

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

NOCAUTE NO GENE DA PROTEÍNA P21 DE *TRYPANOSOMA CRUZI* MODULA
A INVASÃO, MULTIPLICAÇÃO INTRACELULAR E ECLOSÃO DO PARASITA
DE CEPA POUCO VIRULENTA

CASSIANO COSTA RODRIGUES

UBERLÂNDIA
NOVEMBRO – 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

NOCAUTE NO GENE DA PROTEÍNA P21 DE *TRYPANOSOMA CRUZI* MODULA
A INVASÃO, MULTIPLICAÇÃO INTRACELULAR E ECLOSÃO DO PARASITA
DE CEPA POUCO VIRULENTA

Tese de doutorado apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito parcial para obtenção do
título de doutor.

Discente: Cassiano Costa Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva

Coorientadora: Dra. Thaise Lara Teixeira

UBERLÂNDIA
NOVEMBRO – 2022

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

R696
2022 Rodrigues, Cassiano Costa, 1988-
 NÓCAUTE NO GENE DA PROTEÍNA P21 DE TRYPANOSSOMA CRUZI
 MODULA A INVASÃO, MULTIPLICAÇÃO INTRACELULAR E ECLOSÃO
 DO PARASITA DE CEPA POUCO VIRULENTA. [recurso
 eletrônico] / Cassiano Costa Rodrigues. - 2022.

 Orientador: Claudio Vieira da Silva .
 Coorientadora: Thaise Lara Teixeira .
 Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia,
 Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
 Modo de acesso: Internet.
 Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2022.591>
 Inclui bibliografia.
 Inclui ilustrações.

 1. Imunologia. I. , Claudio Vieira da Silva, 1972-,
 (Orient.). II. , Thaise Lara Teixeira, 1988-,
 (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia.
 Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
 IV. Título.

CDU: 612.017

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia
 Aplicada
 Av. Amazonas, s/n, Bloco 4C, Sala 4C218 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3225-8672 - www.imunoparasito.ufu.br - coipa@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Tese de Doutorado nº 149				
Data:	28/11/2022	Hora de início:	14:04h	Hora de encerramento:	17:24
Matrícula do Discente:	11813IPA001				
Nome do Discente:	Cassiano Costa Rodrigues				
Título do Trabalho:	Nocaute no gene da proteína P21 de <i>Trypanosoma cruzi</i> modula a invasão, multiplicação intracelular e eclosão do parasita de cepa pouco virulenta				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Imunologia e Biologia Celular de Patógenos Causadores de Doenças Infecciosas e Parasitárias				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Compreensão do impacto da proteína P21 de <i>Trypanosoma cruzi</i> na infecção humana e em modelos experimentais				

No dia 28/11/2022, reuniu-se, por vídeo conferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta pelo Presidente(a): Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva (Orientador do candidato) – Departamento de Imunologia - UFU; Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior – Departamento de Imunologia - UFU; Dra. Celina Monteiro da Cruz Lotufo – Departamento de Fisiologia - UFU; Dra. Ana Carolina Morais Oliveira Scussel – Instituto de Ciências da Saúde - UFTM; Dr. João Paulo Ferreira Rodrigues – Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia - UNIFESP.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva, apresentou a Comissão Examinadora, e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

APROVADO

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Claudio Vieira da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/11/2022, às 17:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Celina Monteiro da Cruz Lotufo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/11/2022, às 17:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jair Pereira da Cunha Junior, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/11/2022, às 17:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **João Paulo Ferreira Rodrigues, Usuário Externo**, em 28/11/2022, às 17:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Carolina de Moraes Oliveira, Usuário Externo**, em 28/11/2022, às 17:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4096053** e o código CRC **5BDC0C52**.

Dedico este trabalho aos meus pais, Lucimar e César, que sempre lutaram pelos meus sonhos e de maneira tão particular me fizeram tornar quem sou.

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre.”

Paulo Freire

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida, e por me permitir viver com saúde, e estar bem junto daqueles que realmente amo. Sendo assim, vivo com serenidade, amor e respeito com aqueles que me acompanham nessa caminhada.

À minha família (mãe, pai e irmãos) que sempre tiveram fé que eu conseguiria, me ensinando a lutar mesmo quando o cansaço e os motivos para desistir fizeram morada em mim. Foram eles que me sustentaram e sem a ajuda deles não teria conseguido lidar com os desafios, adversidades e dificuldades que nortearam meus caminhos.

Ao meu professor e orientador Dr. Claudio Vieira da Silva que sempre esteve disposto a me ajudar a construir uma bagagem acadêmica, me incentivando a sempre buscar o aprimoramento pessoal e profissional, através das inúmeras oportunidades que me foram ofertadas por suas mãos. A minha Coorientadora Dra. Thaise Lara Teixeira que com paciência e amor a pesquisa e ao desenvolvimento da ciência me fez acreditar que nada é impossível, e que ser resiliente é uma virtude a ser construída. Serei eternamente grato pelas várias oportunidades e ensinamentos, e por ter me acolhido e compreendido tanto.

A todos os alunos do Laboratório de Tripanosomatídeos (LATRI), pelos ensinamentos e companheirismo nas horas difíceis, e por me acolherem com tanto carinho. Essa equipe de excelentes profissionais que fez a diferença em minha vida e me fizeram um ser humano melhor.

Por fim, quero agradecer também aos meus amigos, familiares e tantos outros professores e profissionais que acrescentaram tanto com palavras de motivação e apoio. As instituições que apoiam e incentivam a educação nesse país como: Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro para que esse trabalho fosse realizado.

LISTA DE ABREVIACÕES

AE	Amastigotas extracelulares
BSA	<i>Bovine serum albumine</i> (Albumina sérica bovina)
BSD	Blasticidina
BZN	Benzonidazol
cDNA	Fita complementar de Ácido desoxirribonucleico
Cas9	Nuclease de <i>Streptococcus pyogenes</i>
Cas9-EGFP	Nuclease <i>Streptococcus pyogenes</i> , associada com proteína fluorescente verde.
CAS9	Grupos de parasitas que expressão a Cas9 de forma constitutiva
CCC	Cardiomiopatia chagásica crônica
CRISPR	Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas
CO ₂	Dióxido de carbono
CXCR4	<i>C-X-C chemokine receptor type 4</i> (Receptor de quimiocina do tipo 4)
DC	Doença de Chagas
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
DNase I,	DNA polimerase I
DP	Desvio padrão
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> (Meio Eagle modificado por Dulbeco)
EPI	Epimastigotas
sgRNA	<i>Guide acid ribonucleic</i> (Guia de Ácido Ribonucleico)
G148	Antibiótico de Seleção – G418
GOI	Interest of Gene – Gene de Interesse
gp82	Glicoproteína de superfície de 82 kDa
HE	Hematoxilina e eosina
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)carboxylic acid</i> (ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-il]-etanossulfônico)
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HDR	Reparo Dirigido por Homologia
HYG	Higromicina
h	Horas
IFN- γ	Interferon Gama
IgG	Imunoglobulina G
IL-4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10
ImageJ	<i>Image Processing and Analysis in Java</i> (Programa de domínio público para análise de imagens)
IPTG	<i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i> (Indutor de síntese proteica)
IP3	Trifosfato de inositol
kDa	Kilo Dalton
LIT	Liver Infusion Triptose – Infusão de Fígado e Triptose

MPO	Mieloperoxidase
MOI	Multiplicity of infection – Multiplicidade de Infecção
M	Molar
mM	Milimolar
μM	Micromolar
nM	Nanomolar
min	Minutos
mL	Mililitros
NaCl	Cloreto de sódio
NAG	N-acetilglicosaminidase
NFX	Nifurtimox
nm	Nanômetros
°C	Graus Celsius
OD	<i>Optical density</i> (Densidade ótica)
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF P21	Open Reading Frame - Fase de leitura aberta da P21
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (Solução salina tamponada com fosfato)
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)
PGN	Solução contendo PBS, 0,15% de gelatina e 0,1% de azida
Rpm	Rotações por minuto
rP21	Proteína recombinante P21
PM	Peso molecular
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> (Meio do Instituto Roswell Park Memorial)
RT-PCR	Transcriptase Reversa - Reação em cadeia pela polimerase
RT-qPCR	PCR quantitativo em tempo real
SDS-PAGE	Docetil sulfato de sódio (SDS) eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)
SFB	Soro fetal Bovino
TcP21 ^{-/-}	Parasitas nocautes no gene da proteína P21 de <i>T. cruzi</i>
TM	Tripomastigota Metacíclico
TCT	Tripomastigotas de cultura de tecido
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
UV	Ultravioleta
UTR	Untranslated Region – Regiões não codificantes
VERO	Fibroblasto de rim de macaco verde da África
WHO	Organização Mundial de Saúde
WT	Wild Type – Linhagem Selvagem

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formas de desenvolvimento de *T. cruzi*, Ciclo de vida no hospedeiro invertebrado e vertebrado, esquema de mecanismo de transmissão vetorial. Fonte: Trends in Parasitol, Cell Press, 2020 April; 36(4):404-405. DOI: 10.1016/j.pt.2019.10.002. 24

Figura 2. Mapas de vetores utilizados no sistema CRISPR/Cas9 a partir de um vetor puc_sgRNA scaffold para promover a deleção do gene da proteína P21 em *T. cruzi* cepa G **A)** Modelo de vetor quimérico pUC_sgRNA scaffold que irá abrigar dois protoespaçadores específicos, contendo regiões de clivagem no gene alvo da proteína P21. **B)** Vetor pTREXSpCas9GFP para obter linhagens celulares expressando Cas9 de forma constitutiva **C)** Vetor pTREX-GFP-Blast, contendo os braços de homologia e o gene de resistência a blasticidina para promover HRD na região UTR do gene da P21 **D)** Vetor Topo_Hx1_Higro, contendo os braços de homologia e o gene de resistência a higromicina para promover HRD na região UTR do gene da P21..... 39

Figura 3. Figura 3 – Confirmação da deleção do gene da P21 nos parasitas nocautes cepa G. **A)** Representação esquemática do locus do gene da P21 em WT e clones nocautes com iniciadores e regiões de UTR. **B)** Gel de agarose mostrando os RNA guias 36 e 24 para direcionar a Cas9 no gene da P21. Um fragmento de 80 pb de rRNA 18S humano transcrito de pTRI-RNA 18S foi usado como controle da reação. **C)** Gel de agarose mostrando os DNA doadores contendo os genes de resistência a Blasticidina (599bp) e Higromicina (1226bp). **D)** PCR de DNAg de clones nocautes e controles (WT e CAS9) usando primers específicos para a P21, bem como a região UTR do gene P21 analisando a inserção dos genes de resistência a BSD e HYG. **E)** PCR a partir do cDNA dos clones nocautes e controles (WT e CAS9) analisando a expressão da P21 e TcMVK e TcHGPR1 endógenos. **F)** Imunofluorescência indireta em epimastigotas P21 nocautes e WT incubados com anticorpo policlonal anti-P21 (camundongo) e anticorpo anti-camundongo conjugado com Alexa Fluor 568 (vermelho), e núcleo marcado com DAPI (azul), DIC contraste de interferência diferencial; P21 KO, P21 nocaute. Imagens de plano único foram adquiridas por microscopia confocal. As barras de escala representam 3 μ m. 48

Figura 4. Curva de Crescimento de epimastigotas por 12 dias. O gráfico mostra a média representativa \pm SD de um dos dois experimentos independentes realizados em triplicata. A comparação foi realizada por ANOVA de duas vias e teste de Tukey's para comparações múltiplas. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre WT e TcP21^{-/-} a partir do 4º dia com valor de p: * < 0,05 , p: ** < 0,01 , p: **** < 0,0001 e ns não significativo..... 49

Figura 5. **Figura 5** - Representação esquemática por PCR da análise da expressão do gene da P21 nos parasitas nocautes nas formas EPI, TM e TCT. **(A)** Análise do DNAg por PCR das formas epimastigotas TcP21^{-/-} na presença e ausência dos antibióticos de seleção BSD e HYG. **(B)** Análise do DNAg por PCR das formas tripomastigotas

metacíclicos TcP21^{-/-} e de células Vero infectadas com o tempo de 96 h e 144 h de infecção. (C) Análise do DNAg por PCR da primeira eclosão das formas tripomastigotas de cultura de tecido (TCT) TcP21^{-/-} e CAS9. Colocar tb o significado de TM, bem como o que as bandas de 712 bp, 778 bp e 1339 bp correspondem..... 51

Figura 6. Análise da infecção em células Vero por parasitas TM nos grupos WT, CAS9 e TcP21^{-/-}. (A) Imagens representativas por microscopia de luz de células Vero infectadas com tripomastigotas metacíclicos (2 horas, MOI: 20 parasitas por célula), fixadas e coradas com Giemsa para visualização dos parasitas internalizados indicados pelas setas. Barras 20µm. (B) Quantificação do número de parasitas internalizados em 300 células totais o gráfico mostra a média representativa ± SD de dois testes independentes realizados em triplicata. (C) Análise da porcentagem de células infectadas em 300 células totais, os dados representados são a média ± SD de dois testes realizados em triplicata. A comparação foi realizada por ANOVA one-way e o teste Tukey's múltiplas comparações. Os asteriscos representam diferenças significativas p: * < 0,05 e p ** < 0,01..... 52

Figura 7. Impacto da deleção no gene da proteína P21 na invasão de TCTs e na replicação de amastigotas intracelulares. (A) Os parasitas nocautes para P21(TcP21^{-/-}) apresentaram diminuição na taxa de invasão celular na contagem de número de parasitas internalizados em 100 células infectadas, o gráfico mostra a média representativa ± SD de dois testes independentes realizados em quadruplicata. A comparação foi realizada por ANOVA one-away e teste de Tukey's estabelecido em múltiplas comparações e os asteriscos indicam diferenças significativas com valor de p * < 0,05 e p ** < 0,01. (B) Aumento na replicação de amastigotas intracelulares nos tempos de 24 e 48 horas nos parasitas TcP21^{-/-}, já nos tempos de 72 e 96 o grupo WT apresentou aumento na replicação em comparação aos grupos CAS9 e TcP21^{-/-}. O gráfico representa o número total de parasitas internalizados em 100 células infectadas pela média representativa ± SD de dois testes independentes realizados em quadruplicata sendo a comparação realizada por ANOVA de duas vias e teste Sidak's para múltiplas comparações, e os asteriscos indicam diferenças significativas com valor p: *** < 0,001 e p: **** < 0,0001. (C)) Imagens representativas por microscopia de luz de células Vero infectadas com TCT nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas, MOI: 10 parasitas por célula), fixadas e coradas com Giemsa para visualização dos parasitas internalizados indicados pelas setas com barras 20µm. 55

Figura 8. A interrupção no gene da proteína P21 induz um aumento na liberação das formas tripomastigotas e amastigotas extracelulares no sobrenadante de células Vero infectadas. (A) Cinética de tempo de saída das formas tripomastigotas para o sobrenadante durante os tempos de 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 e 240 horas após a infecção. Os parasitas TcP21^{-/-} apresentaram um aumento significativo no número de tripomastigotas no sobrenadante nos tempos de 216 e 240 os resultados representam a média ± SD de duas ensaios independentes realizados em quadruplicata, a comparação foi realizada por ANOVA de duas vias e teste Dunnett's para múltiplas comparações. Os asteriscos indicam diferenças significativas com comparação entre WT e TcP21^{-/-} com valor de p: **** <0,0001. (B) Cinética de tempo de saída das formas amastigotas

extracelulares para o sobrenadante durante os tempos de 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 e 240 horas após a infecção. 57

Figura 9. Resumo gráfico. (A) Ilustração do esquema de deleção no gene da proteína P21 (GOI P21) pela metodologia de CRISPR/Cas9 pela inserção de genes de resistência direcionado pelo mecanismo de reparo dirigido por homologia (HDR) para obter parasitas nocautes para P21 da cepa G, investigando a permanência de parasitas mutantes no processo de diferenciação de epimastigotas para tripomastigotas. (B) A interrupção no gene da proteína P21 foi capaz de promover uma diminuição na taxa replicação de epimastigotas e da invasão celular em TM e TCTs, bem como, um aumento na replicação de amastigotas intracelulares nos tempos de 24 e 48 horas interferindo no processo de diferenciação levando a um aumento da eclosão dos parasitas TcP21^{-/-} em células infectadas. 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Esquema de primers utilizados para gerar clones nocautes no gene da proteína P21 por CRISPR/Cas9 em <i>T. cruzi</i> da cepa G, e confirmação de clones TcP21 ^{-/-} por RT-PCR.....	40
--	----

SUMÁRIO

1	INTROUÇÃO/ JUSTIFICATIVA	17
1.1	Doença de Chagas.....	17
1.2	<i>Trypanosoma cruzi</i> e Invasão Celular.....	22
1.3	Moléculas da célula hospedeira e do parasita envolvidos na invasão celular..	26
1.4	Proteína P21 de <i>Trypanosoma cruzi</i>	29
1.5	CRISPR/Cas9, <i>Trypanosoma cruzi</i> e P21.....	32
2	OBJETIVOS	35
2.1	Objetivo geral.....	35
2.2	Objetivos específicos	35
3	MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1	Cultura de células.....	37
3.2	Geração de parasitas nocautes no gene da proteína P21.....	38
3.3	Transfecção Celular	41
3.3	Extração de RNA total e síntese de cDNA por RT-PCR.....	41
3.4	Análise de imunofluorescência da expressão de P21.	42
3.6	Cultivo de formas tripomastigotas de cultura de tecido (TCTs).....	42
3.7	Ensaio de invasão celular com tripomastigotas metacíclicos (TM) e coloração com Giemsa.	42
3.8	Ensaio de invasão celular com tripomastigotas de cultura de tecido (TCTs) e coloração com Giemsa.....	43
3.9	Ensaio de replicação celular e coloração com Giemsa.	44
3.10	Ensaio de eclosão.....	44
3.11	Normas de Biossegurança.....	45

3.12	Análise estatística	45
4	RESULTADOS.....	46
4.3	Análise por imunofluorescência da presença da proteína P21 nos nocautes TcP21 ^{-/-}	47
5	DISCUSSÃO.....	59
6	CONCLUSÃO	65
7	REFERÊNCIAS.....	66

RESUMO

O protozoário *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da Doença de Chagas. O processo de invasão e multiplicação intracelular envolve diferentes moléculas do parasita e da célula hospedeira para perpetuar seu ciclo de vida dentro do hospedeiro mamífero. A P21 é uma proteína secretada por *T. cruzi* e está envolvida na invasão de células hospedeiras do parasita e na multiplicação intracelular. Estudos anteriores demonstram que o tratamento da célula hospedeira com a forma recombinante de P21 (rP21) durante a invasão celular aumenta a internalização do parasita. Além disso, quando o tratamento é realizado em diferentes momentos de multiplicação intracelular do parasita, observamos uma regulação negativa da taxa de multiplicação. Corroborando com estes dados, parasitas TcP21^{-/-} da cepa Y apresentaram maior taxa de multiplicação em relação aos controles. Para compreender se o mesmo ocorre com outra cepa, menos virulenta, geramos parasitas nocautes da linhagem G para a expressão de P21 usando o sistema CRISPR/Cas9 e avaliamos a capacidade de invadir a célula hospedeira, multiplicar-se intracelularmente e eclodir para o sobrenadante. Nossos resultados mostraram que os parasitas TcP21^{-/-} tiveram menor capacidade de invadir a célula hospedeira em comparação com os controles (WT e Cas9). Ademais, observamos que os parasitas TcP21^{-/-} se multiplicaram mais durante as primeiras 24 e 48 horas pós-infecção e liberaram maior número de formas tripomastigotas e amastigotas para o sobrenadante da célula hospedeira ao longo de um ensaio de cinética de eclosão. Em conjunto, nossos resultados corroboraram com os dados obtidos anteriormente, nos quais a P21 tem um papel relevante na invasão de células hospedeiras pelo parasita e na multiplicação intracelular. Além disso, observamos, pela primeira vez, que a falta de expressão de P21 aumenta a saída do parasita da célula hospedeira.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, Doença de Chagas, interação parasita-hospedeiro, CRISPR/Cas9, edição genômica, proteína P21

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi protozoan is the etiologic agent of Chagas disease. The process of intracellular invasion and multiplication involves different molecules from the parasite and the host cell to perpetuate its life cycle within the mammalian host. P21 is a protein secreted by *T. cruzi* and is involved in parasite host cell invasion and intracellular multiplication. Previous studies demonstrate that treatment of the host cell with the recombinant form of P21 (rP21) during cell invasion increases parasite internalization. Furthermore, when the treatment is performed at different times of intracellular multiplication of the parasite, we observed a negative regulation of the multiplication rate. Corroborating these data, TcP21^{-/-} parasites of the Y strain showed a higher multiplication rate compared to controls. To understand whether the same occurs with another, less virulent strain, we generated knockout parasites of the G lineage for P21 expression using the CRISPR/Cas9 system and evaluated the ability to invade the host cell, multiply intracellularly and hatch into the supernatant. Our results showed that TcP21 ^{-/-} parasites had a lower ability to invade the host cell compared to controls (WT and Cas9). Furthermore, we observed that the TcP21 ^{-/-} parasites multiplied more during the first 24- and 48-hours post-infection and released a greater number of trypomastigote and amastigote forms into the host cell supernatant during a hatch kinetics assay. Taken together, our results corroborate the data obtained previously, in which P21 plays a relevant role in the invasion of host cells by the parasite and in intracellular multiplication. Furthermore, we observed for the first time that the lack of P21 expression increases the parasite egress from the host cell.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; Parasite-host interaction; cell invasion; intracellular multiplication; CRISPR/Cas9, TcP21^{-/-}, P21 protein.

