenos fragmentos proteicos (BAO et al., 2006; PACESA et al., 2017).

Figura 15: Expressão heteróloga do fragmento de *Tc*CHAP1 em células *E. coli* M15. A) Gel SDS-PAGE 12% com amostras de extrato total de proteínas após a indução da expressão em diferentes condições. PM: Padrão de Peso molecular Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad); CNI: Controle não induzido; Amostras induzidas em diferentes condições: 1- 3h/15 °C; 2- 3h/27 °C; 3- 3h/37 °C; 4- 6h/15 °C; 5- 6h/27 °C; 6- 6h/37 °C; 7- 12h/15 °C; 8- 12h/27 °C; 9- 12h/37 °C; B) Gel SDS-PAGE 12% com amostras de extrato solúvel e insolúvel de proteínas após a indução da expressão em diferentes condições. FEC: Controle de indução com o plasmídeo sem o inserto; 1 e 2- Extrato proteico total das condições 3h/37 °C e 6h/ 27 °C; 3 e 4- Fração solúvel das condições 3h/37 °C e 6h/ 27 °C; 5 e 6- Fração insolúvel das condições 3h/37 °C e 6h/ 27 °C. CP: Controle positivo; C) Ensaio de *Western blot* das amostras referentes ao gel B, utilizando anticorpo primário anti-cauda de histidinas.

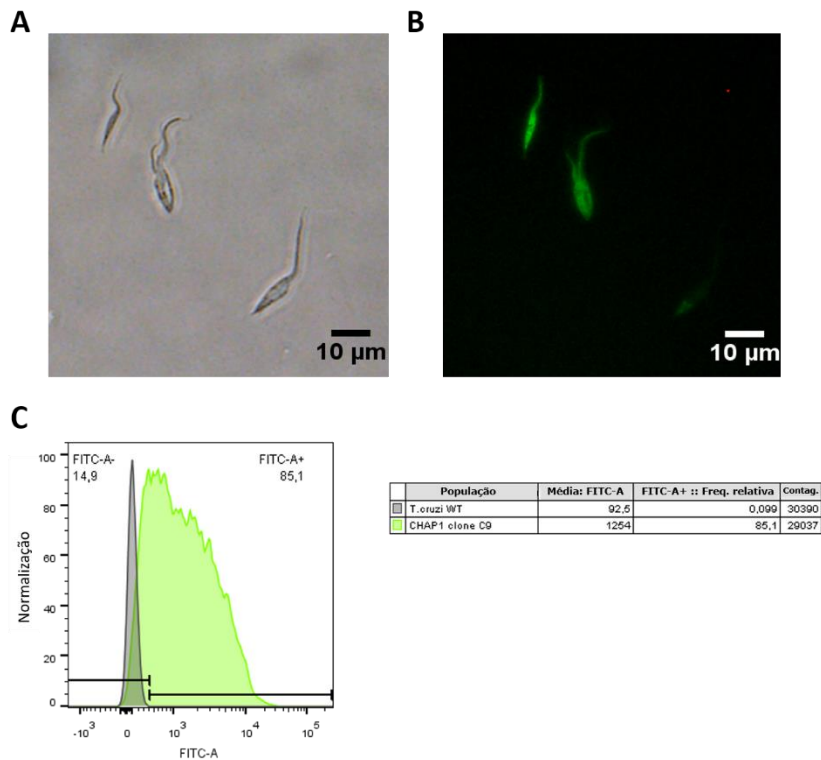


3.2 SUPEREXPRESSÃO DA PROTEÍNA CHAP1 EM *Trypanosoma cruzi*

Para a produção dos parasitos superexpressando a *Tc*CHAP1, denominados de *TcChap1+* foi construído um plasmídeo de expressão utilizando o vetor pROCK_mNeonGreen (pROCK_mNG) como base. O gene foi amplificado com os iniciadores específicos para esta clonagem e pode-se observar um produto de PCR com tamanho aproximado de 711 pares de