1 INTRODUÇÃO/ JUSTIFICATIVA

1.1 Doença de Chagas

A Doença de Chagas (DC) também considerada tripanossomíase Americana afeta atualmente cerca de 6 a 7 milhões de pessoas ao redor do mundo, que estão infectadas com o seu agente etiológico *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). A DC é uma doença endêmica em países da América Latina e é considerada uma doença tropical negligenciada e debilitante (WHO, 2022), devido às complicações que se estabelecem durante a fase crônica da doença, que podem levar a complicações cardíacas, que ocorrem anos após os primeiros sintomas da fase aguda. (GUARNER, 2019). Relata-se que existam atualmente 75 milhões de pessoas sob risco de contaminação. Contudo, estima-se ainda que aproximadamente cerca de 12.000 pessoas morrem todos os anos devido às complicações da DC. Cerca de 1 a cada 10 pacientes é diagnosticado com a doença, o que provoca aos países endêmicos encargos sociais e econômicos relevantes, o que leva a DC a ser considerada um problema de saúde pública. (CHAGAS DISEASE - WORLD HEART FEDERATION, 2022).

T. cruzi pertencente a ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, é um protozoário unicelular flagelado e está entre os mais bem-sucedidos parasitas intracelulares; tem como característica um ciclo de vida complexo que envolve hospedeiros invertebrados e vertebrados, desenvolvendo diferentes formas evolutivas: amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas de acordo com a fase do ciclo no hospedeiro e no inseto vetor (HORTA et al., 2020; WALKER et al., 2013; ZUMA; DOS SANTOS BARRIAS; DE SOUZA, 2021).

T. cruzi pode ser transmitido por várias vias; via clássica vetorial, transmissão oral, transfusão de sangue, transmissão vertical e acidentes laboratoriais (CATALA; GORLA; BASOMBRI, 1992; MARTINS-MELO et al., 2014; SAMPAIO et al., 2020; SILVEIRA; DIAS, 2011). A via clássica ocorre por meio de três principais insetos vetores: *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* popularmente chamados de “Barbeiro” (CATALA; GORLA; BASOMBRI, 1992; SAMPAIO et al., 2020). Por isso, controles epidemiológicos governamentais têm sido realizados frente a erradicação da transmissão da DC, e um dos esforços significativos foi a eliminação do inseto vetor *Triatoma infestans* no Brasil (SCHOFIELD, 1992). Apesar da eliminação dessa espécie de vetor, o nicho ecológico deixado por ele pode ser preenchido por outras espécies em processo de domiciliação como o

Panstrongylus megistus (DIAS et al., 2020). Nesse sentido, é importante ressaltar que *T. cruzi* pode infectar várias espécies de triatomíneos e possui vários reservatórios animais (SILVEIRA; DIAS, 2011).

A DC tem sido considerada uma patologia reemergente em potencial devido a globalização e migração de pessoas infectadas assintomáticas ao redor do mundo. Essa intensa migração humana tem provocado o surgimento da DC em países onde a doença não é endêmica. Nesses casos, a doença pode ser transmitida por transfusão sanguínea, transplante de órgãos e de forma vertical. Com isso, surge um problema epidemiológico e econômico mundial pela migração de indivíduos cronicamente infectados por *T. cruzi* dos países endêmicos para os não endêmicos, principalmente Estados Unidos (EUA), Canadá, Espanha, França, Suíça, Itália, Japão, países emergentes da Ásia e Austrália. Estima-se que nos EUA 300.000 indivíduos estejam infectados por *T. cruzi*, sendo que 30.000 a 45.000 tiveram manifestações clínicas. Devido a globalização tornou-se obrigatório a triagem da doença nos doadores de sangue e de órgãos nesses países (ANGHEBEN et al., 2015; ASSAL; CORBI, 2011; MANGANO et al., 2021; NORMAN; LÓPEZ-VÉLEZ, 2019).

Outro aspecto relevante da transmissão da DC nos tempos atuais está relacionado à transmissão oral por meio da ingestão de alimentos como açaí e caldo de cana contaminados com a forma infectiva do parasita (LABELLO BARBOSA et al., 2019; PEREIRA et al., 2010; SAMPAIO et al., 2020). É cada vez mais frequente a ocorrência de relatos de surtos agudos da DC o que tem tomado a atenção de algumas autoridades por considerarem a doença como reemergente na Amazônia. Contudo, os dados relatados pela investigação epidemiológica demonstram uma transmissão não vetorial, resultado da ingestão de sucos de frutas locais. A suspeita de infecção por *T. cruzi* pela ingestão de açaí, fruto da espécie *Euterpe oleracea*, amplamente consumido *in natura* como bebida, e também preparados em receitas típicas locais, tem sido um importante fator de exposição comum entre a população local em regiões da Amazônia (SANTANA et al., 2019). Após relatos de uma crise febril aguda 10 pacientes foram submetidos ao diagnóstico e 8 testaram positivo para *T. cruzi*, uma amostra da mesma origem do suco consumido por todos os pacientes foi coletada por agentes de saúde pública e armazenada a -20 °C e encaminhada para um laboratório de referência em Manaus, logo após 24h de incubação foi relatado a presença de formas móveis flageladas na camada intermediária de gordura do suco de açaí (LABELLO BARBOSA et al., 2019; SANTANA et al., 2019). Esses

dados demonstram a infestação de triatomíneos em palmeiras na Amazônia o que resulta no aumento da transmissão oral do *T. cruzi* pelo consumo de alimentos contaminados (DIAS et al., 2014; LABELLO BARBOSA et al., 2019).

A DC caracteriza-se por apresentar duas fases distintas, aguda e a crônica (CHADALAWADA et al., 2020). Logo após a infecção por *T. cruzi* a fase aguda se estabelece, sendo caracterizada por febre, mal-estar, esplenomegalia, hepatomegalia e parasitemia elevada, devido à presença de muitos tripomastigotas no sangue dos pacientes; essa fase possui duração variável tanto na infecção humana quanto na experimental, de seis a oito semanas em média (SANTOS et al., 2020; SCHIJMAN, 2018; ZAIDEL et al., 2020). A fase crônica da doença tem início logo após a fase aguda, e é classificada em diferentes formas. Forma indeterminada que tem uma característica assintomática, que se dá pela persistência do parasita sem desenvolver manifestações específicas; forma cardíaca que pode ocorrer entre 20 e 40% dos casos levando a quadros de cardiomiopatia chagásica crônica e forma digestiva caracterizada pelo comprometimento do trato digestório com a formação de megacólon e megaesôfago. (ROCHA et al., 2020). Os pacientes comprometidos com as formas cardíaca, digestiva ou associada (cardiodigestiva) podem desenvolver quadros clínicos variados, desde brandos a muito graves, e os parasitos são raros no sangue, mas estão presentes no interior das células (ECHAVARRÍA et al., 2021). O desenvolvimento da fase crônica pode levar a complicações cardíacas e digestivas que necessitam de tratamentos longos e procedimentos cirúrgicos, aumentando os custos com a doença; nesta fase, pode-se desenvolver a cardiomiopatia chagásica crônica (CCC), a qual se estabelece apresentando lesões cardíacas em pessoas economicamente ativas em países endêmicos e não endêmicos, o que acaba por determinar uma condição de morbidade, e muitas vezes uma taxa de mortalidade precoce da população, resultando em perdas econômicas e pessoais importantes (CHADALAWADA et al., 2020; ECHAVARRÍA et al., 2021; GUARNER, 2019; NORMAN; LÓPEZ-VÉLEZ, 2019). Muitos são os esforços para controlar a doença: conhecer melhor a biologia de *T. cruzi* e sua interação com o ser humano, a patogenia e fisiopatologia das complicações na fase crônica (ANDRADE et al., 1978; SCHIJMAN, 2018). Assim como, tratar de forma mais adequada e efetivamente as manifestações cardíacas e digestivas tardias; embora também seja necessário adotar iniciativas que possibilitem o adequado manejo das condições sociais e médicas resultantes da migração de indivíduos infectados para países onde a doença não existia (ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014; ANGHEBEN et al., 2015; NORMAN; LÓPEZ-VÉLEZ, 2019).

Alguns estudos apontam que a prevalência de quadros clínicos da DC apresentam variações territoriais. Como por exemplo, algumas patologias cardíacas e digestivas associadas a infecção por *T. cruzi* que são predominantes no Chile e no Brasil Central e não são tão comuns no restante da América do Sul (WHO, 2022). Já outros estudos demonstram que a infecção por *T. cruzi* na Amazônia geralmente são mais leves e consequentemente levam a DC para a fase indeterminada. Essas diferenças geográficas na infecção por *T. cruzi* pode resultar em quadros clínicos diferentes, e acredita-se estar associadas a aspectos genéticos e imunológicos da população local de cada região. Muito embora, essas variações também podem estar relacionadas principalmente pelas diferenças genéticas do próprio parasita (COURA, 1988; COURA et al., 2002; NUNES et al., 2013).

Quando diferentes cepas de *T. cruzi* foram isoladas e comparadas entre elas, foi possível notar que havia perfis genéticos e proteicos polimórficos, o que indicou pelo menos três ou mais subdivisões da população do parasita, onde uma era composta principalmente por cepas híbridas; essa diversidade genética é reunida em sete unidades de tipagem discreta (DTUs), TcI-TcVI e Tcbat (, (FERREIRA; BRIONES, 2012; RIBEIRO et al., 2018; ZINGALES, 2018a). O que é importante ressaltar que essas cepas diferentes ocupam territórios distintos, o que caracteriza um ciclo silvestre e um ciclo biológico da DC, bem como podem vir a infectar hospedeiros silvestres distintos, o que pode levar a uma infecção com cepas *T. cruzi* I que induz baixa parasitemia e com um quadro clínico assintomático; enquanto a infecção por *T. cruzi* II pode ocorrer uma parasitemia alta e quadros clínicos cardíaco e gastrointestinais (BÉRTOLI et al., 2006; FERREIRA; BRIONES, 2012; LISBOA et al., 2006; RIBEIRO et al., 2018; ZINGALES, 2018a).

As complicações na fase crônica da DC apontam evidências de ordem experimental e clínicas, firmadas recentemente, sobre a fisiopatologia da CCC que apresenta: alterações inflamatórias degenerativas e fibróticas, disfunção sinusal, bloqueios atrioventriculares e intraventriculares, arritmias ventriculares por reentrada, discinergias ou aneurismas ventriculares, predisposição a complicações tromboembólicas, além do progressivo dano ao miocárdio, e insuficiência cardíaca de padrão cardiomiopático dilatado e biventricular (ANGHEBEN et al., 2015; ECHAVARRÍA et al., 2021; NORMAN; LÓPEZ-VÉLEZ, 2019; PINO-MARÍN et al., 2021). Atualmente, surge o consenso de que a essência da patogenia da CCC resida na inflamação diretamente dependente da persistência parasitária e da consequente resposta imunopatológica adversa; sendo assim, resgata-se a noção de que, mesmo

em sua fase crônica, a cardiopatia seja essencialmente um processo inflamatório infeccioso que ocorre pela relação de antígenos de *T. cruzi* e o sistema imunológico do hospedeiro (FLORENTINO et al., 2021; PAIVA et al., 2012; WEN; VYATKINA; GARG, 2004).

A infecção por *T. cruzi* em humanos é considerada uma patologia pouco tratada, algumas vezes considerada equivocadamente de etiologia autoimune e não de persistência parasitária (TARLETON, 2003). Portanto, o maior objetivo no tratamento da DC é erradicar o parasita dos indivíduos infectados, proporcionando aos pacientes uma menor probabilidade de desenvolver a forma sintomática e suas complicações, além de dificultar a transmissão do parasita (CHAGAS DISEASE - WORLD HEART FEDERATION, 2022).

Atualmente existe dois fármacos disponíveis para o tratamento da DC que são; Benzonidazol (BZN) e Nifurtimox (NFX), seu tratamento requer uma administração prolongada entre (60-90 dias) e são considerados eficazes somente durante o curso da fase aguda da doença (KRATZ, 2019). Nos pacientes tratados com o BZN seu efeito é tripanossomicida, e sua ação é reduzir drasticamente a parasitemia na fase aguda, muito embora, em alguns casos, os parasitas possam resistir ao tratamento e os pacientes possam vir a testar positivo para a infecção em uma nova testagem por PCR. Com isso, a detecção de um marcador de soro-conversão pode ocorrer anos e/ou décadas após o início do tratamento, o que dificulta a conclusão de “CURA” na população infectada (CHATELAIN, 2016; MAZZETI et al., 2021; VILLALTA; RACHAKONDA, 2019). Existe um debate entre a população acadêmica sobre a eficácia do BZN nos pacientes infectados que cursam a fase crônica indeterminada e o seu poder de impedir que pacientes evoluam para o desenvolvimento de cardiopatias e/ou as patologias gastrointestinais (CHATELAIN, 2016; MAZZETI et al., 2021; MORILLO et al., 2017). No entanto, há evidências de alguns estudos que comprovam a redução da morbidade e mortalidade em pacientes tratados com BZN e NFX na fase crônica. Portanto, a OMS recomenda que o tratamento seja oferecido tanto a pacientes que sejam diagnosticados na fase aguda, quanto a paciente cronicamente infectado (OPAS/OMS, 2022).

O BNZ é o medicamento mais utilizado no tratamento da DC e o NFX não tem seu uso disponível para a comercialização no Brasil. Embora o BZN seja o único medicamento para o tratamento da DC, sua eficácia pode apresentar-se inadequada, com seus efeitos colaterais bastante intensos como: anorexia, dor abdominal, náuseas e vômitos (MORILLO et al., 2017; OPAS/OMS 2022; THAKARE; DASGUPTA; CHOPRA, 2021). Os medicamentos atuais para

a DC apresentam muitas limitações que podem comprometer relevantemente seu uso. Desde a oferta que é insuficiente até seus efeitos colaterais que os tornam contraindicados durante a gravidez, pelos seus efeitos genotóxicos, sua administração durante o tratamento produz inúmeros efeitos adversos, cutâneos (BZN) e gastrointestinais (NFX) o que pode levar a interrupção do tratamento (MAZZETI et al., 2021; MORILLO et al., 2017; VILLALTA; RACHAKONDA, 2019).

Os esforços da comunidade científica devem estar voltados na tentativa de entender a biologia de *T. cruzi* e no desenvolvimento de drogas que sejam tóxicas para o parasita, já que as terapias atuais apesar de relevantes, são insuficientes nas situações em que não se consegue a eliminação total do parasita. A ausência da cura parasitológica permite que muitos pacientes chagásicos crônicos ao longo da vida, eventualmente, possam vir a desenvolver complicações cardíacas e gastrointestinais (CHADALAWADA et al., 2020). Alguns estudos demonstram que os parasitas podem persistir no hospedeiro na fase crônica após o tratamento com BZN, sem ter nenhuma relação com resistência ao medicamento (BUSTAMANTE et al., 2020; SÁNCHEZ-VALDÉZ et al., 2018). Assim, surge um entendimento que esses parasitas possam se esconder em um estado de dormência no hospedeiro, com a capacidade de regular seus antígenos, modular as respostas imunológicas e se esquivar de drogas tóxicas sobrevivendo no hospedeiro para poder se replicar em um outro momento. (BUSTAMANTE et al., 2020; MAZZETI et al., 2021; PANDEY et al., 2021; SÁNCHEZ-VALDÉZ et al., 2018).

1.2 *Trypanossoma cruzi* e Invasão Celular

Poucos protozoários comparam-se ao *T. cruzi* em termos de virulência e capacidade de infectar vários tipos de células nucleadas (HORTA et al., 2020). A invasão das células de mamíferos por *T. cruzi* mobiliza diversas estruturas celulares como: receptores de membrana, citoesqueleto de actina e lisossomos; o parasita usa essas estruturas da célula hospedeira durante o processo de infecção, ativando mecanismos celulares distintos e causando diferentes sintomas no hospedeiro, os quais caracterizam a DC (HORTA et al., 2020; MORETTI; MORTARA; SCHENKMAN, 2020; WALKER et al., 2013). O ciclo de vida do parasita apresentado na (Figura 1) tem três formas de desenvolvimento distintas: tripomastigotas, amastigotas e epimastigotas; cada estágio apresenta alterações morfológicas e genéticas que permitem ao

parasita se adaptar a diversos microambientes no hospedeiro invertebrado e vertebrados. (HORTA et al., 2020; MORETTI; MORTARA; SCHENKMAN, 2020).

O ciclo de vida exemplificado na figura considera a transmissão vetorial clássica que se dá a partir do repasto sanguíneo por um inseto hematófago triatomíneo da família Reduviidae (Figura 1); o repasto é realizado em mamíferos, incluindo o homem e outros animais, enquanto o inseto se alimenta de sangue do hospedeiro elimina fezes e urina pelo sistema excretor, liberando formas tripomastigotas metacíclicas infectantes (MORETTI; MORTARA; SCHENKMAN, 2020; ZUMA; DOS SANTOS BARRIAS; DE SOUZA, 2021). As formas tripomastigotas metacíclicas penetra no hospedeiro por meio do local da picada, ou escoriações na pele, atingindo a corrente sanguínea. Uma vez em seu novo hospedeiro invade várias células nucleadas, permanecendo temporariamente em um vacúolo parasitóforo intracelular, onde se diferencia em amastigotas que são formas infectivas e replicativas, apresentam morfologia arredondada e sem flagelo externo; como consequência, por ser uma forma evolutiva infectiva e replicativa do parasita, após o rompimento do vacúolo, multiplicam-se intensamente no citoplasma por divisão binária (HORTA et al., 2020; PATINO; RAMÍREZ, 2017; ZUMA; DOS SANTOS BARRIAS; DE SOUZA, 2021). Após a divisão no citoplasma da célula, as amastigotas se diferenciam em tripomastigotas, rompem a membrana da célula hospedeira, vão para órgãos e tecidos distantes pela corrente sanguínea, podendo em seguida, reiniciar um novo ciclo celular. A partir daí podem ser reconhecidos e destruídos por mecanismos imunológicos do hospedeiro ou serem ingeridos por um novo inseto triatomíneo durante o repasto sanguíneo (HORTA et al., 2020; WALKER et al., 2013; ZUMA; DOS SANTOS BARRIAS; DE SOUZA, 2020). Após serem ingeridos pelo triatomíneo, diferenciam-se em epimastigotas no estômago do vetor, estas são formas não infectivas, porém se replicam intensamente no intestino médio do vetor, para em seguida se diferenciarem em tripomastigotas metacíclicas, devido a um estresse nutricional que são submetidos na porção mais distal do intestino, podendo reiniciar o ciclo no próximo repasto sanguíneo (MORETTI; MORTARA; SCHENKMAN, 2020; ZUMA; DOS SANTOS BARRIAS; DE SOUZA, 2020). *T. cruzi* tem a capacidade de invadir e replicar no interior de muitas células nucleadas, mas pode exibir um tropismo especial por células musculares lisas e, principalmente cardiomiócitos do hospedeiro vertebrado (LIU; ULRICH VONBARGEN; MCCALL, 2021).

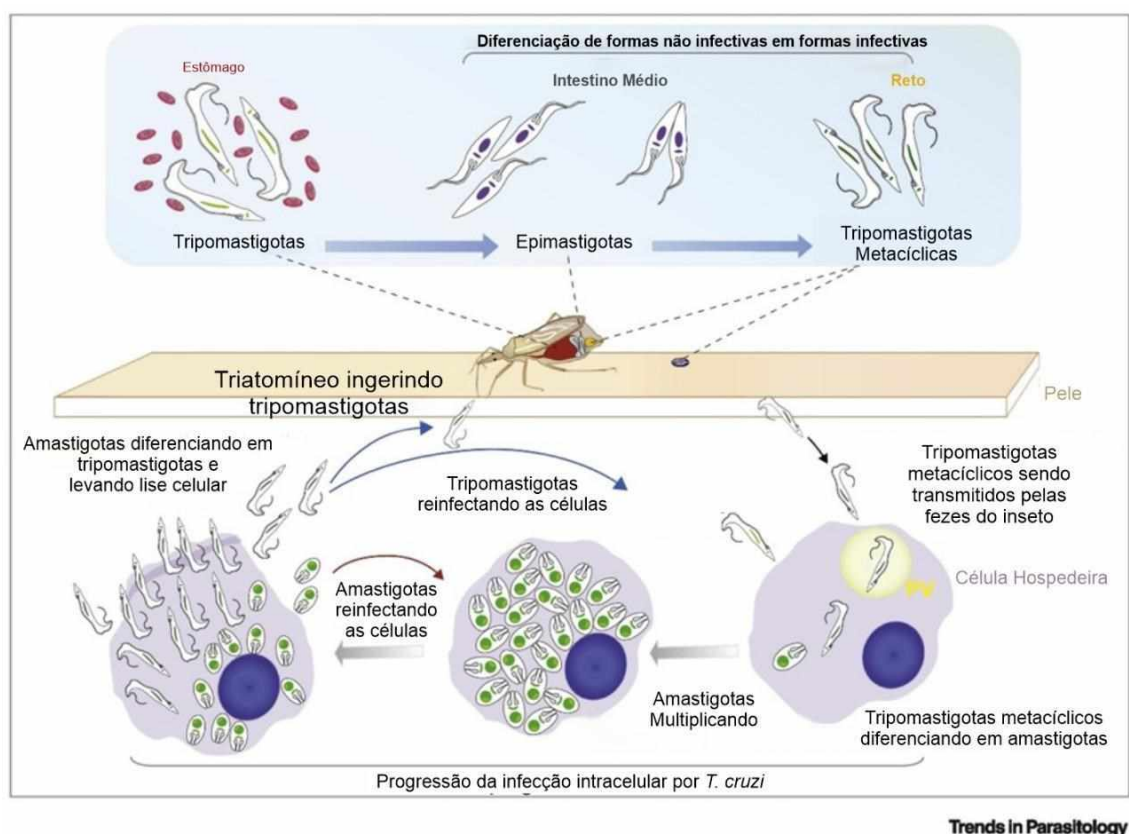


Figura 1. Formas de desenvolvimento de *T. cruzi*, Ciclo de vida no hospedeiro invertebrado e vertebrado, esquema de mecanismo de transmissão vetorial. Fonte adaptada: Trends in Parasitol, Cell Press, 2020 April; 36(4):404-405. DOI: 10.1016/j.pt.2019.10.002.

Muitos eventos se estabelecem no processo de interação patógeno-hospedeiro, um dos eventos iniciais se dá pela invasão celular que pode ser dividida em três etapas distintas que são; adesão, sinalização e interiorização (LOCH et al., 2021; MAEDA et al., 2012; YOSHIDA; CORTEZ, 2008). No processo de adesão celular a forma evolutiva tripomastigota ao se fixar na célula hospedeira desencadeia um processo ativo de invasão com gasto de energia, bem como seu processo de invasão pode ser parcialmente dependente da readequação dos microfilamentos de actina. Alguns estudos demonstram que células pré-tratadas com drogas que rompem os filamentos de actina como; citocalasina D, latrunculina B e jasplakinolida podem inibir a invasão de tripomastigotas metacíclicos (MT) e tripomastigotas de cultura de tecido (TCT) (BONIFÁCIO et al., 2022). Por outro lado, as formas amastigotas extracelulares (AE), durante o processo de reinfecção celular (Fig.1), ao se fixarem na célula hospedeira, ativam um processo de sinalização de maneira dependente dos microfilamentos de actina para completar o processo de interiorização (BONFIM-MELO et al., 2015, 2018; BONIFÁCIO et al., 2022).

Durante o processo de invasão celular por *T. cruzi* há a necessidade da interação parasita-hospedeiro, onde tripomastigotas infectantes acionam vias de sinalização que resultam na formação de vacúolo parasitóforo a partir do recrutamento e fusão de lisossomos à membrana plasmática da célula hospedeira no sítio de invasão pelo parasita. (ANDRADE; ANDREWS, 2004; BONIFÁCIO et al., 2022; CARADONNA; BURLEIGH, 2011). Alguns estudos demonstram que para o sucesso da internalização e permanência dos parasitas na célula hospedeira ocorrer deve haver a polimerização do citoesqueleto de actina, juntamente com a fusão dos lisossomos que garantem a formação do vacúolo parasitóforo. Acredita-se que por cerca de 2 h após a infecção, TCTs rompem esse vacúolo pela ação de uma hemolisina ativa em pH ácido e ficam livres no citoplasma, onde se diferenciam em amastigotas intracelulares e se multiplicam (ANDRADE; ANDREWS, 2004; BARRIAS; DE CARVALHO; DE SOUZA, 2013; COUTO et al., 2017).

Durante a invasão das células por *T. cruzi* em um processo característico de células fagocíticas e não fagocíticas, que é a formação de protusões ricas em filamentos de actina ao redor do parasita, esse fenômeno pode ocorrer tanto em tripomastigotas metacíclicos, e amastigotas extracelulares que podem levar a agregados de filamentos de actina no sítio de adesão e internalização, esse processo resulta na formação de um “cálice” cercando o parasita que culmina na invasão celular (ANDRADE; ANDREWS, 2004; BARRIAS; DE CARVALHO; DE SOUZA, 2013; BONIFÁCIO et al., 2022; CARADONNA; BURLEIGH, 2011; FERNANDES; ANDREWS, 2012; HORTA et al., 2020).

Durante a invasão celular a liberação de cálcio intracelular na célula hospedeira e elevações transitórias e repetitivas das concentrações de cálcio intracelular Ca^{2+} induzidas por *T. cruzi* desempenham um papel importante no recrutamento e fusão de lisossomos. Nesse contexto, um estudo anterior demonstrou que a invasão celular por tripomastigotas é impedida quando a proteína da membrana mitocondrial interna chamada proteína transmembranar 1 (Letm1) envolvida na homeostase de Ca^{2+} e K^{+} em células de mamíferos tem sua expressão reduzida por knockdown (DOS SANTOS et al., 2021). Além disso, outro estudo traz evidências de que TcIP₃ R, um canal importante de liberação de cálcio controlado por IP₃ que regula a desfosforilação de piruvato desidrogenase, consumo de O_2 mitocondrial e prevenção de autofagia em *T. cruzi*, quando depletado por CrispR/Cas9 resulta: a) na redução na taxa de consumo de O_2 e na atividade da citrato sintase; b) na diminuição do transporte mitocondrial de Ca^{2+} sem afetar o potencial de membrana; c) no aumento da produção de amônia e relação

AMP/ATP; d) na estimulação da formação de autofagossomos, e) em defeitos marcantes no crescimento de formas de cultura (epimastigotas), f) na redução da invasão de células hospedeiras por tripomastigotas (CHIURILLO et al., 2020; DOS SANTOS et al., 2021).

No intestino médio do triatomíneo, ambiente no qual *T. cruzi* se encontra após o repasto sanguíneo, apresenta grandes quantidades de hemoglobina que são degradadas, resultando na liberação do grupo heme, uma molécula bem descrita na literatura que pode aumentar a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (LARA et al., 2007; RYTER; TYRRELL, 2000). Assim, o intestino médio do vetor pode ser caracterizado com um microambiente oxidativo, mas nutritivo, que vai favorecer a intensa proliferação de formas epimastigotas, e posteriormente, no compartimento final do trato intestinal do vetor a diferenciação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos (pela metaciclogênese), um processo natural e obrigatório para a continuidade do ciclo de vida de *T. cruzi* (KOLLIEN; SCHAUB, 1997). Por ser um microrganismo intracelular, *T. cruzi* desenvolveu a habilidade de resistir a explosão oxidativa, devido as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que são ativadas pelo sistema imunológico do hospedeiro. Com isso, o parasita desenvolveu mecanismos de lidar com essas interações oxidativas e usá-las para seu próprio benefício que ocorre durante as interações parasita-célula, sendo assim, de forma eficiente, ele usa ROS para crescer e proliferar (MALDONADO et al., 2020).

1.3 Moléculas da célula hospedeira e do parasita envolvidos na invasão celular

T. cruzi apresenta um ciclo de vida complexo incluindo duas formas tripomastigotas diferentes que são: tripomastigotas metacíclicos e tripomastigotas sanguíneos. Estas formas tripomastigotas apresentam características morfológicas diferentes e são bioquimicamente e antigenicamente distintas; e que para invadir a célula hospedeira utilizam mecanismos e conjunto de moléculas de superfície e/ou secretadas diferentes. No momento da infecção, as formas infectivas de *T. cruzi* enfrentam a necessidade de transpor a matriz extracelular (MEC) e infectar as células do hospedeiro, durante esse percurso moléculas sinalizadoras são secretadas, e desempenham um papel importante na relação parasita e célula hospedeira. O parasita navega na MEC que é composta por uma rede tridimensional de macromoléculas não celulares altamente complexa, que tem a função de regular diferentes atividades celulares como;

crescimento, diferenciação ou sobrevivência. É composta por elementos estruturais importantes como; colágenos, proteoglicanos e glicoproteínas (NABA et al., 2016).

Por outro lado as proteínas de *T. cruzi* envolvidas na invasão celular são, principalmente, as proteínas da família Trans-sialidase (TS) (Gp85, Gp82 e TSA-1), Gp35/50, Gp83, penetrina, cruzipaina, oligopeptidase B, Tc80 e TcCalreticulina que participam da infectividade e a expressão dessas proteínas podem ser variáveis em diferentes estágios das formas evolutivas do parasita e entre as diferentes cepas (EAKIN et al., 1992; EUGENIA GIORGI; DE LEDERKREMER, 2011; HERREROS-CABELLO et al., 2019; MAGDESIAN et al., 2007; MATTOS et al., 2014; RAMÍREZ et al., 2011; SAN FRANCISCO et al., 2017).

Durante o momento inicial de invasão ao hospedeiro as formas tripomastigotas metacíclicas promovem um processo de adesão a elementos distintos da MEC na pele, que é a uma barreira física importante imposta ao parasita, sendo assim, ele consegue secretar proteínas de superfície como as da família gp85/ transialidase (descrita em TCTs) que tem um papel facilitador ao parasita para que ele consiga transpor a MEC e chegar até as células (MATTOS et al., 2014). O parasita durante esse processo estabelece uma relação importante com as fibras de colágeno, fibronectina, laminina, trombospondina, sulfato de heparan e galectina-3 para que entrada com sucesso do parasita no hospedeiro (DA SILVA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2008; OUAISSI et al., 1986; PINEDA et al., 2015; VELGE et al., 1988).

Muitas moléculas como a glicoproteína Gp85 são membros das superfamílias Gp85/ Trans-sialidase e são capazes de ativar múltiplas vias de sinalização que estão associadas à invasão de células de mamíferos pelo parasita. Nesse contexto, há estudos que demonstram mais de 700 genes da família Gp85/trans-sialidase no genoma do parasita e acredita-se que proteínas codificadas por esta família participam no processo de adesão e invasão da célula hospedeira além de interagir com estruturas da MEC (MAGDESIAN et al., 2007; MATTOS et al., 2014). Cruzipaina que é uma cisteína peptidase que está envolvida na evasão do sistema imune do hospedeiro, bem como na invasão da célula e no desenvolvimento intracelular (MAGDESIAN et al., 2007; MATTOS et al., 2014; SAN FRANCISCO et al., 2017). Essas proteínas são isoformas expressas como zimogênios que sofrem maturação após a remoção proteolítica do domínio N-terminal e são expressas ao longo do ciclo de vida do parasita e vão se acumulando em organelas ácidas semelhantes a lisossomos chamados de reservossomos (ANA PAULA et al., 1994; CAMPETELLA et al., 1992; EAKIN et al., 1992).

Duas outras proteínas de membrana do parasita podem desempenhar papel preponderante na capacidade infectiva das diferentes cepas de forma dependente da expressão de cada uma dessas proteínas. Trata-se da gp82 e gp90, proteínas expressas exclusivamente por tripomastigotas metacíclicos. A proteína gp82 está diretamente envolvida na invasão celular sendo um regulador positivo do processo de internalização do parasita, enquanto a gp90, expressa preponderantemente em cepas pouco infectivas, constitui em um regulador negativo da invasão celular por tripomastigotas metacíclicos (CORDERO et al., 2019a; CORTEZ et al., 2014; RODRIGUES et al., 2017).

A proteína gp83 é uma glicoproteína da família trans-sialidase ancorada a GPI importante em tripomastigotas de *T. cruzi* como um ligante para dar início a infecção a célula hospedeira (FARROW et al., 2014). Esta proteína é uma molécula importante liberada pelas formas tripomastigotas por mecanismos dependente de fosfolipase C do parasita e sinaliza a célula hospedeira para promover a invasão ativando vias dependentes da proteína quinase C (VILLALTA et al., 1999). Estudos anteriores demonstram que peptídeos da proteína gp83 incorporados em vetores de adenovírus formando um complexo (Ad5-gp83) que pode ser utilizado como um modelo vacinal contra a DC, sendo capaz de promover uma imunoproteção contra a infecção por *T. cruzi* (MATTHEWS et al., 2016).

O parasita possui outra proteinase que é a Tc80 caracterizada como pertencente à família prolil oligopeptidase que é uma enzima expressa por tripomastigotas sanguíneo e por amastigotas intracelular replicativas. A Tc80 é secretada pelo parasita, e tem a capacidade de degradar componentes da matriz extracelular como colágeno e fibronectina, o que colabora com a invasão do parasita nas células hospedeiras (BIVONA et al., 2018; GRELLIER et al., 2001). Ao se investigar alguns inibidores seletivos para Tc80 foi observado que eles foram capazes de bloquear a infecção do parasita *in vitro*. (GRELLIER et al., 2001). Ademais, camundongos imunizados com Tc80 foram capazes de produzir anticorpos específicos que desenvolveram diferentes funções como; inibição enzimática, neutralização da infecção parasitária e lise de tripomastigotas mediadas pelo sistema complemento (BIVONA et al., 2018).

Além disso, nosso grupo de pesquisadores identificou em *T. cruzi* uma proteína de 21 kDa que está envolvida na invasão celular, a qual foi nomeada como P21 (DA SILVA et al., 2009). Diversos estudos têm sido realizados para compreender o papel dessa proteína na biologia de *T. cruzi*. Abaixo discutiremos um pouco mais sobre as atividades biológicas já descritas.

1.4 Proteína P21 de *Trypanosoma cruzi*

A proteína P21 é caracterizada como uma proteína ubíqua, secretada por todas as formas evolutivas do parasita. Apresenta diferentes propriedades e características biológicas que beneficiam *T. cruzi* no momento de sua invasão e permanência dentro do hospedeiro, por ser secretada em diferentes microambientes, ela pode possuir uma característica imunomoduladora com potentes propriedades bioativas (MARTINS et al., 2020; RODRIGUES et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2017).

Por meio de tecnologia de DNA recombinante, clonamos o gene da proteína P21 nativa em um plasmídeo (pet28A), o qual foi transfectado e incorporado ao genoma de bactérias *E. coli* tendo em vista obter a forma recombinante dessa proteína (DA SILVA et al., 2009). Possuindo 18 kDa e apresentando uma cauda de poli-histidina, a purificação da proteína recombinante P21 (rP21) é realizada a partir de culturas de *E. coli* e utilizando cromatografia de afinidade em coluna de níquel. Assim, a proteína P21 recombinante (rP21) vem sendo utilizada em vários estudos para elucidar a sua função sobre os aspectos biológicos de *T. cruzi* e sua importância na interação patógeno-hospedeiro (DA SILVA et al., 2009; SANTOS et al., 2014)

Em um outro estudo foi demonstrado que o tratamento com a proteína rP21 aumenta a capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais por um mecanismo dependente da ligação da P21 ao receptor de quimiocinas CXCR4 (RODRIGUES et al., 2012). Por meio dessa ligação a célula induz a polimerização do citoesqueleto de actina da célula hospedeira e ativa a via de sinalização celular mediada por via PI3-quinase de forma independente de AKT (SANTOS et al., 2014). A rP21 caracteriza-se por estimular a atividade pró-fagocítica de macrófagos, o que influencia de forma positiva no processo de invasão celular pelo parasito nas células hospedeiras, que são estimuladas a internalizarem o parasito, aumentando o processo de invasão dessas células pelo protozoário (RODRIGUES et al., 2012).

Por possuir uma característica pró-fagocítica a rP21 permite que o parasita se mantenha intracelularmente, onde ele pode romper o compartimento do vacúolo parasitóforo e se replicar livremente dentro do citoplasma da célula hospedeira; em contrapartida, a célula pode retardar a replicação do parasito através da polimerização do citoesqueleto de actina (TEIXEIRA et al., 2017). Para avaliar o papel do citoesqueleto de actina durante a infecção experimental por *T. cruzi*, realizou-se ensaios de invasão infectando macrófagos e mioblastos com tripomastigotas

de cultura de tecido e, após 96 horas, os mesmos foram tratados com INF- γ ou rP21 e analisados quanto a multiplicação parasitária, bem como a polimerização do citoesqueleto de actina. Os dados mostraram que tanto as células tratadas com IFN- γ quanto com rP21 apresentaram um citoesqueleto mais polimerizado e menor multiplicação intracelular (MARTINS et al., 2020).

Em um outro estudo foi avaliado a inflamação crônica em implante de esponjas de poliéster no dorso de camundongos. As esponjas implantadas receberam, a cada 72 horas durante nove dias, tratamento com rP21 (40 μ g), extrato bacteriano ou PBS. Após os 9 dias de tratamento os animais foram eutanasiados e as esponjas foram removidas cirurgicamente para análises bioquímicas e histológicas e foi observado um aumento significativo na produção de Mieloperoxidase (MPO), uma enzima expressa por neutrófilos ativados, o que evidencia a habilidade da rP21 em recrutar células do sistema imune, como macrófagos, linfócitos e neutrófilos. Além disso, foi visto o recrutamento de mastócitos e uma redução relevante no conteúdo de hemoglobina nos vasos presentes nos implantes de esponjas, o que demonstra um potencial quimiotático e antiangiogênico da rP21. Nesse mesmo estudo foi investigado a capacidade da rP21 em induzir migração de macrófagos peritoneais *in vitro* e *in vivo* por *transwell* que contém uma membrana de policarbonato. Os dados demonstram que a rP21 induz a migração de macrófagos *in vitro* e *in vivo*, a atividade quimiotática também foi avaliada pela injeção de rP21 intraperitoneal em camundongos, e foi analisado o recrutamento celular em diferentes momentos em comparação com grupos controles de injeção com PBS e extrato bacteriano. Os resultados demonstraram entre 2-6 horas pós-tratamento, a rP21 foi capaz de induzir um aumento do recrutamento de leucócitos totais em comparação aos grupos controles (TEIXEIRA et al., 2015).

A proteína rP21 utiliza o receptor CXCR4, um receptor de quimiocinas que está associado a migração celular. O ligante de CXCR4 é o fator derivado de células estromais (SDF), também conhecido como ligante de motivo CXC (CXCL) 12 (BALESTRIERI et al., 2008; KAWAGUCHI; ZHANG; NAKANISHI, 2019). Sabendo que a P21 é um ligante do CXCR4 e que este receptor é altamente expresso em células tumorais de mama (MDA-MB-231), nosso grupo de pesquisa realizou um estudo, em uma outra abordagem, no qual a proteína rP21 foi incubada juntamente com células MDA. Foi observado que o tratamento com a rP21 foi capaz de se ligar aos receptores CXCR4 presentes nas membranas das células e internalizá-los. Além disso, a presença da rP21 bloqueou o ciclo celular, estabilizando-o na fase G1 na maioria das células MDA-MB-231, os resultados apontam que a migração e invasão induzidas

pelo CXCL12 e reprimidas pela rP21 é devido a diminuição da expressão MMP-9. Assim, o tratamento com a rP21 foi capaz de reduzir a quimiotaxia e proliferação induzida por CXCL12 ao regular negativamente a expressão do gene CXCR4 contribuindo para prevenir a migração, invasão e progressão em células MDA-MB-231 (BORGES et al., 2020).

A presença da proteína P21 é de fundamental importância para a permanência do parasita dentro da célula durante a replicação. O estudo desenvolvido por Teixeira (2019) e colaboradores demonstra que além de suas atividades biológicas já exploradas até aqui, o tratamento de camundongos infectados por *T. cruzi* com a rP21 foi capaz de inibir a replicação de amastigotas intracelulares e modular o ciclo celular do parasita, bem como reduzir a carga parasitária, angiogênese e induzir fibrose no tecido cardíaco dos camundongos infectados (TEIXEIRA et al., 2019), sugerindo o envolvimento da P21 na patogênese da Doença de Chagas.

Um outro estudo foi capaz de apontar que a ação da proteína P21 pode impactar também na replicação do parasita em linhagens de células musculares e no parasitismo de *T. cruzi* durante a infecção experimental aguda. Foi observado que a proteína recombinante P21 foi capaz de diminuir a multiplicação do parasita em mioblastos C2C12 e esse fenômeno pode estar associado a maior polimerização do citoesqueleto de actina e maior expressão de IFN- γ e IL4. Além disso, puderam avaliar também que havia menos ninhos de amastigotas no tecido cardíaco, com um infiltrado inflamatório menor e menor fibrose em camundongos infectados e tratados com a rP21. Os autores concluíram que a proteína rP21 pode ser usada pelo parasita no controle da replicação como um mecanismo evolutivo de sobrevivência desenvolvido pelo parasita, o que auxilia no entendimento de que o protozoário pode produzir mais proteína P21 e induzir um estado de latência no hospedeiro e conseguir evadir do sistema imunológico (MARTINS et al., 2020).

A permanência do parasita no ambiente intracelular após a invasão celular, assim como a regulação da replicação de amastigotas nas células infectadas, processos no qual ocorre a participação da P21, sugerem que ela desempenhe um papel crucial na interação com células hospedeiras, o que garante ao protozoário a perpetuação da infecção ao longo dos anos, com baixa parasitemia, permitindo a progressão para a fase crônica da doença. Assim, as atividades biológicas da P21 descritas até agora norteia um novo horizonte para novos estudos que poderão trazer benefícios para terapias contra DC e CCC que tenham a P21 como alvo terapêutico.

1.5 CRISPR/Cas9, *Trypanosoma cruzi* e P21

A metodologia CRISPR/Cas9 popularmente divulgada e ampliada no meio acadêmico se tornou uma ferramenta bastante utilizada para edição de genomas de uma variedade de organismos de maneira eficiente e rápida (MA; ZHANG; HUANG, 2014). A sigla CRISPR/Cas9 pode ser traduzida como repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente inter espaçadas (CRISPR). Sua aplicabilidade e vantagens, vem sendo exploradas cada dia mais como uma ferramenta da engenharia genética que se tornou popular pelas suas aplicações biológicas e terapêuticas (HRYHOROWICZ et al., 2017). A edição genética em sítios específicos dentro de um gene de interesse tem sido considerada uma metodologia padrão para compreender a função de um gene, além de poder criar modelos animais de doenças e melhorar características desejadas em animais e plantas (YADAV et al., 2021).

A abordagem da técnica CRISPR/Cas9 foi descrita pela primeira vez através da presença de um sistema imunológico adaptativo em bactérias e arqueas, e posteriormente projetada em outros organismos, utilizando nucleases guiadas por um RNA para edição de genoma. Um dos sistemas mais utilizados é o sistema CRISPR-Cas9 II, no qual consiste na montagem de um complexo de ribonucleoproteína, composto por um RNA CRISPR (crRNA) e uma proteína Cas9. Esse crRNA detém informações para atingir uma sequência de DNA específica e as nucleases tem domínios para clivar a fita dupla de DNA no local indicado em um gene por complementaridade entre o crRNA e a sequência do gene alvo. O RNA CRISPR (crRNA) que interage com um crRNA transativador (tracrRNA) para se formar um duplex crRNA-tracrRNA este complexo de RNA formará o RNA guia (sgRNA) que irá direcionar a nuclease de *Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpCas9) para locais específicos, após o reconhecimento da sequência PAM (Protospacer Adjacent Motif) que é adjacente ao DNA alvo, permitindo gerar uma quebra na fita dupla de DNA (JINEK et al., 2012; YADAV et al., 2021). Devido essa quebra no DNA, é ativado um mecanismo de reparo que pode ocorrer por meio de junção de extremidade não homóloga propensa a erros (NHEJ) ou também por reparo dirigido por homologia (HDR) (HUSSMANN et al., 2021). Havendo a presença de um molde doador com homologia com o locus alvo, a via HDR é ativada, o que permite que mutações precisas sejam realizadas. Ocorrendo a ausência de um molde para o reparo por homologia, o NHEJ é ativado, resultando em inserções ou deleções de sequências gênicas (indels) que interrompem o locus

alvo, causando uma mutação (BARMAN; DEB; CHAKRABORTY, 2020; YADAV et al., 2021).