Foi estabelecida uma concentração ótima de antibiótico de 1.000 ug/ml, através do aumento gradativo da concentração de antibiótico e a observação da sobrevivência dos parasitos e a intensidade de fluorescência. Depois de alguns meses já se pode observar parasitos com coloração verde fluorescente significativa, indicando fortemente a presença do plasmídeo (Figura 17). A população obtida se encontrava heterogênea, podendo-se observar parasitos com maior e menor intensidade de fluorescência, o que pode ser devido a não integração do plasmídeo no genoma em todas as células da cultura celular, sendo assim é possível que a cultura apresentava parasitos com o plasmídeo de maneira episomal enquanto outros, com maior intensidade de fluorescência apresentavam o plasmídeo integrado ao genoma no *locus* do gene de β -tubulina (DAROCHA et al., 2004). Outro trabalho também registra a heterogeneidade de fluorescência em populações transfectadas, utilizando o vetor pROCKGFPNeo, onde observou-se que a população de parasitos transfectados não apresentavam 100% dos parasitos fluorescentes, e mesmo após a clonagem de parasitos de coloração verde, a população que se tornou 100% fluorescente, depois de meses voltou a se tornar heterogênea. Foi levantada algumas hipóteses para esse evento como a concentração de antibiótico que pode ser suficiente para manter o plasmídeo, mas insuficiente para a expressão significativa da proteína exógena, ou ainda a translocação da construção para *loci* de regiões não codificantes do genoma dos parasitos, podendo assim inferir a instabilidade de populações transfectadas e a necessidade de manter a pressão de seleção (PIRES, 2007). Para conseguir uma população mais homogênea em termos de fluorescência foi feita uma diluição limitante na tentativa de obter apenas um parasito por poço. Conseguimos obter duas culturas de parasitos viáveis e mais homogêneas, com 85% dos parasitos sendo fluorescentes, embora ainda apresentem variação na intensidade da fluorescência como pode ser visualizado nos resultados da citometria de fluxo (Figura 17C).

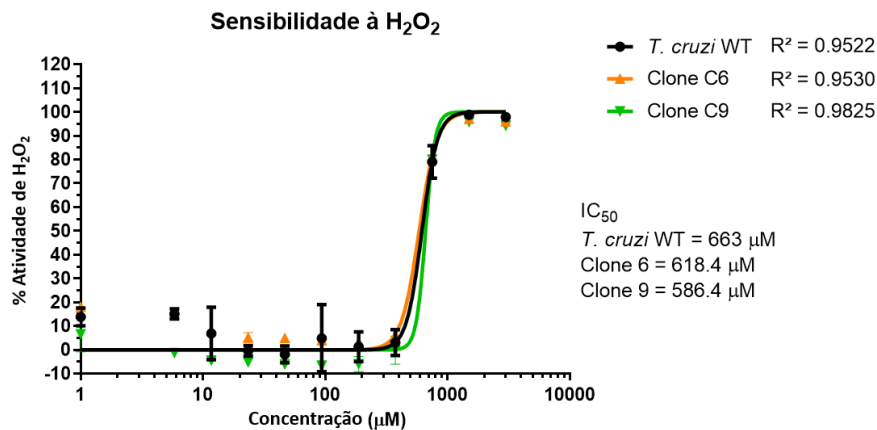
Figura 17: Avaliação da fluorescência do *T. cruzi* Y superexpressando a proteína *TcCHAP1*. A e B) Avaliação dos parasitos por microscopia de fluorescência. C) Citometria de fluxo



Para analisar o efeito de estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio nos parasitos que superexpressam a *TcCHAP1* foi realizado um experimento de desafio com diferentes concentrações do reagente (Figura 18). Foi observado que não houve diferença na resistência entre os parasitos mutantes (clones 6 e 9) e os parasitos selvagens, sugerindo que a *TcCHAP1* não atua diretamente no sistema antioxidante desses parasitos na sua forma epimastigota. Estudos mostram que o estresse oxidativo atua na proliferação de epimastigotas de *T. cruzi*, induzindo a inibição de moléculas redutoras durante a proliferação e sendo necessária uma sinalização oxidativa para a promoção da proliferação de epimastigotas. Além disso, há evidências de que há uma regulação positiva de proteínas do sistema antioxidante como a TryS em tripomastigotas se comparado aos parasitos na forma epimastigota, sugerindo um ambiente oxidativo para a proliferação e reduzido para a diferenciação (DE ALMEIDA NOGUEIRA et al., 2011; NOGUEIRA et al., 2015). Os resultados obtidos aqui confirmam que a *TcCHAP1* não deve estar envolvida na manutenção de ROS gerado de forma extrínseca no citoplasma da célula. No entanto, são necessários mais estudos para observar se a *TcCHAP1* está envolvida na manutenção das flutuações necessárias de ROS gerado de forma intrínseca,

através dos processos mitocondriais, que por sua vez pode estar envolvido na proliferação de epimastigotas (NOGUEIRA et al., 2017).