Desde a sua descrição há mais de 10 anos, o sistema CRISPR/Cas9 guiado pelo sgRNA tem sido aplicado para modificar genes endógenos em várias células e organismos que incluem bactérias (JIANG et al., 2013), leveduras (DICARLO et al., 2013), plantas (LI et al., 2013) camundongos (SHEN et al., 2013) células humanas (BURGESS, 2013; MALI et al., 2013) e protozoários (ISHEMGULOVA et al., 2018; LANDER et al., 2015; LIN et al., 2019). Em *T. cruzi*, CRISPR/Cas9 vem sendo utilizada no silenciamento de genes possibilitando explorar a função de inúmeras proteínas de forma mais precisa. Em um estudo anterior, os autores avaliaram o silenciamento de genes que codificam a proteína GP72, uma proteína importante para a fixação flagelar, e também proteínas que compõem a haste paraflagelar 1 e 2 (PRF1 e PRF2) que são proteínas importantes na composição do flagelo do parasita, esses genes foram interrompidos e os resultados demonstraram que a edição gênica em *T. cruzi* foi bem-sucedida sem apresentar toxicidade na presença da Cas9. Além disso, o silenciamento dos genes TcPFR1 e TcPFR2 provocou uma ruptura na base de fixação flagelar ao corpo celular o que permite a motilidade do parasita, sendo assim, as células mutantes apresentaram desprendimento flagelar pela ruptura induzida, o que demonstrou uma diminuição do crescimento em nível populacional e que sugeriu um papel essencial do gene comprovando que o método pode aprimorar as análises funcionais do genoma de *T. cruzi* (LANDER et al., 2015).

A metodologia CRISPR/Cas9 tem tido aplicações na análise de genes de várias proteínas, algumas que se caracterizam por apresentar um papel crucial na sobrevivência e virulência do parasita. Um outro estudo desenvolvido Lander (2020), avaliou a regulação negativa do nível de mRNA que codifica a glicoproteína 72 (TcGP72) e a pirofosfatase de prótons vacuolar (TcVP1), apontando que a TcVP1 não é essencial para a viabilidade de epimastigotas ou em estágios infecciosos, não obstante, seja essencial para o crescimento normal de epimastigotas em meio rico, e para a invasão de tripomastigotas em células do hospedeiro, demonstrando que o método CRISPR/Cas9 pode ser utilizado em genes essenciais do parasita, o que pode validar potenciais alvos terapêuticos (LANDER; CRUZ-BUSTOS; DOCAMPO, 2020).

Em um estudo realizado por Malvezzi (2020), foi avaliado o papel da TcK1, uma proteína quinase caracterizada como ortóloga a um controle geral não repressível 2 (GCN2) que tem a capacidade de fosforilar a subunidade alfa do fator de iniciação eucariótica 2 (eIF2 α).

Os parasitas nocautes para TcK1, sobre um estresse nutricional, mostraram acúmulo reduzido de grânulos de RNA de estresse, de forma independente de fosforilação de eIF2 α o que contribuiu no aumento da metaciclogênese na ausência de TcK1, embora, os tripomastigotas metacíclicos demonstraram uma menor infectividade em células hospedeiras de mamíferos (MALVEZZI et al., 2020).

Já esse outro estudo desenvolvido por GRAZIELLE-SILVA (2020), os autores investigaram o envolvimento do componente MSH6 de reparo de incompatibilidade de DNA, são componentes importantes na via central eucariótica de DNA Mismatch Repair (MMR) que tem a função de reconhecer e corrigir erros de base que ocorrem durante a replicação e recombinação de DNA do parasita. Foi avaliado que em resposta ao estresse oxidativo em *T. cruzi* os mutantes nulos de MSH6 tiveram perda de um ou dois alelos em MSH6 do parasita o que resultou em um aumento da suscetibilidade a exposição de H₂O₂ além de ter a MMR prejudicada (GRAZIELLE-SILVA et al., 2020).

Recentemente foi descrito que a clivagem no gene da proteína P21 pela metodologia CRISPR/Cas9 em parasitas da cepa Y provocou uma redução na taxa de crescimento de epimastigotas, bem como um atraso na progressão do ciclo celular. Contudo, os parasitas P21 nocautes seguiram viáveis e capazes de se diferenciar em tripomastigotas metacíclicos que apresentaram uma taxa de invasão celular reduzida, o que confirma que a P21 tem um papel importante na invasão da célula hospedeira. Em contrapartida, os parasitas nocautes para a P21 demonstraram uma maior taxa de replicação intracelular, o que demonstra que uma vez o parasita dentro da célula, a proteína P21 pode estar envolvida como um regulador negativo da proliferação de amastigotas (TEIXEIRA et al., 2022). Neste trabalho, obtivemos parasitos P21 nocautes para a cepa G, utilizando CRISPR/Cas9 e estudamos o fenótipo apresentado por estes parasitas quando comparados ao controle selvagem.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Obter parasitas nocautes por meio da deleção no gene da proteína P21 pelo sistema CRISPR/Cas9 em *T. cruzi* cepa G e avaliar as características fenotípicas desses parasitas no processo de infecção (invasão e replicação) em células de mamíferos comparados ao parasita selvagem.

2.2 Objetivos específicos

- Transfectar as formas epimastigotas da cepa G com o plasmídeo Cas9-EGFP e selecionar os parasitas com antibiótico G418 para obter uma linhagem populacional que expresse a nuclease Cas9 de forma constitutiva.
- Realizar a interrupção do gene P21, transfectando a linhagem Cas9/EGFP com dois RNA guias e DNA doadores contendo o gene de resistência a blasticidina e/ou gene de resistência a higromicina.
- Selecionar a população nocaute para P21 tratando os parasitas com blasticidina (50µg/ml) e higromicina (350µg/ml) e realizar clonagem por diluição limitante para obter clones nocautes bi alélicos.
- Avaliar a expressão do gene P21 em clones P21/KO por PCR convencional.
- Analisar a expressão da P21 por imunofluorescência e por PCR a partir da extração de RNA total dos parasitos nocautes e WT da cepa G e obtenção do cDNA.
- Analisar por imunofluorescência a expressão da proteína P21 nos clones nocautes após a deleção do gene P21 em *T. cruzi* cepa G.
- Investigar o locus gênico da P21 nos parasitas nocautes ao longo do ciclo evolutivo *in vitro* em *T. cruzi* cepa G.
- Avaliar a curva de crescimento de epimastigotas oriundas da edição do genoma pelo sistema CRISPR/Cas9 no gene da proteína P21 de *T. cruzi* cepa G.
- Investigar se a ausência do gene P21 afeta a invasão de células hospedeiras analisando a porcentagem de células infectadas e a taxa de invasão pelo número de parasitas internalizados

- Avaliar se a deleção no gene da P21 tem impacto na replicação intracelular de parasitas metacíclicos e de tripomastigotas de cultura, contabilizados pelo número de parasitas internalizados.
- Avaliar a taxa de eclosão das formas infectantes tripomastigotas e amastigotas provenientes de células Vero nos grupos WT, CAS9 e TcP21^{-/-}.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura de células

Células da linhagem VERO, (fibroblasto de rim de macaco verde) (HULL; CHERRY; TRITCH, 1962), foram mantidas em cultivo em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium/high glucose - Cultilab) suplementado com 1% de penicilina, estreptomicina (InLab), Gentamicina (GoldBio) e 10% de soro fetal bovino. A manipulação das células foi obtida após a confluência de uma monocamada de células em garrafa de cultivo celular de 250 ml, 75cm², as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas com solução de Tripsina-EDTA 0,05% (Vitrocell) e ressuspensas com meio DMEM. Todas as culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO².

Epimastigotas nocautes de *T. cruzi* cepa G foram gerados em colaboração com o Laboratório coordenado pelo Prof. Dr. José Franco da Silveira da Universidade Federal de São Paulo em um projeto compartilhado pela Pós-Doutoranda Dra. Thaise Lara Teixeira da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Os parasitas foram cultivados em meio infusão de triptose de fígado (LIT) contendo 10% de Soro Fetal Bovino (FBS; Invitrogen). *Epimastigotas de T. cruzi* de tipo selvagem (WT) foram mantidas somente em meio LIT suplementado com 10% SBF. Já as formas epimastigotas CAS9 que somente expressão Cas9 de forma constitutiva, foram mantidas em meio LIT com 10% SFB suplementado com antibiótico (G418, 250µg/ml). As linhagens celulares mutantes CRISPR/ Cas9 nocautes para a P21 (TcP21^{-/-}) foram mantidas em meio LIT suplementado com antibióticos (G418, 250µg/ml; blasticidina 50µg/ml; higromicina 350µg/ml). Os parasitas foram mantidos a 28°C e em meio LIT (contendo os antibióticos) para determinarmos a taxa de crescimento de epimastigotas durante 12 dias de incubação o número de células foi determinado por contagem em câmara de Neubauer. Para diferenciarmos epimastigotas em formas tripomastigotas metacíclicas, os epimastigotas foram mantidos em meio LIT (10% SFB) e os parasitas foram cultivados por 14 dias e logo após foram purificados seguindo o protocolo descrito (TEIXEIRA; YOSHIDA, 1986b) foi realizada a contagem de formas tripomastigotas metacíclicas em câmara de Neubauer para realização dos ensaios.

3.2 Geração de parasitas nocautes no gene da proteína P21.

Para obter parasitas nocautes para a proteína P21 cultivamos as formas epimastigotas da cepa G em fase log de crescimento que foram transfectadas com o vetor Cas9/pTREX-n (LANDER et al., 2015) (Addgene plasmid #68708) (Figura 2 B). Os parasitas transfectados foram cultivados em frascos de cultura de células com 10 mL de meio LIT suplementado com 10% SFB. O antibiótico de seleção G418 (250 µg/mL) foi adicionado 24 horas após a transfecção, a população de parasitas Cas9-GFP positiva foram classificadas por citometria de fluxo 15 dias após a transfecção por BD FACSARIA II (Becton-Dickinson, San Jose, CA, EUA).

As sequências dos sgRNAs com os protoespaçadores foi realizada usando o software EuPaGDT(Eukaryotic Pathogen CRISPR Guide RNA/DNA Design Tool, <http://gna.ctegd.uga.edu/>), a análise feita *in silico* permitiu escolher dois protoespaçadores específicos, contendo duas regiões de clivagem no gene alvo da proteína P21. (PENG; TARLETON, 2015). Os modelos de DNA para transcrição em sgRNA *in vitro* foram gerados por PCR para amplificar a sequência do andaime de sgRNA do plasmídeo pUC_sgRNA (Figura 2 A) usando primers contendo a sequência do promotor T7 e o protoespaçador de 20 pb em um primer reverso de sgRNA universal (Tabela 1). Os RNAs guias foram transcritos *in vitro* usando o kit MEGAShortscript T7 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) seguindo as recomendações do fabricante. Como controle da reação foi usado um fragmento de 80 pb de rRNA 18S humano transcrito do PTRI-RNA.

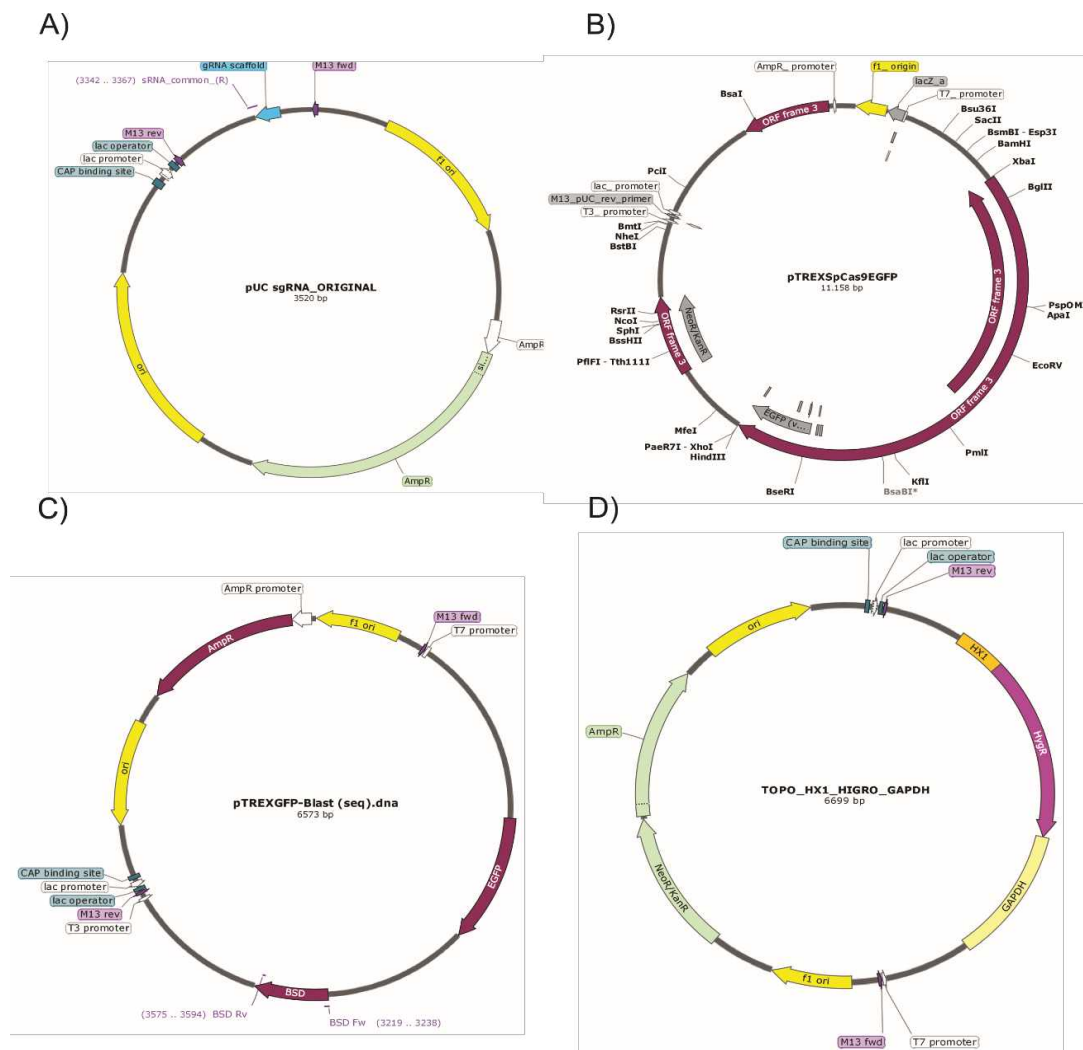


Figura 2. Mapas de vetores utilizados no sistema CRISPR/Cas9 a partir de um vetor puc_sgRNA scaffold para promover a deleção do gene da proteína P21 em *T. cruzi* cepa G **A)** Modelo de vetor quimérico pUC_sgRNA scaffold que abrigou dois protoespaçadores específicos, contendo regiões de clivagem no gene alvo da proteína P21. **B)** Vetor pTREXSpCas9GFP para obter linhagens celulares expressando Cas9 de forma constitutiva **C)** Vetor pTREX-GFP-Blast, contendo os braços de homologia e o gene de resistência a blasticidina para promover HRD na região UTR do gene da P21 **D)** Vetor Topo_Hx1_Higro, contendo os braços de homologia e o gene de resistência a higromicina para promover HRD na região UTR do gene da P21.

Para gerar o DNA doador produzimos uma sequência molde para recombinação homóloga amplificada por PCR usando primers ultrameros de 100 pb (Tabela 1) que consiste em uma sequência de 80 pb correspondente a regiões localizadas a montante ou jusante a Cas9 com o local alvo do gene da proteína P21, e uma sequência de 20 pb para hibridização em BSD ou HyG que são genes de resistência contidos nos vetores pGEM-bsd ou TOPO-hygro (Figura 2 C e D) que foram utilizados como modelo para a PCR (LANDER et al., 2015; LANDER; CHIURILLO, 2019). A PCR foi realizada com as seguintes condições de ciclagem (Taq DNA

polimerase 10342-020 – Thermo): desnaturação inicial para 3 min a 94°C, seguindo de 30 ciclos por 45 s a 94°C, 30 s a 58°C e 90s a 72°C e uma extensão final por 4 min a 72 C.

Primers		
1	sgRNA_36 Fw	GGAGGCCGGAGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGAGGCGCCTGCAGC GTGTCGGCCGGTTTATAGAGCTAGAAATAGCAAG
2	sgRNA_424 Fw	GGAGGCCGGAGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGAGGTTCTACAAAG ATACCGTGGTGTTTATAGAGCTAGAAATAGCAAG
3	sgRNA_all genes Rv	CAGTGGATCCAAAAAGCACCGACTCGGT
4	Bsd_ultramer Fw	GTGTGAGAATAGGCTTTGTAAAAGGAATTTAATTTTACGGACACATCTCGCTA AACAGCAGCAACAACAGCAGGAGGAGCATGGCCAAGCCTTTGTCTCA
5	Bsd_ultramer Rv	TCATTTTCCATACAGTTGTCAGGCTGCCCCTTCTCTCCTCTCCTGCAGCC GTGAAGAATCCCCCATTCCGAGGTGTTAGCCCTCCCACACATAAC
6	Hygro_ultramer Fw	GTGTGAGAATAGGCTTTGTAAAAGGAATTTAATTTTACGGACACATCTCGCTA AACAGCAGCAACAACAGCAGGAGGAGCATGAAAAAGCCTGAAGCTCAC
7	Hygro_ultramer Rv	TCATTTTCCATACAGTTGTCAGGCTGCCCCTTCTCTCCTCTCCTGCAGCC GTGAAGAATCCCCCATTCCGAGGTGCTATTCCTTTGCCCTCGGAC
8	P21 Fw	GATACAACCACAAGGAGCC
9	P21 Rv	TTACTGGCGTCTGTGGAATC
10	UTR P21 Fw	GCCTCCATCCACATTTTCATG
11	UTR P21 Rv	AACGTCCAATTAGGTCTTGTA
12	TcHGPRT Fw	CTACAAGGGAAAGGGTCTGC
13	TcHGPRT Rv	ACCGTAGCCAATCACAAAGG
14	TcMVK Fw	CGGCCGCGACATTTGGT
15	TcMVK Rv	GGCACTTCTAGGGCACGCAG

Tabela 1. Esquema de primers utilizados para gerar clones nocautes no gene da proteína P21 por CRISPR/Cas9 em *T. cruzi* da cepa G, e confirmação de clones TcP21^{-/-} por RT-PCR.

3.3 Transfecção Celular

Para cada transfecção, epimastigotas de *T. cruzi* cepa G em fase log precoce 1×10^7 , foram lavadas com solução tamponada com salina-fosfato (PBS; pH 7,4), ressuspensas em 100 μ L de P3 Primary Cell 4D-Nucleofector (V4XP-3024) e eletroporadas usando o programa EH-100 em 4D Nucleofector pelo sistema (Lonza) e transfectadas com 25 μ g de plasmídeo Cas9/p-TREX-n que é um vetor que permite a expressão gênica constitutiva acionada por um promotor de genes ribossomais, com isso o gene da nuclease Cas9 é inserido e integrado na sequência do locus do DNA ribossomal, com isso o estudo descrito a seguir comprova que edição de genes endógenos é bem sucedida e demonstra não haver toxicidade detectável pela Cas9 (LANDER et al., 2015). Após seleção com G418 e classificação, a população Cas9-GFP que expressam a Cas9 constitutivamente foram transfectadas com 20 μ L de sgRNAs específicos e 25 μ L de DNA doador (Tabela 1). Após dois pulsos elétricos, as linhagens celulares mutantes CRISPR/Cas9 foram mantidas em meio LIT suplementado com 20% de SFB e mantidas sob antibióticos de seleção com 250 μ g/mL G418, 25 μ L de Blastidina e 300 μ g/mL de higromicina.

Em seguida o DNA genômico das populações de epimastigotas foi extraído do Tipo Selvagem (WT), Cas9-GFP (CAS9) e dos clones nocautes TcP21^{-/-} usando o DNeasy Blood e Tissue Kit (69506; Qiagen) e utilizados em PCR para analisar os genes de resistência Blastidina (BSD), Higromicina (HyG) e da P21. As condições da PCR foram as seguintes: desnaturação inicial por 3 min a 94°C seguido de 30 ciclos por 45 s a 94°C, 150 s a 60°C e 45 s a 72°C e uma extensão final por 4 min a 72°C, sendo que os oligonucleotídeos usados estão listados na Tabela 1.

3.3 Extração de RNA total e síntese de cDNA por RT-PCR

O RNA total dos parasitas WT, CAS9 e TcP21^{-/-} foi extraído usando o kit PureLink RNA mini (12183018; Invitrogen) e tratado com a DNase I (Sigma Aldrich). A primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir de RNA total (1 μ g) e oligo (dT) iniciadores usando o Sistema de Síntese de Primeira Fila Superscript III (18080051; Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. A PCR foi realizada para amplificar P21 e os controles de limpeza endógenos

TcHGPRT (MURTA et al., 2006) e TcMVK (FERREIRA et al., 2016), usando os primers listados na tabela 1.

3.4 Análise de imunofluorescência da expressão de P21.

Os clones TcP21^{-/-}, WT e P21 foram fixados com paraformaldeído a 2% e lavados duas vezes com PBS. Após, os parasitas foram incubados overnight com anticorpos anti-P21 produzidos em camundongos (1:2.000) (DA SILVA et al., 2009) e diluídos em solução de permeabilização (PBS pH 7,2, 0,1 % de gelatina, 0,1% de azida de sódio e 0,2 % de saponina). Os parasitas foram então incubados com anticorpo secundários anti-mouse conjugados com Alexa Fluor 568 (1:200) e 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI;1:500) por 1 h. As imagens foram adquiridas em microscópio confocal TCS SP5 II tandem Scanner (Leica) com uma objetiva de imersão em óleo 63x NA 1.40 PlanApo, e o software Imaris (Bitplane) foi usado para análise de imagens (TEIXEIRA et al., 2022).

3.6 Cultivo de formas tripomastigotas de cultura de tecido (TCTs)

Para a obtenção de formas TCTs de *T. cruzi* cepa G (DTU TcI) (ZINGALES, 2018), foram utilizadas células VERO cultivadas sob os métodos descrito anteriormente. As células VERO foram semeadas em garrafas de cultivo celular de 250 ml, 75cm² e foram infectadas com tripomastigotas metacíclicos WT, CAS9 e TcP21^{-/-} com 1x10⁶ de parasitas por cerca de 24 hrs e mantidas em meio DMEM suplementado com 1% de penicilina, estreptomicina (InLab), Gentamicina (GoldBio) e 10% de soro fetal bovino em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Após 24 hrs as garrafas foram lavadas 3 vezes com (PBS 1x; pH 7,2) para a retirada dos parasitas não internalizados. Durante o cultivo os parasitas eclodiram e foram testados por PCR e utilizados nos experimentos.

3.7 Ensaio de invasão celular com tripomastigotas metacíclicos (TM) e coloração com Giemsa

Para realizarmos os ensaios de invasão utilizamos as formas TM de *T. cruzi* cepa G derivadas da diferenciação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos seguindo a metodologia de purificação descrita por (TEIXEIRA; YOSHIDA, 1986b). Células VERO foram então semeadas em placas de 24 poços (KASVI-K12-024) contendo lamínulas de 13 mm

(Knittel/Glass-13mm) na proporção de 5×10^4 células por poço, durante 24h antes da exposição aos parasitas mantendo as condições ideais para adesão. Em seguida, submetemos as células a exposição com os parasitas com um MOI de 20 parasitas TM por célula durante o tempo duas horas de invasão, seguindo das mesmas condições de 37° C e 5% de CO₂. Após esse período, as células foram lavadas três vezes com (PBS; pH 7,2) para a retirada dos parasitas não internalizados e fixados com Bouin por 15 min e em seguida lavadas com PBS e coradas com Giemsa (Sigma-Aldrich) na diluição de 1:20 por 30 min. Após esse tempo as lamínulas foram descoradas com concentrações decrescentes de acetona e crescentes de Xilol (STROBER, 2000). Em seguida as lâminas foram montadas com Permount® (Fisher Scientific); foi realizado contagem de número de células infectadas e número de parasitas representados em amastigotas internalizados, em 300 células totais. As lâminas foram analisadas em microscopia de luz onde foram capturadas imagens/campos e contados aproximadamente 20 campos por lamínula, realizados em uma quadruplicata técnica, seguido de uma duplicata biológica garantindo a contagem de um número mínimo de 300 células totais. A contagem foi realizada com ajuda do software ImageJ para posterior análise estatística.

3.8 Ensaio de invasão celular com tripomastigotas de cultura de tecido (TCTs) e coloração com Giemsa

Para realizarmos os ensaios de invasão utilizamos as formas TCTs de *T. cruzi* cepa G derivadas de células VERO. As células VERO foram então semeadas em placas de 24 poços (KASVI-K12-024) contendo lamínulas de 13 mm (Knittel/Glass-13mm) na proporção de 5×10^4 células por poço, durante 24h antes da exposição aos parasitas mantendo as condições ideais para adesão. Em seguida, submetemos as células a incubação com os parasitas com um MOI de 5 parasitas por célula, seguindo das mesmas condições de 2h invasão à 37° C e 5% de CO₂. Após esse período, as células foram lavadas três vezes com (PBS; pH 7,2) para a retirada dos parasitas não internalizados e fixados com Bouin por 15 min e em seguida lavadas com PBS e coradas com Giemsa (Sigma-Aldrich) na diluição de 1:20 por 30 min. Após esse tempo as lamínulas foram descoradas com concentrações decrescentes de acetona e crescentes de Xilol (STROBER, 2000). Em seguida as lâminas foram montadas com Permount® (Fisher Scientific); foi realizado contagem de número de células infectadas e número de parasitas representados em amastigotas internalizados, em 300 células totais. As lâminas foram analisadas em microscopia de luz onde foram capturadas imagens/campos e contados aproximadamente 20 campos por lamínula, realizados em uma quadruplicata técnica, seguido

de uma duplicata biológica garantindo a contagem de um número mínimo de 300 células totais. A contagem foi realizada com ajuda do software ImageJ para posterior análise estatística.

3.9 Ensaio de replicação celular e coloração com Giemsa

Para realizarmos os ensaios de replicação celular utilizamos as formas tripomastigotas de *T. cruzi* cepa G derivadas de células VERO. As células VERO foram então semeadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de 13 mm na proporção de 2×10^4 células por poço, durante 24h antes da exposição aos parasitas mantendo as condições ideais para adesão. Em seguida, submetemos as células à incubação com os parasitas com um MOI de 5 parasitas por célula por 2h à 37° C e 5% de CO₂. Após esse período, as células foram lavadas três vezes com (PBS; pH 7,2) para a retirada dos parasitas não internalizados. Em seguida, o meio foi repostado, a cinética de tempo para os ensaios de replicação foram 24h, 48h, 72h e 96h; logo após cada tempo as células foram fixadas com Bouin por 15 min e em seguida lavadas 3 vezes com PBS e coradas com Giemsa (Sigma-Aldrich) na diluição de 1:20 por 30 min. Após esse tempo as lamínulas foram descoradas com concentrações decrescentes de acetona e crescentes de Xilol (STROBER, 2000). Em seguida as lâminas foram montadas com Permount® (Fisher Scientific) para a contagem de número de células infectadas e número de parasitas representados em amastigotas internalizados, em 100 células infectadas. As lâminas foram analisadas em microscopia de luz onde foram capturadas imagens/campos e contados aproximadamente 20 campos por lamínula, realizados em uma quadruplicata técnica, seguido de uma duplicata biológica garantindo a contagem de um número mínimo de 100 células infectadas. A contagem foi realizada com ajuda do software ImageJ para posterior análise estatística.

3.10 Ensaio de eclosão

As células Vero foram obtidas como descrito anteriormente. Os ensaios de infectividade foram realizados como detalhado em métodos experimentais já descritos neste trabalho, seguindo o processo de obtenção das formas infectantes TM mutantes nocautes para o gene da proteína P21 e purificados segundo modificação do protocolo de Yoshida e colaboradores (1989) para gerar as formas TCT dos grupos WT, CAS9 e TcP21^{-/-}. As células Vero foram pré-tratadas com tripsina por 3 min à 37°C e lavadas com (PBS; pH 7,2) para retirada da tripsina e contadas em câmara de Neubauer. Em seguida 10^4 células foram semeadas em cada poço em uma placa de 6 poços estéreis foram incubadas durante 24 horas antes da exposição aos

parasitas. Após incubação overnight à 37 °C e 5 % CO₂ as células foram infectadas com 5X10⁴ tripomastigotas de cultura de tecido (TCT) previamente mantidos em cultura em meio DMEM (10% SFB), e os parasitas foram colocados em exposição com as células Vero durante o tempo de duas horas. Após esse período, as células foram lavadas três vezes com (PBS; pH 7,2) para a retirada dos parasitas não internalizados. Em seguida, o meio DMEM (10% SFB) foi repostado, e a cinética de tempo para os ensaios de eclosão dos parasitas para o sobrenadante foi estabelecida em 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 e 240 horas pós-infecção. O número de parasitas no sobrenadante foi determinado pela contagem das formas tripomastigotas e amastigotas em câmara de Neubauer por 10 dias após a infecção. A contagem foi realizada de forma cega por dois contadores em quadruplicata por meio de dois experimentos independentes aplicando os fatores de correção da câmara de Neubauer e representando os dados no gráfico N° de parasitas/mL

3.11 Normas de Biossegurança

Todos os procedimentos *in vitro*, envolvendo manuseio de parasitos, cultivo de células infectadas e reagentes, bem como utilização dos equipamentos foram realizados de acordo com as normas de biossegurança descritas por Mineo (2005).

3.12 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism versão 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) e os dados foram expressos como média ± desvio padrão. A comparação de dados entre os grupos WT, CAS9 e TcP21^{-/-} que apresentaram diferenças estatísticas foram determinadas e analisada pelo teste T não pareado de Student, *two-way* e *one-way* ANOVA; os testes de Tukey e Dunn (não paramétrico) foram utilizados para análise de comparação múltipla entre os grupos estudados, ou ANOVA de duas vias e teste Tukey ou Sidak para múltiplas comparações. De acordo com o delineamento experimental determinado em cada ensaio realizado as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor *p*: < 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 Deleção no gene da proteína P21 em *T. cruzi* cepa G

Para realizar a deleção no gene da proteína P21 e obter os parasitas nocautes (Figura 3 A) foi usado um vetor pTREX/spCas9EGFP para produzir a linhagem que expressa a proteína Cas9 em fusão com E-GFP. Após a seleção e enriquecimento das células positivas para EGFP, transfectamos parasitas expressando Cas9-EGFP com dois guias únicos de RNA que são; P21sgRNA_36 e P21sgRNA_424 (Figura 3 A e B) e um cassete de DNA doador contendo o gene de resistência Bsd (599 pb) (Figura 3 C), em seguida selecionamos a população nocaute com Blastomicina (50µg/mL) e G418 (250µg/mL).

Os parasitas nocautes selecionados foram clonados por diluição limitante e o DNA genômico de clones cultivados foi extraído e analisado por PCR. Sendo assim, encontramos clones TcP21^{-/+} contendo um alelo com o gene da P21 e outro alelo contendo o gene BSD. Como estratégia para obter parasitas duplo nocautes (TcP21^{-/-}) eletroporamos a população (TcP21^{-/+}) com sgRNAs específicos (36 e 424 nucleotídeos) e um novo cassete de DNA doador contendo o gene de resistência a higromicina B (1226 pb) (Figura 3 C) e clonados novamente por diluição limitante.

Após obtidos os parasitas nocautes e selecionados com antibióticos seu DNA genômico foi extraído e analisado por PCR com os iniciadores que hibridizam nas regiões da P21 e as regiões UTRs (Figura 3 D). Nossos resultados demonstraram a representação esquemática do gene da P21 nos grupos controles WT e CAS9 (392 pb), e os locais de alinhamento dos primers para rastrear os clones nocautes onde os dois clones não apresentaram nenhuma amplificação (Figura 3 D gel 1) confirmando a deleção do gene. Em contrapartida, foi analisado o sítio de inserção do gene da Bsd e Hyg nos dois clones nocautes usando os primers UTR (Tabela 1), e os resultados confirmaram que os genes de resistência Bsd (712 pb) e Hyg (1.339) foram amplificados no locus genômico da P21 sem haver resquícios de amplificação que demostresse a banda da P21, o que caracteriza uma deleção nos dois alelos do gene da P21, como resultado a obtenção de uma população duplo-nocaute TcP21^{-/-}.

4.2 Avaliação da expressão gênica da P21 nos parasitas nocautes

Foi realizada uma análise por RT-PCR para verificar a ausência de transcritos nos clones nocautes no gene da proteína P21 por meio da extração de RNA total sintetizados em cDNA usando primers para a sequência de codificação da proteína P21. Em seguida, foi utilizado como controle dois genes endógenos de manutenção (Figura 3 E gel 2), que serviram como controles internos para o ensaio: *T. cruzi* mevalonato quinase (TcMVK) (FERREIRA et al., 2016) e *T. cruzi* hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (TcHGPRT) (MURTA et al., 2006). Na (Figura 3 E gel 2) a análise demonstra como resultado a ausência de gene transcrito da P21 nos clones nocautes, como ocorreu nos grupos controles WT e CAS9.

4.3 Análise por imunofluorescência da presença da proteína P21 nos nocautes TcP21^{-/-}.

Portanto, para confirmar se havia presença da proteína P21 nos parasitas nocautes analisamos por imunofluorescência em epimastigotas WT, e os clones nocautes TcP21^{-/-} que foram marcados com anticorpos primários anti-P21 de camundongo e anticorpos secundários anti-camundongo conjugados com Alexa Fluor 568 e analisados por microscopia confocal. Os resultados demonstraram (Figura 3 F) que as formas epimastigotas WT apresentaram marcação em vários pontos, enquanto, os parasitas nocautes TcP21^{-/-} apresentaram uma marcação fraca que pode ser considerada uma marcação inespecífica de anticorpo policlonal. Juntos os resultados confirmam que a estratégia utilizada neste trabalho para nocautear a proteína P21 pela metodologia CRISPR/Cas9 foi bem sucedida.

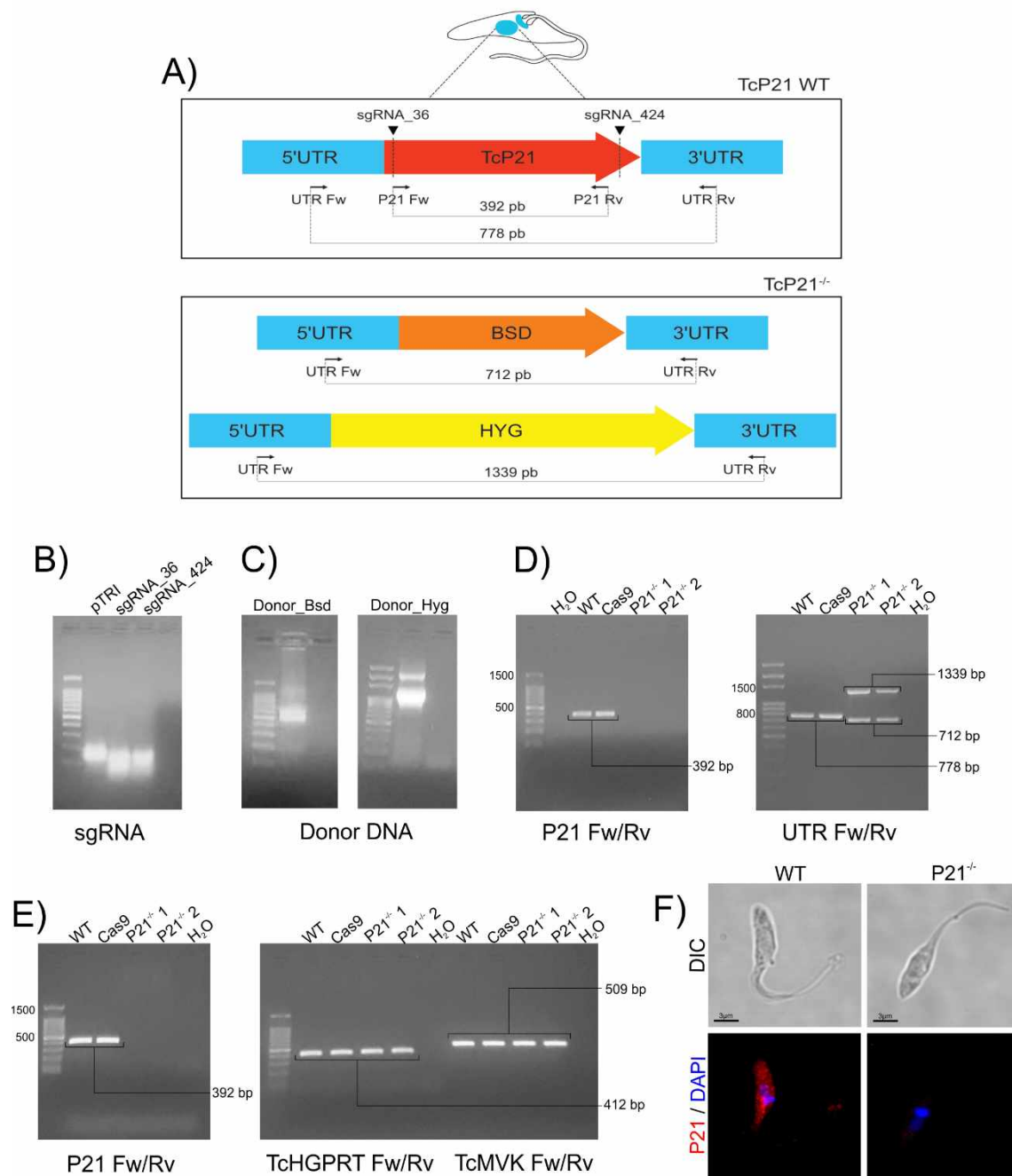


Figura 3. Figura 3 – Confirmação da deleção do gene da P21 nos parasitas nocautes cepa G. A) Representação esquemática do locus do gene da P21 em WT e clones nocautes com iniciadores e regiões de UTR. B) Gel de agarose mostrando os RNA guias 36 e 24 para direcionar a Cas9 no gene da P21. Um fragmento de 80 pb de rRNA 18S humano transcrito de pTRI-RNA 18S foi usado como controle da reação. C) Gel de agarose mostrando os DNA doadores contendo os genes de resistência a Blastomicina (599bp) e Higromicina (1226bp). D) PCR de DNAg de clones nocautes e controles (WT e CAS9) usando primers específicos para a P21, bem como a região UTR do gene P21 analisando a inserção dos genes de resistência a BSD e HYG. E) PCR a partir do cDNA dos clones nocautes e controles (WT e CAS9) analisando a expressão da P21 e TcMVK e TcHGPRT endógenos. F) Imunofluorescência indireta em epimastigotas P21 nocautes e WT incubados com anticorpo policlonal anti-P21 (camundongo) e anticorpo anti-camundongo conjugado com Alexa Fluor 568 (vermelho), e núcleo marcado com DAPI (azul),

DIC contraste de interferência diferencial; TcP21^{-/-}, P21 nocaute. Imagens de plano único foram adquiridas por microscopia confocal. As barras de escala representam 3 μ m.

4.3 Impacto da deleção do gene da P21 no crescimento de epimastigotas

Avaliamos se a interrupção no gene da proteína P21 teria impacto no crescimento de epimastigotas de *T. cruzi*, sendo assim, avaliamos a curva de crescimento dos parasitas nocautes para a P21 comparando com os parasitas nocautes (TcP21^{-/-}) com WT por 12 dias. Foi quantificado o número de parasitas a cada 2 dias. Nossos resultados demonstraram que os parasitas nocautes TcP21^{-/-} apresentam uma taxa de crescimento mais lenta a partir do 4º dia até o 12º dia quando comparados com o WT.

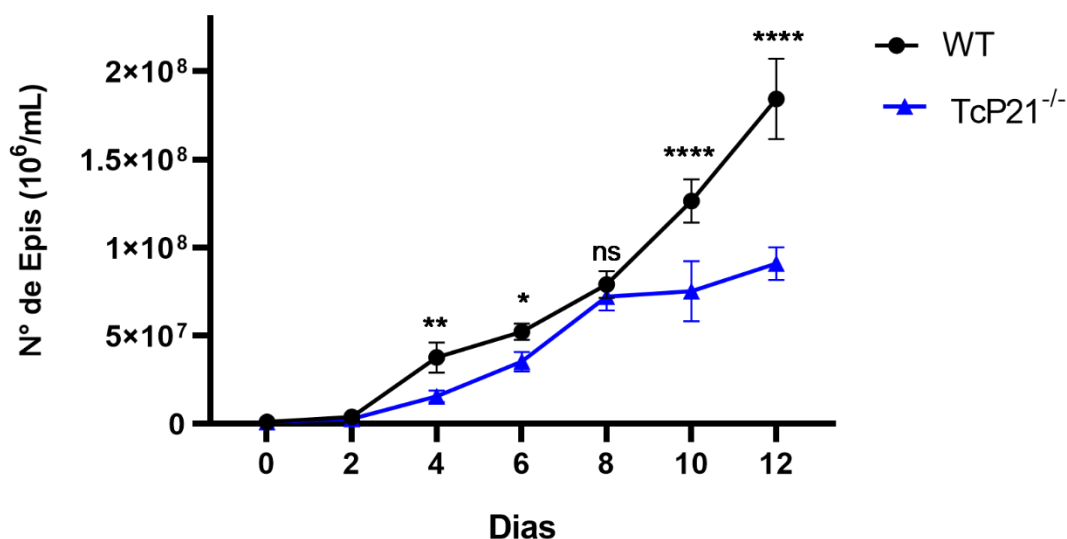


Figura 4. Curva de Crescimento de epimastigotas por 12 dias. O gráfico mostra a média representativa \pm SD de um dos dois experimentos independentes realizados em triplicata. A comparação foi realizada por ANOVA de duas vias e teste de Tukey's para comparações múltiplas. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre WT e TcP21^{-/-} a partir do 4º dia com valor de p: * < 0,05 , p: ** < 0,01 , p: **** < 0,0001 e ns não significante.

4.4 Análise do locus gênico da P21 nas formas epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos (TM) e em tripomastigotas de cultura de tecido (TCT) ao longo do ciclo evolutivo

Investigamos se a linhagem nocaute é estável na ausência de antibióticos de seleção ao longo do ciclo evolutivo do parasita, aqui avaliamos gDNA isolado com a presença dos antibióticos após 14 dias de cultura, e retirando a pressão seletiva dos mesmos por 5 dias; 10 dias; 15 dias e 20 dias. Foi possível confirmar a presença dos genes de resistência da blasticidina (banda 712 pb) bem como, o gene de resistência a higromicina (banda 1.339 pb) ocupando a região do gene da P21 (figura 5 A) após 20 dias sem os antibióticos. Como controles foi utilizado gDNA de epimastigotas Tipo Selvagem (WT) que demonstrou amplificação na região UTR do gene da P21 (banda 778 pb), e também foi utilizado como controle gDNA de epimastigotas nocautes TcP21^{-/-} de populações clonais que foram recém transfectadas para comparar o perfil de bandas com a população clonal em cultura, o que apresentou perfis de banda semelhantes aos que já estão sendo cultivados o que corrobora com nossos resultados de que a presença ou ausência dos antibióticos de seleção não interferem na população mutante TcP21^{-/-}.