Figura 18: Ensaio de sensibilidade de *T. cruzi* superexpressando a *TcCHAP1* ao estresse oxidativo induzido por diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio. *T. cruzi* WT: parasitos selvagens; clone 6 e clone 9: culturas de parasitos superexpressando a *TcCHAP1*. IC₅₀: Concentração de H₂O₂ necessária para matar 50% dos parasitos

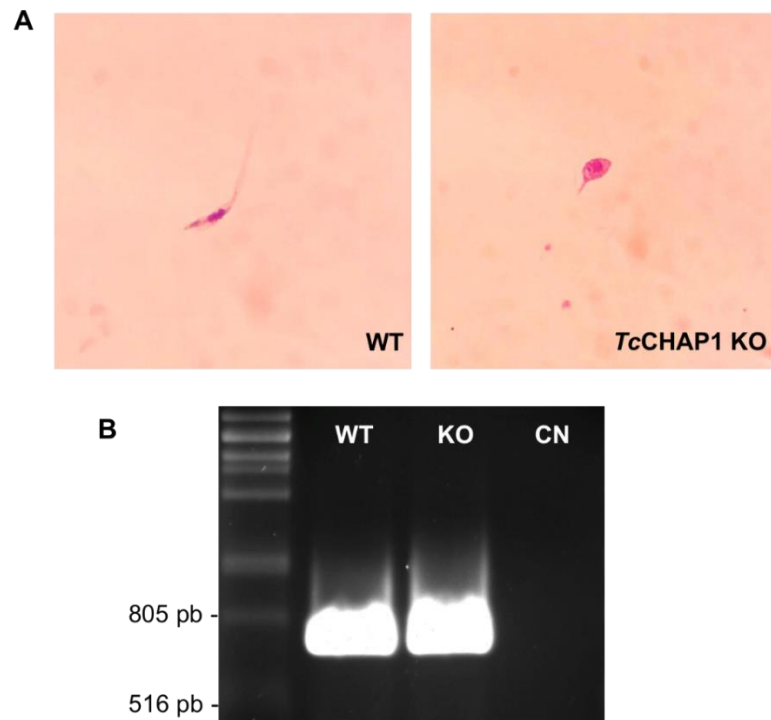


3.3 DELEÇÃO DO GENE *Chap1* DE *T. cruzi*

Para a geração dos parasitos com a deleção do gene *TcChap1*, denominados de *TcChap1*, foi utilizada a metodologia de CRISPR-Cas9. Para essa metodologia foram utilizados dois DNAs moldes para gerar dois RNAs guia (sgRNA), dois cassetes de reparo contendo regiões de homologia as UTRs do gene de interesse, cada um deles contendo uma resistência a antibióticos diferentes (Blasticidina e Puromicina) e um plasmídeo contendo a sequência codificante para *spCas9* e para T7 RNA polimerase para possibilitar a transcrição dos sgRNA. Assim, foram desenhados iniciadores para a região 5' (*TcChap1_5sgRNA*) e para a região 3' (*TcChap1_3sgRNA*) do gene que codifica para *TcCHAP1* referentes aos dois sgRNAs, bem como iniciadores para a amplificação da região de homologia para os cassetes de reparo, antes e depois das regiões de clivagem com aproximadamente 30 nucleotídeos, gerando então os iniciadores *TcChap1_UpFw* e *TcChap1_DownRev* para as regiões 5' e 3' do gene respectivamente. Após a transfecção dos parasitos e um mês em processo de seleção sob uma pressão dos antibióticos Blasticidina (10 µg/ml) e Puromicina (5 µg/ml) foi possível observar que uma baixa quantidade de parasitos em relação aos parasitos do controle, além de apresentarem uma morfologia alterada com células mais arredondadas (Figura 19A). No

entanto, é possível observar no resultado da PCR que não houve a deleção do gene (Figura 19B), uma vez que a deleção pode ter acontecido em apenas um alelo, podendo inferir uma essencialidade do gene para essa forma do parasito (PONTES, 2020). Assim é possível afirmar que não houve deleção do gene assim como pode-se observar possível interferência da presença de antibióticos na cultura na sobrevivência dos parasitos analisados.