A proteína P21 é expressa ao longo do ciclo de vida do parasita e possui diferentes propriedades e características biológicas que beneficiam *T. cruzi* no momento de sua invasão e permanência dentro do hospedeiro, por ser secretada por diferentes formas evolutivas do parasita e em diferentes microambientes ela possui uma característica imunomoduladora com potentes propriedades bioativas que pode interferir em várias fases do ciclo celular; aqui induzimos a diferenciação de epimastigotas TcP21^{-/-} para as formas tripomastigota metacíclicas conforme já descrito em procedimentos experimentais e investigamos se população mutante TcP21^{-/-} progredia na diferenciação celular mantendo a interrupção do gene da proteína P21. Após a diferenciação de epimastigotas TcP21^{-/-}, analisamos então DNAg das formas tripomastigotas metacíclicas mutantes e avaliamos células Vero infectadas por 96 e 144 horas garantindo que esse tempo tenha sido suficiente para ocorrer uma nova diferenciação em amastigotas intracelulares. As amostras das formas tripomastigotas metacíclicas e das células Vero infectadas durante 96 e 144 horas contendo amastigotas intracelulares TcP21^{-/-}, demonstraram marcação no locus do gene da P21 a presença do gene de resistência da blasticidina (banda 712 pb) e da higromicina (banda 1.339 pb) característica presente somente nos parasitas nocautes e ausente nos parasitas WT (banda 778 pb) que é o controle negativo da reação (Figura 5 B).

Em seguida as culturas de células Vero foram infectadas com as formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* cepa G nocautes para P21, bem como os grupos controles CAS9 e WT para obtermos parasitas nas formas tripomastigotas de cultura de tecido (TCT) aguardamos então a primeira eclosão dos parasitas para investigarmos se após uma nova diferenciação eles progrediam para a forma evolutiva TCT nocautes para o gene da P21 e os resultados da PCR demonstraram que de acordo com a Figura 5 C, os parasitas TCT amplificaram o gene de resistência a blasticidina (banda 712 pb) e também o gene de resistência a higromicina (banda 1.339 pb) que foram inseridos na região do gene da P21 (Figura 5 C). Foram usados como controle TCTs do grupo CAS9 que apresentaram somente uma (banda 778 pb) correspondente ao gene P21. Para uma análise comparativa utilizamos como controles DNAg de epimastigotas WT e TcP21^{-/-} que apresentaram o mesmo perfil de bandas, podendo assim, confirmar que os parasitas nocautes para a P21 mantiveram sua característica mutante nas formas evolutivas tripomastigotas metacíclicas (TM), amastigotas intracelulares (AI) e tripomastigotas de cultura de tecido (TCT).

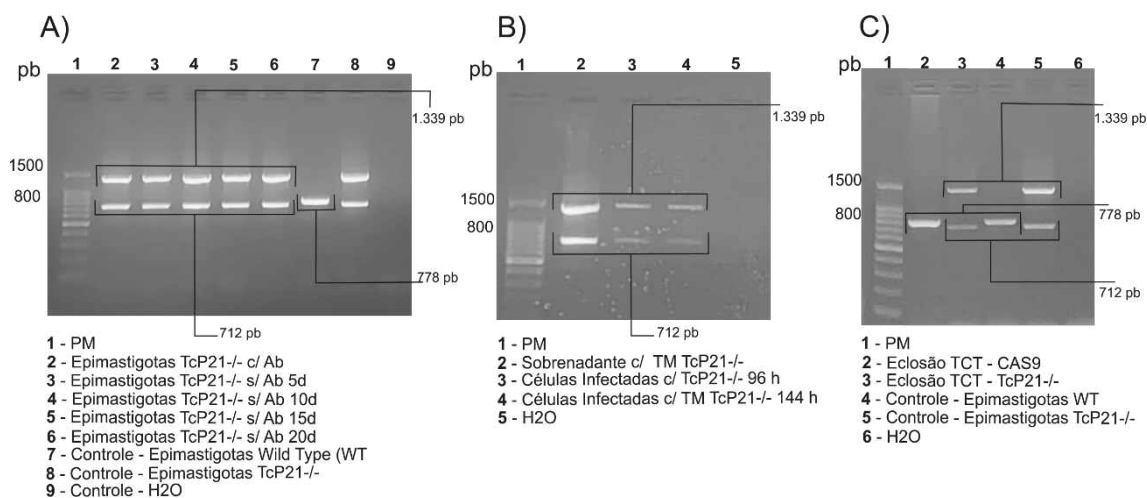


Figura 5. Representação esquemática por PCR da análise da expressão do gene da P21 nos parasitas nocautes nas formas EPI, TM e TCT. (A) Análise do DNAg por PCR das formas epimastigotas TcP21^{-/-} na presença e ausência dos antibióticos de seleção BSD e HYG. (B) Análise do DNAg por PCR das formas tripomastigotas metacíclicas TcP21^{-/-} e de células Vero infectadas com o tempo de 96 h e 144 h de infecção. (C) Análise do DNAg por PCR da primeira eclosão das formas tripomastigotas de cultura de tecido (TCT) TcP21^{-/-} e CAS9. Colocar tb o significado de TM, bem como o que as bandas de 712 bp, 778 bp e 1339 bp correspondem.

4.5 A deleção no gene da proteína P21 prejudica a capacidade de tripomastigotas metacíclicos e TCTs infectarem células Vero

Alguns dados já disponíveis sobre a atividade biológica da proteína P21 apontam sua importância na invasão do *T. cruzi* em células de mamíferos (DA SILVA et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2019). Investigamos os efeitos da interrupção do gene da proteína P21 ao realizarmos ensaios de invasão em células Vero por TM purificados para quantificar e visualizar a infecção durante o processo de internalização do parasita. A invasão ocorreu durante um tempo de exposição de duas horas dos parasitas às células Vero e para visualizar a infecção os ensaios de invasão foram conduzidos e as células foram processadas para coloração em Giemsa e as imagens foram obtidas por microscopia de luz, e foram então quantificadas somente amastigotas intracelulares apontadas pela seta na Figura 6A, a coloração por Giemsa permitiu distinguir os parasitas que estão internalizados por apresentarem um halo claro ao seu redor, o dado foi então representado em número de parasitas internalizados em 300 células totais (Figura 6B).

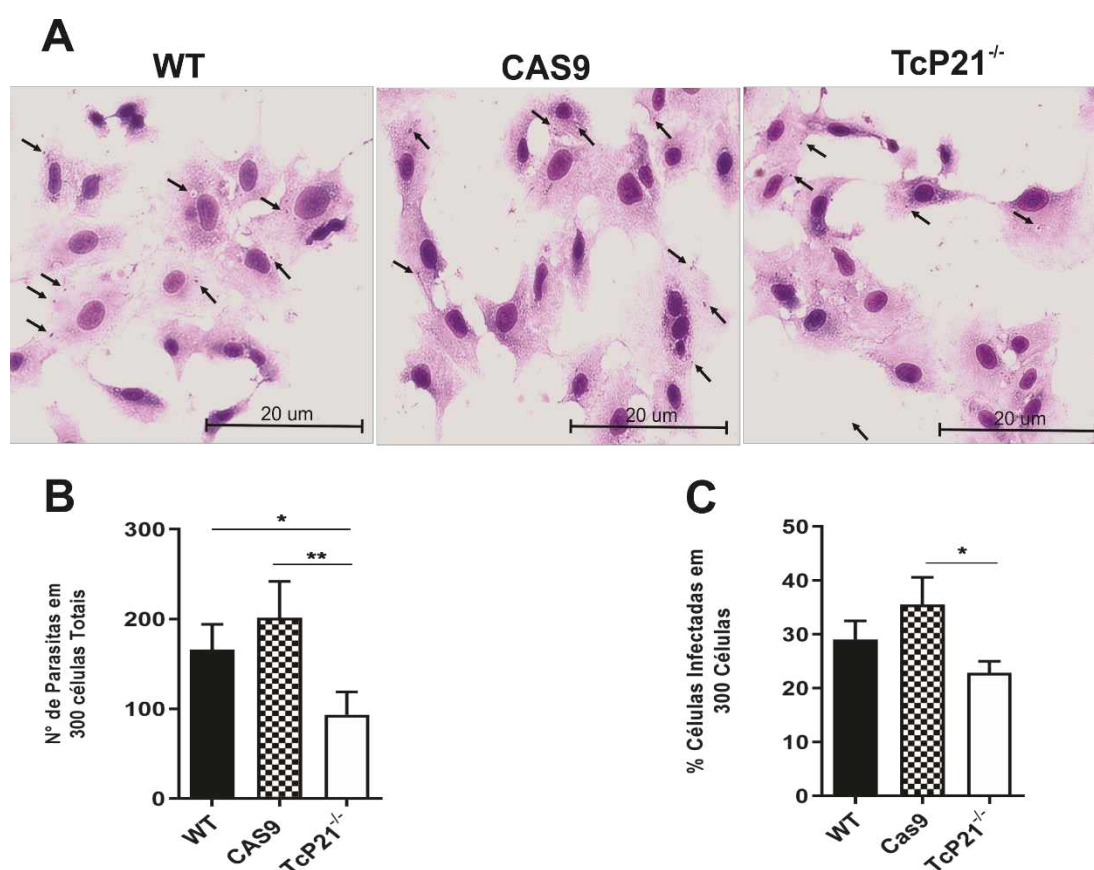


Figura 6. Análise da infecção em células Vero por parasitas TM nos grupos WT, CAS9 e TcP21^{-/-}. **(A)** Imagens representativas por microscopia de luz de células Vero infectadas com tripomastigotas metacíclicos (2 horas, MOI: 20 parasitas por célula), fixadas e coradas com Giemsa para visualização dos parasitas internalizados indicados pelas setas. Barras 20μm. **(B)** Quantificação do número de parasitas internalizados em 300 células totais o gráfico mostra a média representativa ± SD de dois testes independentes realizados em triplicata. **(C)** Análise da porcentagem de células infectadas em 300 células totais,

os dados representados são a média \pm SD de dois testes realizados em triplicata. A comparação foi realizada por ANOVA one-way e o teste Tukey's múltiplas comparações. Os asteriscos representam diferenças significativas p: * < 0,05 e p ** < 0,01.

Nossos resultados demonstram de acordo com a Figura 6 B que a invasão foi prejudicada nos parasitas TcP21^{-/-} pela deleção do gene da proteína P21, quando comparados com os grupos controles WT e Cas9. Examinamos a porcentagem de células infectadas em um número total de 300 células, bem como a quantidade de parasitas internalizados e nossos resultados demonstram de acordo com a (Figura 6 C) que os parasitas nocautes tiveram uma porcentagem menor de células invadidas quando comparados com o CAS9 e uma tendência quando comparados com o WT. Nossos dados corroboram com o entendimento dessa proteína estar envolvida no processo de internalização do parasita. Adicionar aqui os dados de invasão dos TCTs, e adicionar tb o gráfico A da Figura 7 na Figura 6, que seria o gráfico de invasão das formas metacíclicas e de cultura.

4.6 Os efeitos da deleção do gene da proteína P21 na invasão de tripomastigotas de cultura de tecido (TCT) e na replicação intracelular de amastigotas

Para investigar o papel da proteína P21 na invasão celular de TCTs e na replicação intracelular de amastigotas na infecção de células Vero por *T. cruzi* cepa G, ensaios de invasão foram conduzidos com o foco em avaliar os efeitos da proteína P21 na invasão. A invasão ocorreu durante o tempo de duas horas de exposição das células aos parasitas TCTs com um MOI de 5 parasitas por células. Em seguida, o ensaio foi interrompido e as células foram processadas para coloração de Giemsa; as imagens foram obtidas com microscopia de luz e as amastigotas no interior das células foram quantificadas. A coloração por Giemsa permite distinguir os parasitas internalizados por apresentarem um halo claro ao seu redor. Sendo assim, foi avaliado a taxa de invasão e o número de parasitas internalizados contando 100 células infectadas, de acordo com a (Figura 7 A) , os parasitas nocautes para P21 (TCTs) demonstraram uma redução significativa na taxa de invasão em comparação com os grupos controles WT e CAS9 (Figura 7 B).

Alguns estudos com a proteína P21 recombinante buscaram elucidar o efeito da P21 no controle da replicação do parasita, o que sugere que ela possa estar envolvida em um mecanismo

evolutivo de sobrevivência pelo *T. cruzi* no hospedeiro. Neste estudo buscamos investigar a taxa de replicação dos parasitas durante os tempos de 24, 48, 72 e 96 horas após a invasão e quantificamos os parasitas internalizados em 100 células infectadas. Nossos resultados demonstra que nos tempos de 24 e 48 horas houve um aumento na replicação dos parasitas nocautes para a P21 em relação aos grupos WT e CAS9.

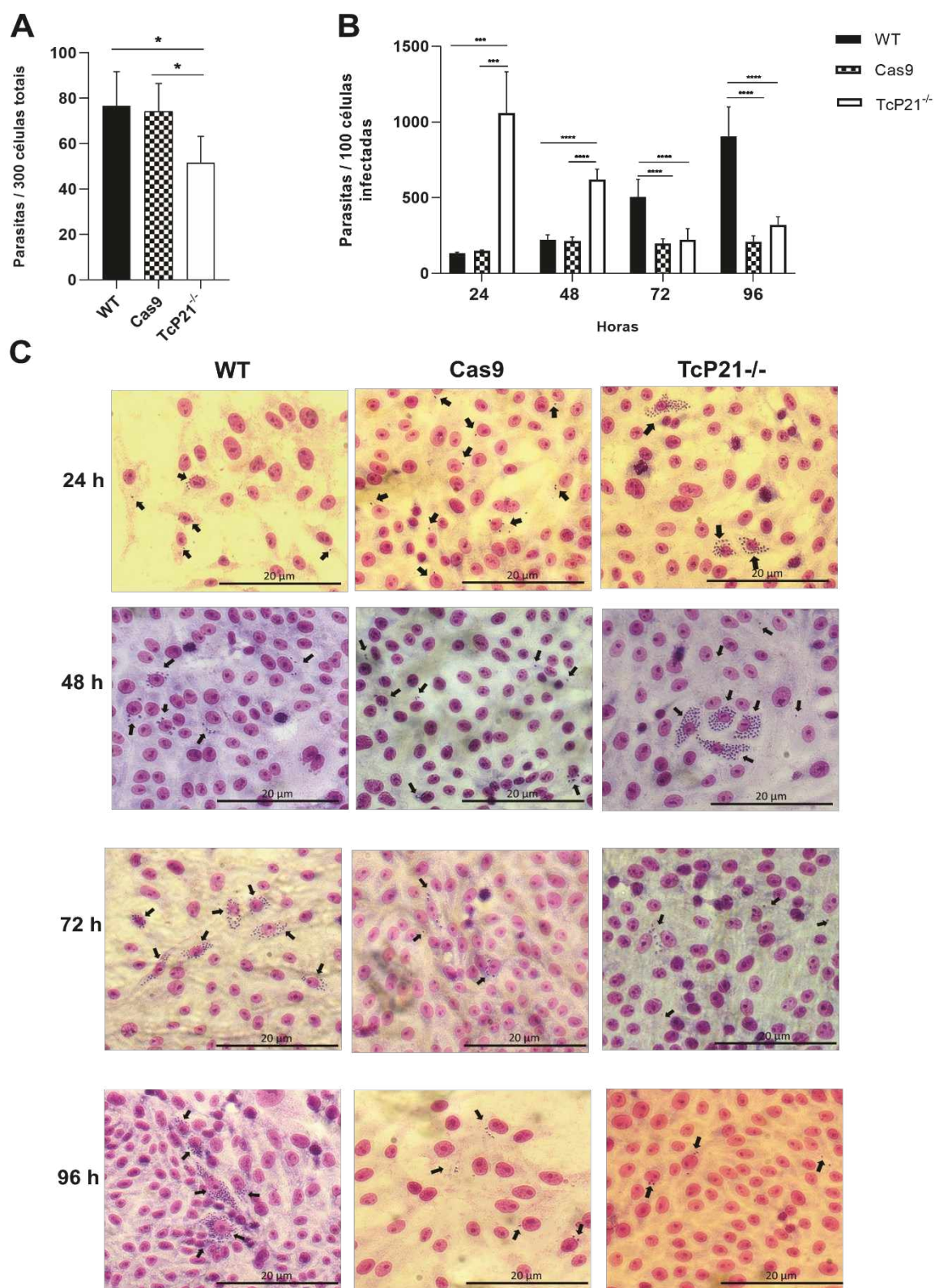


Figura 7. Impacto da deleção no gene da proteína P21 na invasão de TCTs e na replicação de amastigotas intracelulares. (A) Os parasitas nocautes para P21(TcP21^{-/-}) apresentaram diminuição na taxa de invasão celular na contagem de número de parasitas internalizados em 100 células infectadas, o gráfico mostra a média representativa \pm SD de dois testes independentes realizados em quadruplicata. A comparação foi realizada por ANOVA one-away e teste de Tukey's estabelecido em múltiplas

comparações e os asteriscos indicam diferenças significativas com valor de $p^* < 0,05$ e $p^{**} < 0,01$. (B) Aumento na replicação de amastigotas intracelulares nos tempos de 24 e 48 horas nos parasitas TcP21^{-/-}, já nos tempos de 72 e 96 o grupo WT apresentou aumento na replicação em comparação aos grupos CAS9 e TcP21^{-/-}. O gráfico representa o número total de parasitas internalizados em 100 células infectadas pela média representativa \pm SD de dois testes independentes realizados em quadruplicata sendo a comparação realizada por ANOVA de duas vias e teste Sidak's para múltiplas comparações, e os asteriscos indicam diferenças significativas com valor p : *** $< 0,001$ e p : **** $< 0,0001$. (C)) Imagens representativas por microscopia de luz de células Vero infectadas com TCT nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas, fixadas e coradas com Giemsa para visualização dos parasitas internalizados indicados pelas setas com barras 20 μ m.

Já nos tempos de 72 e 96 horas houve um aumento significativo na taxa de replicação no grupo WT em comparação com os grupos Cas9 e TcP21^{-/-}, demonstrando que a deleção da P21 aumenta a taxa de replicação nos tempos iniciais, interferindo no ciclo intracelular do parasita.

4.7 Eclosão dos parasitas TcP21^{-/-} para o sobrenadante da célula hospedeira

A fim de compreender a razão pela qual os parasitas TcP21^{-/-} aumentam a replicação nos tempos iniciais de 24 e 48 h, mas depois reduzem a multiplicação em 72 e 96 horas pós-infecção, realizamos ensaios para analisar a cinética de tempo da saída de formas tripomastigotas e amastigotas da célula hospedeira para o sobrenadante em diferentes momentos pós-infecção. Os resultados demonstraram que os parasitas nocautes apresentaram um aumento na liberação das formas tripomastigotas para o sobrenadante ao apresentar um pico da eclosão celular em 144 horas pós-infecção quando comparado entre os grupos controles WT e Cas9. Em seguida, até o tempo de 192h, observou-se uma tendência de diminuição do número de tripomastigotas no sobrenadante de células infectadas, quando comparamos os parasitas TcP21^{-/-} e WT. Após 192h a liberação de TCTs nocautes volta a subir até 240h (Figura 8 A).

Já as formas amastigotas TcP21^{-/-} começam a ser liberadas no sobrenadante a partir de 144h após a infecção, e curiosamente, no intervalo de 192h a 240h esse aumento é progressivo comparado aos controles WT e Cas9, sugerindo que existe um aumento da liberação das formas amastigotas TcP21^{-/-} para o sobrenadante, antes de se transformarem em formas tripomastigotas (Figura 8 B).

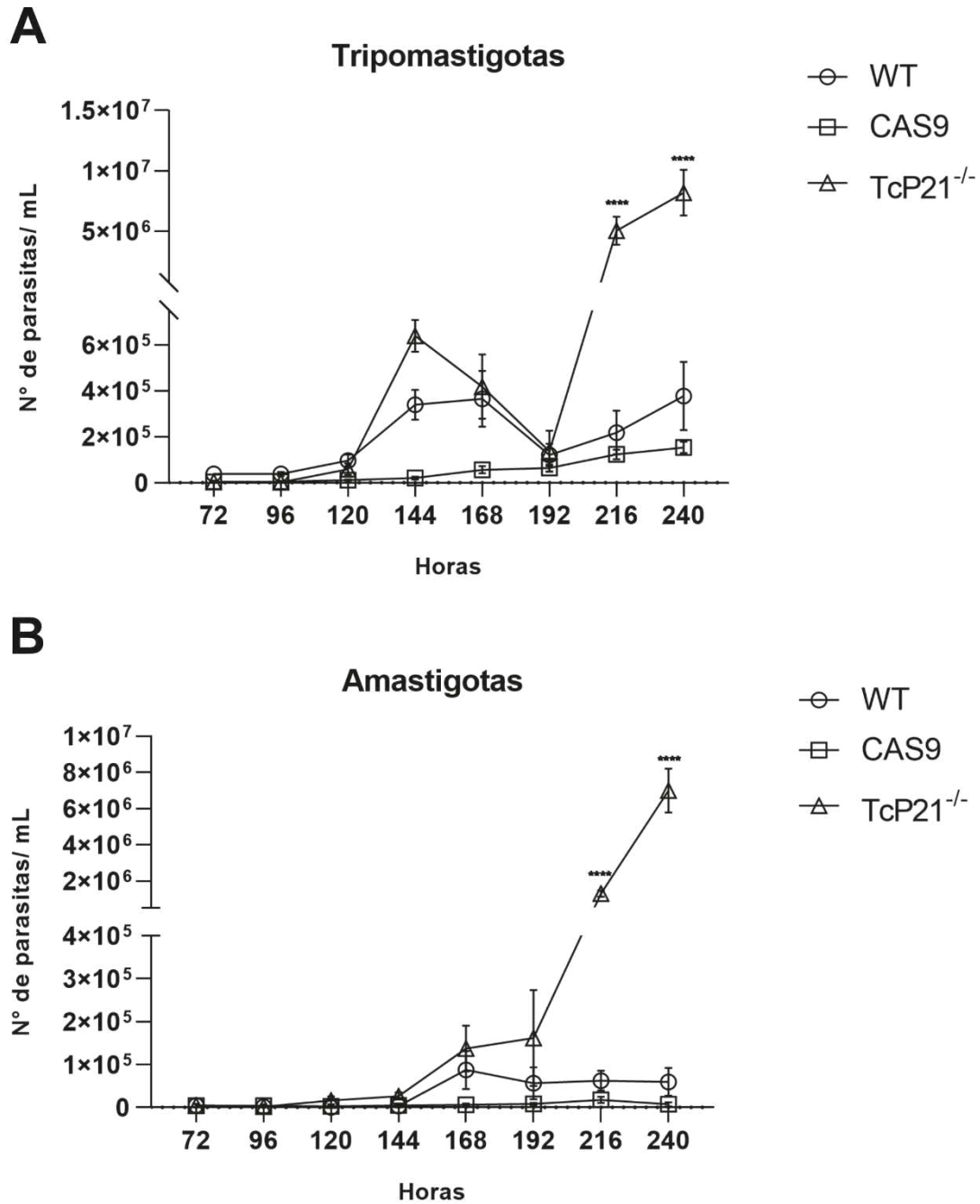


Figura 8. A interrupção no gene da proteína P21 induz um aumento na liberação das formas tripomastigotas e amastigotas extracelulares no sobrenadante de células Vero infectadas. (A) Cinética de tempo de saída das formas tripomastigotas para o sobrenadante durante os tempos de 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 e 240 horas após a infecção. Os parasitas TcP21^{-/-} apresentaram um aumento significativo no número de tripomastigotas no sobrenadante nos tempos de 216 e 240 os resultados representam a média \pm SD de duas ensaios independentes realizados em quadruplicata, a comparação foi realizada por ANOVA de duas vias e teste Dunnett's para múltiplas comparações. Os asteriscos indicam diferenças significativas com comparação entre WT e TcP21^{-/-} com valor de p: **** <0,0001. (B) Cinética de tempo de saída das formas amastigotas extracelulares para o sobrenadante durante os tempos de 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 e 240 horas após a infecção.

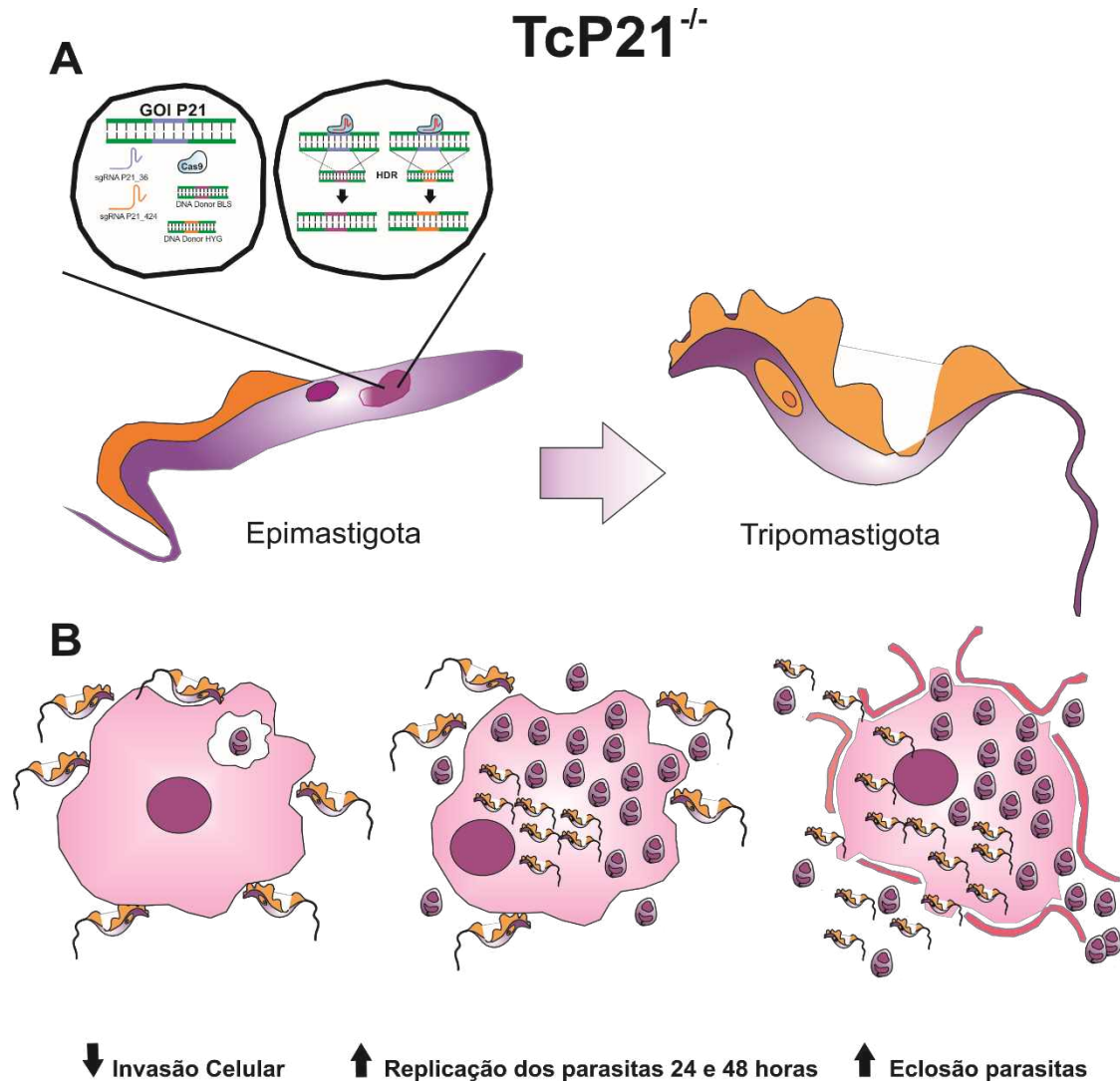


FIGURA 9. Resumo gráfico. (A) Ilustração do esquema de deleção no gene da proteína P21 (GOI P21) pela metodologia de CRISPR/Cas9 pela inserção de genes de resistência direcionado pelo mecanismo de reparo dirigido por homologia (HDR) para obter parasitas nocautes para P21 da cepa G, investigando a permanência de parasitas mutantes no processo de diferenciação de epimastigotas para tripomastigotas. (B) A interrupção no gene da proteína P21 foi capaz de promover uma diminuição na taxa replicação de epimastigotas e da invasão celular em TM e TCTs, bem como, um aumento na replicação de amastigotas intracelulares nos tempos de 24 e 48 horas interferindo no processo de diferenciação levando a um aumento da eclosão dos tripomastigotas e amastigotas TcP21^{-/-} em células infectadas.

5 DISCUSSÃO

A DC tem sido considerada um perigo emergente e altamente preocupante nas Américas com uma característica de letalidade relevante, matando a cada ano na América Latina mais pessoas do que qualquer outra doença parasitária incluindo a malária (ANTUNES PAES, 2004; LIMA et al., 2010; MARTINS-MELO; CASTRO; WERNECK, 2021). Sendo assim, conhecer os mecanismos que estão envolvidos na interação parasita-hospedeiro pode ter um impacto no diagnóstico e tratamento da doença, possibilitando a descoberta de novos alvos terapêuticos (LESLIE, 2011; MIRANDA; SAYÉ, 2019).

T. cruzi apresenta uma variabilidade genética ampla envolvendo mecanismos importantes na interação parasita-hospedeiro e está intimamente relacionado às variações clínicas da doença. Considerando que num mesmo hospedeiro pode haver a presença de diferentes cepas, sendo assim, é de extrema importância conhecer os mecanismos que estão envolvidos na infectividade entre as estirpes (ARAÚJO; CABELLO; JANSEN, 2007; ARAÚJO; WANIEK; JANSEN, 2009; COURA; VIÑAS; JUNQUEIRA, 2014).

Um momento crítico durante a infecção por *T. cruzi* está na interação inicial das formas tripomastigotas do parasita e a célula hospedeira, o que resulta no envolvimento de várias moléculas do protozoário que ativam vias de transdução de sinal importantes contribuindo para que a patogênese da DC ocorra (VILLALTA et al., 2009). Com base nisso, identificar moléculas que desempenham funções específicas nas células hospedeiras tem sido útil para desenvolver ferramentas terapêuticas e farmacológicas, como por exemplo, a superfamília gênica gp85/ trans-sialidase (TS) que são glicoproteínas presentes na superfície do parasita e participam da invasão celular, bem como, moléculas que são secretadas e estão envolvidas no desencadeamento de vias de sinalização essenciais para a entrada e sobrevivência intracelular do parasita (DE MORAIS et al., 2015).

A caracterização da proteína P21 de *T. cruzi* foi publicada em 2009 e trouxe as primeiras informações sobre o papel dessa proteína no contexto da infecção. Nesse estudo, a sequência do gene da proteína P21 foi clonada em um plasmídeo de *E. coli* e a forma recombinante da proteína, rP21, foi produzida e utilizada nos ensaios. Os dados demonstram que a rP21 adere à

superfície da célula hospedeira em uma proporção dose-dependente, e é expressa em todos os estágios evolutivos do parasita. Além disso, a rP21 foi capaz de aumentar a invasão celular por amastigotas extracelulares e tripomastigotas metacíclicas (DA SILVA et al., 2009). Posteriormente, foi observado que rP21 induz fagocitose em macrófagos, de uma forma dependente da ativação da sinalização celular via PI3K e da ligação ao receptor de quimiocinas CXCR4 (RODRIGUES et al., 2012).

Em outro estudo, nosso grupo de pesquisa verificou o impacto da rP21 na progressão do processo inflamatório em um modelo de inflamação induzida por esponja de poliéster. Os resultados indicaram que rP21 recruta células imunes, induz a produção de mieloperoxidase e IL-4 e diminui a formação de vasos sanguíneos em comparação com controles tratados com extrato bacteriano ou PBS, *in vitro* e *in vivo* (TEIXEIRA et al., 2015). Além disso, nossos dados demonstram que a atividade anti-angiogênica da rP21 depende da interação direta da proteína com o receptor CXCR4. Essa capacidade está relacionada à modulação da expressão de genes associados à actina e angiogênese (TEIXEIRA et al., 2017). Em nossas investigações, observamos que o tratamento com rP21 reduziu a carga parasitária (cepa Y) e a angiogênese, bem como induziu fibrose no tecido cardíaco de camundongos infectados e tratados com rP21 por 6 semanas. Além disso, rP21 reduziu o crescimento de epimastigotas, inibiu a replicação intracelular de amastigotas e modulou o ciclo celular do parasita, *in vitro* (TEIXEIRA et al., 2019). Corroborando esses resultados, observamos que rP21 diminuiu a multiplicação de *T. cruzi* (cepa Y) em mioblastos C2C12, fenômeno associado à maior polimerização de actina e maior expressão de IFN γ e IL-4. Durante a infecção experimental com a cepa Y, o tratamento com rP21 causou redução do número de ninhos de amastigotas no tecido cardíaco, e menor infiltrado inflamatório e fibrose também foram observados. Esses resultados foram correlacionados com a grande expressão de IFN- γ contrabalançada por altos níveis de IL-10, o que foi consistente com a menor lesão tecidual encontrada nesses camundongos. Também observamos que sob estresse, induzido pela presença do IFN- γ , os parasitas produziram mais P21 nativa (MARTINS et al., 2020).

Em conjunto, observamos que a proteína P21 nativa de *T. cruzi* tem potencial para desempenhar um papel relevante no curso da infecção. Nesse sentido, é interessante o fato da proteína recombinante induzir a invasão celular e reduzir a multiplicação intracelular, além da observação, que na indução de estresse o parasita expressa níveis mais elevados da proteína

nativa. Assim, acreditamos que a P21 faça parte de um intrincado mecanismo relacionado à perpetuação da doença, uma vez que a proteína parece favorecer a permanência intracelular do parasita e pode ser mais expressa quando o parasita está em situação de perigo.

No presente estudo nossa estratégia para validar os dados obtidos com a proteína recombinante consistiu em gerar parasitas nocautes para a P21 através da edição gênica utilizando a técnica CRISPR/Cas9. A importância da diversidade entre as cepas de *T. cruzi* vem sendo alvo de discussão entre os pesquisadores da doença de Chagas e a cepa G é classicamente conhecida por ter maior virulência *in vitro*, com um menor poder de infecção em modelos experimentais *in vivo* por não induzir parasitemia. (RODRIGUES et al., 2012; TEIXEIRA; YOSHIDA, 1986a).

Inicialmente, eliminamos o gene da proteína P21 em parasitas da cepa G e avaliamos a estabilidade desses parasitos P21^{-/-} ao longo do ciclo de vida, e os efeitos da deleção da P21 sobre o crescimento das formas epimastigotas, o potencial de invasão das formas TM e TCT nas células hospedeiras, a taxa de replicação de amastigotas intracelulares, bem como, a eclosão dos parasitos e a presença de egressos prematuros no sobrenadante de cultura, comparados aos controles.

Primeiramente, avaliamos o crescimento das formas epimastigotas de *T. cruzi* cepa G durante doze dias. As formas epimastigotas estão presentes no vetor invertebrado e colonizam o trato digestivo do inseto de forma a se dividir extracelular, esta fase do parasita tem um tempo de duplicação de 24 horas podendo atingir altas densidades celulares. Sendo assim, investigar sua capacidade de crescimento pode contribuir para compreensão dos processos replicativos do parasita. (TYLER; ENGMAN, 2001). Nossos resultados apontam que a partir do 4º dia os parasitas TcP21^{-/-} apresentaram uma taxa de crescimento reduzida em comparação com o controle WT. Nossos resultados corroboram com os achados observados em um outro estudo que a presença da forma recombinante da proteína P21 (rP21) foi capaz reduzir o crescimento de epimastigotas com aumento no número de parasitas na fase G1 e S na cepa Y (TEIXEIRA et al., 2019). Além disso, em estudo prévio com parasitos da cepa Y P21 nocautes também foi observado que a deleção da P21 reduz a taxa de crescimento dos das formas epimastigotas ao longo de 14 dias (TEIXEIRA et al., 2022). Alguns estudos apontam que a metaciclogênese está associada a disponibilidade de nutrientes, e ao observar que os parasitas nocautes

apresentaram uma taxa de replicação reduzida em comparação aos controles podemos considerar que haja um impacto na condição estressante oriunda da falta de nutrientes, e que esses processos metabólicos diminuídos podem estar envolvidos no processo de diferenciação das formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclico (CRUZ-SAAVEDRA et al., 2020). Nossos resultados norteiam investigações futuras sobre o envolvimento da proteína P21 nos processos de diferenciação do parasita.

Avaliamos também a capacidade dos parasitas nocautes de invadir células Vero em comparação com os parasitas selvagem e CAS9. Nossos dados demonstraram que a ausência de expressão de P21 reduziu significativamente a invasão celular pelo parasita. Esses dados corroboram nossas observações obtidas por meio da rP21 no qual o tratamento com proteína aumentou a invasão celular, o que sugere seu papel na indução da internalização do parasita. Sendo assim, especulamos que durante o processo de invasão o parasita recruta funções celulares do hospedeiro com a finalidade de estabelecer o nicho replicativo, a ausência da proteína P21 nativa foi capaz de promover uma queda na capacidade infectiva das formas tripomastigotas possivelmente por não interagir com o receptor CXCR4 diminuindo a ativação PI3K. Com isso em trabalhos futuros será investigada com mais detalhes a relação dos parasitas nocautes TcP21^{-/-} explorando os mecanismos utilizados durante o processo de internalização.

Em seguida, avaliamos a capacidade de multiplicação dos parasitas nocautes e nossos resultados mostraram que os parasitas nocautes (TcP21^{-/-}) se multiplicaram mais do que os parasitas controle em 24 e 48 horas após a infecção. Mais uma vez, corroborando os dados obtidos com rP21 onde o tratamento com a proteína reduziu a multiplicação intracelular do parasita. Além disso, esses resultados estão de acordo com nossos dados publicados recentemente, onde mostramos que o tratamento com rP21 inibiu a replicação de amastigotas intracelulares e foi capaz de regular a multiplicação (MARTINS et al., 2020; TEIXEIRA et al., 2019). As diferentes formas evolutivas encontradas no hospedeiro enfrentam microambientes estressores, as amastigotas presentes no citoplasma da célula hospedeira se diferenciam em tripomastigotas que são liberadas na corrente sanguínea para colonizar outros tecidos com o objetivo de perpetuar a infecção, com isso, é razoável vislumbrar que a proteína P21 mobilize diferentes componentes moleculares que são capazes de acionar vias de sinalização no processo de replicação intracelular do parasita.

A maior taxa de multiplicação em 24 e 48 horas pós-infecção e a menor multiplicação em 72 e 96 horas pós-infecção observada para os parasitas TcP21^{-/-} em relação aos WT nos levou a investigar a cinética de saída dos parasitas a fim de encontrar evidências de explicações. Os resultados demonstraram que o sobrenadante da célula hospedeira infectada com os parasitas TcP21^{-/-} apresentou maior número de parasitas a partir de 216 horas pós-infecção e que o amastigota foi uma forma de ciclo de vida do parasita muito observada. Nesse sentido, propusemos duas hipóteses não excludentes. Primeiro, os parasitas TcP21^{-/-} provavelmente multiplicam-se mais rapidamente do que os parasitas WT e CAS9. Assim, formas tripomastigotas romperiam prematuramente a célula hospedeira e se diferenciariam em amastigotas no sobrenadante, gerando amastigotas extracelulares.

Em segundo lugar, é razoável supor que uma maior taxa de multiplicação das formas amastigotas intracelulares nos parasitas nocautes para a P21 resultaria em um processo de diferenciação em tripomastigotas precoce na célula hospedeira, o que explicaria o maior número de amastigotas extracelulares no sobrenadante das células infectadas com TcP21^{-/-}. Nossos resultados em conjunto com algumas observações na literatura nos levam a pensar que seria possível supor que ausência da P21 nos parasitas poderia influenciar no ciclo lítico acelerando o processo de diferenciação, permitindo que as formas tripomastigotas possa fornecer uma torção suficiente para conseguir romper a membrana celular e como consequência uma saída rápida dos parasitas dessas células. (FERREIRA et al., 2021; MEIRELLES et al., 1992; SANTANA et al., 1997).

Ambas as hipóteses poderiam explicar a diminuição na multiplicação intracelular de parasitas TcP21^{-/-} em momentos posteriores de infecção, uma vez que em ambas as condições a célula hospedeira seria rompida prematuramente pelos parasitas e o processo de reinfecção não seria rápido o suficiente, uma vez que os nocautes TcP21^{-/-} são menos eficientes no processo de invasão. Este assunto será melhor abordado em estudos futuros do nosso grupo de pesquisa. Os parasitas CAS9 que expressam constitutivamente a enzima Cas9 se comportaram de forma semelhante ao WT na invasão da célula hospedeira, nos primeiros momentos de multiplicação intracelular e nos ensaios de eclosão. Em pontos de multiplicação posteriores, esses parasitas diferiram significativamente do WT. No entanto, a maioria dos resultados sugeriu que a expressão constitutiva de Cas9 não interferiu na biologia de *T. cruzi*. Assim, esses resultados confirmam que os parasitas CAS9 são bons controles para as abordagens experimentais. Vale

a pena mencionar que os parasitas TcP21^{-/-} também expressam constitutivamente Cas9 e diferiram significativamente dos parasitas WT e Cas9 na maioria das condições testadas. Nossos achados reforçam as evidências de que a P21 pode de fato desempenhar um papel importante na invasão de células hospedeiras de *T. cruzi*, na multiplicação e na saída dos parasitos para o meio extracelular.

Recentemente, autores demonstraram que *T. cruzi* pode entrar em estado de dormência espontânea. e que esses amastigotas dormentes podem ser altamente resistentes à terapia *in vivo* e *in vitro* (SÁNCHEZ-VALDÉZ et al., 2018). Além disso, os autores demonstraram a existência de uma diferença adaptativa entre cepas de *T. cruzi* para gerar células dormentes, e que a recombinação homóloga pode ser um importante fator que contribui para dormência (RESENDE et al., 2020). Por outro lado, outro grupo de pesquisa sugeriu que a persistência do *T. cruzi* continua envolvendo ciclos regulares de replicação, lise da célula hospedeira e reinfecção. E que não encontraram nenhuma evidência de dormência generalizada em parasitas que persistem no reservatório tecidual (WARD et al., 2020).

Apesar dos resultados controversos em relação à dormência de *T. cruzi*, o fato é que ao longo do curso da doença, o parasita pode apresentar menor taxa de replicação e ausência de parasitemia sistêmica. Nesse sentido, acreditamos que algum mecanismo finamente regulado controla a multiplicação e diferenciação do parasita ao longo da infecção. Assim, com base nos resultados apresentados aqui e outras evidências que reforçam o importante papel desempenhado pela P21 na invasão celular, multiplicação intracelular e diferenciação, levantamos a hipótese de que a P21 pode ser protagonista nesta maquinaria e estaria envolvida na perpetuação da doença no hospedeiro infectado, uma vez que parece orquestrar a retenção intracelular do parasita.