Figura 19: Análise do fenotípica e genotípica dos parasitos após a transfecção para a deleção do gene que codifica para *TcCHAP1*. A) *T. cruzi* da cepa Y corados com Giemsa em aumento de 1.000X; WT: selvagem; *TcCHAP1* KO: transfectados com o mix de deleção; B) Gel de agarose 1% do resultado da amplificação por PCR do gene que codifica para *TcChap1* nos parasitos selvagens (WT) e transfectados com o mix de deleção (KO). Controle negativo da reação (CN).



4 CONCLUSÃO

A construção do vetor para a expressão heteróloga da proteína *TcCHAP1* foi realizada, assim como obteve-se sucesso ao expressar a proteína, porém foi possível purificá-la apenas a partir da fração insolúvel do extrato proteico. A proteína purificada da fração insolúvel não foi imunogênica e, portanto, não foi possível produzir anticorpo policlonal. Após tentativas de otimizar a expressão de proteína corretamente dobrada, ainda assim não foi possível obtê-la na fração solúvel do extrato proteico. Foi construído um vetor para a expressão heteróloga de um fragmento proteico da *CHAP1*, porém mesmo com diversas estratégias não foi possível expressá-la *in vitro* provavelmente pela instabilidade do plasmídeo na bactéria.

Foram produzidos parasitos mutantes superexpressando a proteína *TcCHAP1* os quais foram desafiados com peróxido de hidrogênio. Os parasitos mutantes apresentaram comportamento semelhante a parasitos selvagens, demonstrando que provavelmente a proteína de interesse não está envolvida com o metabolismo redox gerado de forma extrínseca, corroborando com dados *in silico*, os quais indicam uma função mitocondrial dessa proteína.

O mix de deleção não foi eficiente para a deleção dos dois alelos do gene da *TcCHAP1*, inferindo uma possível essencialidade do gene para epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

REFERÊNCIAS

ALVAREZ, M. N. et al. Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized *Trypanosoma cruzi*: consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 8, p. 6627–40, 25 fev. 2011.

BAO, W. J. et al. Highly efficient expression and purification system of small-size protein domains in *Escherichia coli* for biochemical characterization. **Protein Expression and Purification**, v. 47, n. 2, p. 599–606, 2006.

BOCEDI, A. et al. Trypanothione efficiently intercepts nitric oxide as a harmless iron complex in trypanosomatid parasites. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 24, n. 4, p. 1035–42, abr. 2010.

CARRIÓ, M. .; VILLAVERDE, A. Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. **Journal of Biotechnology**, v. 96, n. 1, p. 3–12, jun. 2002.

COSTA, F. C. et al. Expanding the toolbox for *Trypanosoma cruzi*: A parasite line incorporating a bioluminescence-fluorescence dual reporter and streamlined CRISPR/Cas9 functionality for rapid in vivo localisation and phenotyping. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 4, abr. 2018.

DAROCHA, W. D. et al. Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: Improving vectors and electroporation protocols. **Parasitology Research**, v. 92, n. 2, p. 113–120, 2004.

DE ALMEIDA NOGUEIRA, N. P. et al. Heme-Induced ROS in *Trypanosoma cruzi* activates Camkii-Like that triggers epimastigote proliferation. One helpful effect of ROS. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, 11 out. 2011.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M. U.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host cell interaction. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, 2010.

PIRES, S. F. Geração e caracterização de linhagens de *Trypanosoma cruzi* expressando proteínas fluorescentes como ferramentas para pesquisa em Doença de Chagas. 2007.

FAIRLAMB, A. H. et al. Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. **Science (New York, N.Y.)**, v. 227, n. 4693, p. 1485–7, 22 mar. 1985.

HARRISON, R. G. Expression of soluble heterologous proteins via fusion with NusA protein. **inNovations**, v. 11, p. 4–7, 2000.

IRIGOÍN, F. et al. Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. **Free radical biology & medicine**, v. 45, n. 6, p. 733–42, 15 set. 2008.

JIMENEZ, V. Dealing with environmental challenges: mechanisms of adaptation in *Trypanosoma cruzi*. 2014.

JR, A. R.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010.

KRAUTH-SIEGEL, L. R.; COMINI, M. A.; SCHLECKER, T. The trypanothione system. **Sub-cellular biochemistry**, v. 44, p. 231–51, 2007.

KRAUTH-SIEGEL, R. L.; LEROUX, A. E. Low-molecular-mass antioxidants in parasites. **Antioxidants & redox signaling**, v. 17, n. 4, p. 583–607, 15 ago. 2012.

LESSA, C.; Estudo do papel funcional de proteínas relacionadas à resistência ao sistema complemento de mamíferos em *Trypanosoma rangeli* Estudo do papel funcional de proteínas relacionadas à resistência ao sistema complemento de mamíferos em *Trypanosoma rangeli*. 2020.

MANTA, B. et al. Trypanothione: a unique bis-glutathionyl derivative in trypanosomatids. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1830, n. 5, p. 3199–216, maio 2013.

MARISCH, K. et al. Evaluation of three industrial *Escherichia coli* strains in fed-batch cultivations during high-level SOD protein production. **Microbial Cell Factories**, v. 12, n. 1, p. 1–11, 2013.

NOGUEIRA, N. P. et al. Proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi* inside its vector have a new trigger: Redox status. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, 11 fev. 2015.

NOGUEIRA, N. P. et al. Heme modulates *Trypanosoma cruzi* bioenergetics inducing mitochondrial ROS production. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 108, p. 183–191, 1 jul. 2017.

OZA, S. L. et al. Trypanothione biosynthesis in *Leishmania major*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 139, n. 1, p. 107–116, 2005.

PACESA, M. et al. Small-size recombinant adenoviral hexon protein fragments for the production of virus-type specific antibodies. **Virology Journal**, v. 14, n. 1, p. 1–14, 2017.

RIBEIRO, V. T. et al. Evaluation of induction conditions for plasmid pQE-30 stability and 503 antigen of *Leishmania i. chagasi* expression in *E. coli* M15. **Applied Microbiology**

and Biotechnology, v. 103, n. 16, p. 6495–6504, 2019.

SIES, H. Role of metabolic H₂O₂ generation: redox signaling and oxidative stress.

The Journal of biological chemistry, v. 289, n. 13, p. 8735–41, 28 mar. 2014.

SINGH, S. M.; PANDA, A. K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, n. 4, p. 303–310, 2005.

SOUSA, A. F. et al. Free Radical Biology and Medicine Genetic and chemical analyses reveal that trypanothione synthetase but not glutathionylspermidine synthetase is essential for *Leishmania infantum*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 73, p. 229–238, 2014.

BOTELHO, I. B. et al. A Comparative In Silico Study of the Antioxidant Defense Gene Repertoire of Distinct Lifestyle Trypanosomatid Species. **Evolutionary Bioinformatics**, p. 263, nov. 2016.

TAKHAR-LAIL, A.; GHORBANI, A. Preface. **Market Research Methodologies: Multi-Method and Qualitative Approaches**, p. xx–xxv, 2014.

TOMÁS, A. M.; CASTRO, H. Redox metabolism in mitochondria of trypanosomatids. **Antioxidants & redox signaling**, v. 19, n. 7, p. 696–707, 1 set. 2013.

TURRENS, J. F. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. **Molecular aspects of medicine**, v. 25, n. 1–2, p. 211–20, 2004.

TARLETON, R.; PENG, D. EuPaGDT: a web tool tailored to design CRISPR guide RNAs for eukaryotic pathogens. **Microbial Genomics**, v. 1, n. 4, p. e000033, 13 out. 2015.

WHITTEN, M. et al. Differential modulation of *Rhodnius prolixus* nitric oxide activities following challenge with *Trypanosoma rangeli*, *T. cruzi* and bacterial cell wall components. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 5, p. 440–452, 2007.

WHO | What is Chagas disease? Disponível em: <<https://www.who.int/chagas/disease/en/>>. Acesso em: 10 jan. 2021.

ZARKAR, N. et al. Expression and purification of soluble and functional fusion protein DAB389IL-2 into the *E. coli* strain Rosetta-gami (DE3). **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 67, n. 2, p. 206–212, 2020.