6 CONCLUSÃO

Este estudo foi capaz de demonstrar que a proteína P21 desempenha um papel importante no processo de invasão e multiplicação celular do parasita durante a infecção de *T. cruzi* da cepa G, devido os parasitas nocautes apresentarem uma menor taxa de invasão e um aumento da replicação de amastigotas intracelulares, acelerando a diferenciação e saída prematura do parasita da célula hospedeira. Em conclusão este trabalho demonstra que a edição gênica utilizada pela metodologia CRISPR/Cas9 na deleção do gene alvo da proteína P21 para obter parasitas nocautes, obteve sucesso na investigação de características fenotípicas desses parasitas no processo de infecção, e que de modo geral os resultados contribuem para o entendimento da relação parasita-hospedeiro no contexto da infecção por *T. cruzi* da cepa G. Nossos resultados corroboram com a compreensão de achados até aqui sobre a atividade biológica da proteína P21 em estar envolvida no processo de invasão e no controle de replicação do parasita, contribuindo com a persistência do protozoário no hospedeiro e favorecendo a cronificação da DC. Nossos resultados são importantes para compreender de forma mais profunda os aspectos relacionados a biologia do parasita uma vez que o protozoário representa uma ameaça significativa à saúde pública em todo mundo.

7 REFERÊNCIAS

- ANA PAULA, Ana Paula C.; TESSIER, Daniel C.; THOMAS, David Y.; SCHARFSTEIN, Julio; STORER, Andrew C.; VERNET, Thierry. Identification of new cysteine protease gene isoforms in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and biochemical parasitology**, [S. l.], v. 67, n. 2, p. 333–338, 1994. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(94\)00144-8](https://doi.org/10.1016/0166-6851(94)00144-8)
- ANDRADE, Luciana O.; ANDREWS, Norma W. Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 200, n. 9, p. 1135–1143, 2004. <https://doi.org/10.1084/jem.20041408>
- ANDRADE, Daniela V.; GOLLOB, Kenneth J.; DUTRA, Walderez O. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 8, n. 7, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003010>
- ANDRADE, Zilton A.; ANDRADE, Sonia G.; OLIVERIA, George B.; ALONSO, Daniel R. Histopathology of the conducting tissue of the heart in Chagas' myocarditis. **American Heart Journal**, [S. l.], v. 95, n. 3, p. 316–324, 1978. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(78\)90362-9](https://doi.org/10.1016/0002-8703(78)90362-9)
- ANGHEBEN, Andrea; BOIX, Lucia; BUONFRATE, Dora; GOBBI, Federico; BISOFFI, Zeno; PUPELLA, Simonetta; GANDINI, Giorgio; APRILI, Giuseppe. Chagas disease and transfusion medicine: A perspective from non-endemic countries. **Blood Transfusion**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 540–550, 2015.
- ANTUNES PAES, N. [Mortality due to infectious and parasitic diseases in the elderly in Brazil]. **Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health**, v. 15, n. 4, p. 233–241, 2004. <https://doi.org/10.1590/S1020-49892004000400003>
- ARAÚJO, C. A. C.; CABELLO, P. H.; JANSEN, A. M. Growth behaviour of two *Trypanosoma cruzi* strains in single and mixed infections: In vitro and in the intestinal tract of the blood-sucking bug, *Triatoma brasiliensis*. **Acta tropica**, v. 101, n. 3, p. 225–231, mar. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.02.004>
- ARAÚJO, C. A. C.; WANIEK, P. J.; JANSEN, A. M. An overview of Chagas disease and the role of triatomines on its distribution in Brazil. **Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 9, n. 3, p. 227–234, 1 jun. 2009. <https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0185>
- ASSAL, A.; CORBI, C. Maladie de Chagas et transfusion sanguine: Un problème parasitaire émergent dans les pays non endémiques. **Transfusion Clinique et Biologique**, [S. l.], v. 18, n. 2, p. 286–291, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2011.02.006>
- BALESTRIERI, Maria Luisa; BALESTRIERI, Antonio; MANCINI, Francesco Paolo; NAPOLI, Claudio. Understanding the immunoangiostatic CXC chemokine network. **Cardiovascular Research**, [S. l.], v. 78, n. 2, p. 250–256, 2008. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvn029>

BARMAN, Antara; DEB, Bornali; CHAKRABORTY, Supriyo. A glance at genome editing with CRISPR-Cas9 technology. **Current genetics**, [S. l.], v. 66, n. 3, p. 447–462, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00294-019-01040-3>

BARRIAS, Emile Santos; DE CARVALHO, Tecia Maria Ulisses; DE SOUZA, Wanderley. *Trypanosoma cruzi*: Entry into Mammalian Host Cells and Parasitophorous Vacuole Formation. **Frontiers in immunology**, [S. l.], v. 4, n. AUG, 2013. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00186>

BÉRTOLI, Marta; ANDÓ, Miriam Hitomi; DE ORNELAS TOLEDO, Max Jean; DE ARAÚJO, Silvana Marques; GOMES, Mônica Lúcia. Infectivity for mice of *Trypanosoma cruzi* I and II strains isolated from different hosts. **Parasitology research**, [S. l.], v. 99, n. 1, p. 7–13, 2006. <https://doi.org/10.1007/s00436-005-0122-7>

BIVONA, Augusto E.; SÁNCHEZ ALBERTI, Andrés; MATOS, Marina N.; CERNY, Natacha; CARDOSO, Alejandro C.; MORALES, Celina; GONZÁLEZ, Germán; CAZORLA, Silvia I.; MALCHIODI, Emilio L. *Trypanosoma cruzi* 80 kDa prolyl oligopeptidase (Tc80) as a novel immunogen for Chagas disease vaccine. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 12, n. 3, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006384>

BONFIM-MELO, Alexis; FERREIRA, Eden R.; FLORENTINO, Pilar T. V.; MORTARA, Renato A. Amastigote Synapse: The Tricks of *Trypanosoma cruzi* Extracellular Amastigotes. **Frontiers in microbiology**, [S. l.], v. 9, n. JUN, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01341>

BONFIM-MELO, Alexis; ZANETTI, Bianca Ferrarini; FERREIRA, Éden Ramalho; VANDONINCK, Sandy; HAN, Sang Won; VAN LINT, Johan; MORTARA, Renato Arruda; BAHIA, Diana. *Trypanosoma cruzi* extracellular amastigotes trigger the protein kinase D1-cortactin-actin pathway during cell invasion. **Cellular microbiology**, [S. l.], v. 17, n. 12, p. 1797–1810, 2015. <https://doi.org/10.1111/cmi.12472>

BONIFÁCIO, Bruno Souza; BONFIM-MELO, Alexis; MORTARA, Renato Arruda; FERREIRA, Éden Ramalho. Successful invasion of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes is dependent of host cell actin cytoskeleton. **The Journal of eukaryotic microbiology**, [S. l.], 2022. <https://doi.org/10.1111/jeu.12903>

BORGES, Bruna Cristina et al. The Recombinant Protein Based on *Trypanosoma cruzi* P21 Interacts With CXCR4 Receptor and Abrogates the Invasive Phenotype of Human Breast Cancer Cells. **Frontiers in cell and developmental biology**, [S. l.], v. 8, 2020. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.569729>

BRINEN, Linda S.; HANSELL, Elizabeth; CHENG, Jianming; ROUSH, William R.; MCKERROW, James H.; FLETTERICK, Robert J. A target within the target: probing cruzain's P1' site to define structural determinants for the Chagas' disease protease. **Structure (London, England : 1993)**, [S. l.], v. 8, n. 8, p. 831–840, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)00173-8](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00173-8)

BRADWELL, K. R. et al. Genomic comparison of *Trypanosoma conorhini* and *Trypanosoma rangeli* to *Trypanosoma cruzi* strains of high and low virulence. **BMC Genomics**, v. 19, n. 1, 24 out. 2018 <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5112-0>

BURGESS, Darren J. Technology: a CRISPR genome-editing tool. **Nature reviews. Genetics**,

[S. l.], v. 14, n. 2, p. 80, 2013. <https://doi.org/10.1038/nrg3409>

BURLE-CALDAS, Gabriela Assis; SOARES-SIMÕES, Melissa; LEMOS-PECHNICKI, Laiane; DAROCHA, Wanderson Duarte; TEIXEIRA, Santuza M. R. Assessment of two CRISPR-Cas9 genome editing protocols for rapid generation of *Trypanosoma cruzi* gene knockout mutants. **International Journal for Parasitology**, [S. l.], v. 48, n. 8, p. 591–596, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.02.002>

BUSTAMANTE, Juan M.; SANCHEZ-VALDEZ, Fernando; PADILLA, Angel M.; WHITE, Brooke; WANG, Wei; TARLETON, Rick L. A modified drug regimen clears active and dormant trypanosomes in mouse models of Chagas disease. **Science translational medicine**, [S. l.], v. 12, n. 567, 2020. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abb7656>

CAMPETELLA, O.; HENRIKSSON, J.; ÅSLUND, U.; FRASCH, A. C. C.; PETTERSSON, U.; CAZZULO, J. J. The major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* is encoded by multiple polymorphic tandemly organized genes located on different chromosomes. **Molecular and biochemical parasitology**, [S. l.], v. 50, n. 2, p. 225–234, 1992. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(92\)90219-A](https://doi.org/10.1016/0166-6851(92)90219-A)

CARADONNA, Kacey L.; BURLEIGH, Barbara A. Mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Advances in parasitology**, [S. l.], v. 76, p. 33–61, 2011. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385895-5.00002-5>

CARDOSO, Adriana V. N.; LESCANO, Susana A. Z.; AMATO NETO, Vicente; GAKIYA, Érika; SANTOS, Sérgio V. Survival of *Trypanosoma cruzi* in sugar cane used to prepare juice. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, [S. l.], v. 48, n. 5, p. 287–289, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652006000500009>

CATALA, S. S.; GORLA, D. E.; BASOMBRI, M. A. Vectorial Transmission of *Trypanosoma cruzi*: An Experimental Field Study with Susceptible and Immunized Hosts. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [S. l.], v. 47, n. 1, p. 20–26, 1992. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1992.47.20>

CHADALAWADA, Sindhu et al. Risk of Chronic Cardiomyopathy Among Patients With the Acute Phase or Indeterminate Form of Chagas Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. **JAMA Network Open**, [S. l.], v. 3, n. 8, p. e2015072, 2020. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.15072>

Chagas Disease - World Heart Federation. [s.d.]. Disponível em: <https://world-heart-federation.org/what-we-do/chagas-disease>.

CHATELAIN, Eric. Chagas disease research and development: Is there light at the end of the tunnel? **Computational and structural biotechnology journal**, [S. l.], v. 15, p. 98–103, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2016.12.002>

CHIURILLO, Miguel A.; LANDER, Noelia; VERCESI, Anibal E.; DOCAMPO, Roberto. IP 3 receptor-mediated Ca²⁺ release from acidocalcisomes regulates mitochondrial bioenergetics and prevents autophagy in *Trypanosoma cruzi*. **Cell calcium**, [S. l.], v. 92, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2020.102284>

CORDERO, Esteban M.; CORTEZ, Cristian; YOSHIDA, Nobuko; DA SILVEIRA, José

Franco. Signal peptide recognition in *Trypanosoma cruzi* GP82 adhesin relies on its localization at protein N-terminus. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 9, n. 1, 2019. a. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43743-0>

CORDERO, Esteban M.; CORTEZ, Cristian; YOSHIDA, Nobuko; DA SILVEIRA, José Franco. Signal peptide recognition in *Trypanosoma cruzi* GP82 adhesin relies on its localization at protein N-terminus. **Scientific reports**, [S. l.], v. 9, n. 1, 2019. b. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43743-0>

CORTEZ, Cristian; SOBREIRA, Tiago J. P.; MAEDA, Fernando Y.; YOSHIDA, Nobuko. The gp82 surface molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms. **Sub-Cellular Biochemistry**, [S. l.], v. 74, p. 137–150, 2014. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7305-9_6

COURA, J. R. [Epidemiologic determinants of Chagas' disease in Brazil: the infection, the disease and its morbidity/mortality]. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S. l.], v. 83 Suppl 1, p. 392–402, 1988. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761988000500032>

COURA, José Rodrigues; JUNQUEIRA, Angela C. V.; FERNANDES, Octavio; VALENTE, Sebastiao A. S.; MILES, Michael A. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. **Trends in parasitology**, [S. l.], v. 18, n. 4, p. 171–176, 2002. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(01\)02200-0](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(01)02200-0)

CRUZ-SAAVEDRA, L. et al. Transcriptional remodeling during metacyclogenesis in *Trypanosoma cruzi* I. **Virulence**, v. 11, n. 1, p. 969–980, 1 jan. 2020. <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1797274>

COUTO, Natália Fernanda et al. LAMP-2 absence interferes with plasma membrane repair and decreases *T. cruzi* host cell invasion. **PLoS neglected tropical diseases**, [S. l.], v. 11, n. 6, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005657>

DA SILVA, Aline A. et al. Galectin-3: A Friend but Not a Foe during *Trypanosoma cruzi* Experimental Infection. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, [S. l.], v. 7, n. NOV, 2017. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00463>

DA SILVA, Claudio V. et al. Characterization of a 21kDa protein from *Trypanosoma cruzi* associated with mammalian cell invasion. **Microbes and infection** **Characterization of a 21kDa protein from *Trypanosoma cruzi* associated with mammalian cell invasion**, [S. l.], v. 11, n. 5, p. 563–570, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.03.007>

DE MORAIS, C. G. V. et al. The Dialogue of the Host-Parasite Relationship: Leishmania spp. and *Trypanosoma cruzi* Infection. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/324915>

DIAS, F. B. S. et al. Ecology of *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) in Attalea palm trees of the Tapajós River Region (Pará State, Brazilian Amazon). **Parasites & vectors**, v. 7, n. 1, 1 abr. 2014. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-154>

DIAS, J. V. L. et al. Knowledge of triatomine insects and of the Chagas disease among people from localities which have different levels of vector infestations. **Ciencia & saude coletiva**, v. 21, n. 7, p. 2293–2304, 1 jul. 2016. <https://doi.org/10.1590/1413-81232015217.07792015>

DIAS, João Victor Leite; DE SOUZA, Rita de Cássia Moreira; SOUZA, Janice Maria Borba; DIOTAIUTI, Liléia Gonçalves; FERREIRA, Raquel Aparecida. Occurrence of *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) in an area under entomological surveillance in the Southeast Region of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S. l.], v. 54, p. 1–5, 2020. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0084-2020>

DICARLO, James E.; NORVILLE, Julie E.; MALI, Prashant; RIOS, Xavier; AACH, John; CHURCH, George M. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. **Nucleic acids research**, [S. l.], v. 41, n. 7, p. 4336–4343, 2013. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt135>

DOCAMPO, Roberto. Molecular parasitology in the 21st century. **Essays in biochemistry**, [S. l.], v. 51, n. 1, p. 1–13, 2011. <https://doi.org/10.1042/bse0510001>

DOS SANTOS, Guilherme Rodrigo RM; REZENDE LEITE, Ana Catarina; LANDER, Noelia; CHIURILLO, Miguel Angel; VERCESI, Aníbal Eugênio; DOCAMPO, Roberto. *Trypanosoma cruzi* Letm1 is involved in mitochondrial Ca²⁺ transport, and is essential for replication, differentiation, and host cell invasion. **The FASEB Journal**, [S. l.], v. 35, n. 7, p. e21685, 2021. <https://doi.org/10.1096/fj.202100120RR>

EAKIN, A. E.; MILLS, A. A.; HARTH, G.; MCKERROW, J. H.; CRAIK, C. S. The sequence, organization, and expression of the major cysteine protease (cruzain) from *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of biological chemistry**, [S. l.], v. 267, n. 11, p. 7411–7420, 1992. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)42533-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)42533-1)

ECHAVARRÍA, Natalia Giraldo; ECHEVERRÍA, Luis E.; STEWART, Merrill; GALLEGÓ, Catalina; SALDARRIAGA, Clara. Chagas Disease: Chronic Chagas Cardiomyopathy. **Current Problems in Cardiology**, [S. l.], v. 46, n. 3, p. 100507, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2019.100507>

ENGEL, Juan C.; DOYLE, Patricia S.; HSIEH, Ivy; MCKERROW, James H. Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of experimental medicine**, [S. l.], v. 188, n. 4, p. 725–734, 1998. <https://doi.org/10.1084/jem.188.4.725>

EUGENIA GIORGI, M.; DE LEDERKREMER, Rosa M. Trans-sialidase and mucins of *Trypanosoma cruzi*: an important interplay for the parasite. **Carbohydrate research**, [S. l.], v. 346, n. 12, p. 1389–1393, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.04.006>

FARROW, Anitra L.; RACHAKONDA, Girish; GU, Linlin; KRENDELCHTCHIKOVA, Valentina; NDE, Pius N.; PRATAP, Siddharth; LIMA, Maria F.; VILLALTA, Fernando; MATTHEWS, Qiana L. Immunization with Hexon Modified Adenoviral Vectors Integrated with gp83 Epitope Provides Protection against *Trypanosoma cruzi* Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 8, n. 8, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003089>

FERNANDES, Maria Cecilia; ANDREWS, Norma W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. **FEMS microbiology reviews**, [S. l.], v. 36, n. 3, p. 734–747, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00333.x>

FERREIRA, Éden Ramalho et al. Unique behavior of *Trypanosoma cruzi* mevalonate kinase: A conserved glycosomal enzyme involved in host cell invasion and signaling. **Scientific reports**, [S. l.], v. 6, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep24610>

FERREIRA, Renata C.; BRIONES, Marcelo R. S. Phylogenetic evidence based on *Trypanosoma cruzi* nuclear gene sequences and information entropy suggest that inter-strain intragenic recombination is a basic mechanism underlying the allele diversity of hybrid strains. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, [S. l.], v. 12, n. 5, p. 1064–1071, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.03.010>

FLORENTINO, Pilar T. V.; MENDES, Davi; VITORINO, Francisca Nathalia L.; MARTINS, Davi J.; CUNHA, Julia P. C.; MORTARA, Renato A.; MENCK, Carlos F. M. DNA damage and oxidative stress in human cells infected by *Trypanosoma cruzi*. **PLOS Pathogens**, [S. l.], v. 17, n. 4, p. e1009502, 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009502>

GOES, Grazielle R.; ROCHA, Peter S.; DINIZ, Aline R. S.; AGUIAR, Pedro H. N.; MACHADO, Carlos R.; VIEIRA, Leda Q. *Trypanosoma cruzi* Needs a Signal Provided by Reactive Oxygen Species to Infect Macrophages. **PLoS neglected tropical diseases**, [S. l.], v. 10, n. 4, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004555>

GRAZIELLE-SILVA, V. et al. *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* DNA Mismatch Repair Proteins Act Differently in the Response to DNA Damage Caused by Oxidative Stress. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 154, 16 abr. 2020. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00154>

GRELLIER, Philippe et al. *Trypanosoma cruzi* prolyl oligopeptidase Tc80 is involved in nonphagocytic mammalian cell invasion by trypomastigotes. **The Journal of biological chemistry**, [S. l.], v. 276, n. 50, p. 47078–47086, 2001. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106017200>

GUARNER, Jeannette. Chagas disease as example of a reemerging parasite. **Seminars in Diagnostic Pathology**, [S. l.], v. 36, n. 3, p. 164–169, 2019. <https://doi.org/10.1053/j.semdp.2019.04.008>

HERREROS-CABELLO, Alfonso; CALLEJAS-HERNÁNDEZ, Francisco; FRESNO, Manuel; GIRONÈS, Núria. Comparative proteomic analysis of trypomastigotes from *Trypanosoma cruzi* strains with different pathogenicity. **Infection, Genetics and Evolution**, [S. l.], v. 76, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104041>

HORTA, Maria Fátima; ANDRADE, Luciana Oliveira; MARTINS-DUARTE, Érica Santos; CASTRO-GOMES, Thiago. Cell invasion by intracellular parasites - the many roads to infection. **Journal of cell science**, [S. l.], v. 133, n. 4, 2020. <https://doi.org/10.1242/jcs.232488>

HRYHOROWICZ, Magdalena; LIPÍŃSKI, Daniel; ZEYLAND, Joanna; SŁOMSKI, Ryszard. CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, [S. l.], v. 65, n. 3, p. 233–240, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00005-016-0427-5>

HULL, R. N.; CHERRY, W. R.; TRITCH, O. J. GROWTH CHARACTERISTICS OF MONKEY KIDNEY CELL STRAINS LLC-MK1, LLC-MK2, AND LLC-MK2(NCTC-3196) AND THEIR UTILITY IN VIRUS RESEARCH. **The Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 115, n. 5, p. 903, 1962. <https://doi.org/10.1084/jem.115.5.903>

HUSSMANN, Jeffrey A. et al. Mapping the genetic landscape of DNA double-strand break

repair. *Cell*, [S. l.], v. 184, n. 22, p. 5653–5669.e25, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.10.002>

ISHEMGULOVA, Aygul; HLAVÁČOVÁ, Jana; MAJEROVÁ, Karolina; BUTENKO, Anzhelika; LUKEŠ, Julius; VOTÝPKA, Jan; VOLF, Petr; YURCHENKO, Vyacheslav. CRISPR/Cas9 in *Leishmania mexicana*: A case study of LmxBTN1. *PLoS ONE*, [S. l.], v. 13, n. 2, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192723>

JANIK, E. et al. Various Aspects of a Gene Editing System—CRISPR–Cas9. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol. 21, Page 9604, v. 21, n. 24, p. 9604, 16 dez. 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21249604>

JIANG, Wenyan; BIKARD, David; COX, David; ZHANG, Feng; MARRAFFINI, Luciano A. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nature biotechnology*, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 233–239, 2013. <https://doi.org/10.1038/nbt.2508>

JINEK, Martin; CHYLINSKI, Krzysztof; FONFARA, Ines; HAUER, Michael; DOUDNA, Jennifer A.; CHARPENTIER, Emmanuelle. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.)*, [S. l.], v. 337, n. 6096, p. 816–821, 2012. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>

KAWAGUCHI, Nanako; ZHANG, Ting-Ting; NAKANISHI, Toshio. Involvement of CXCR4 in Normal and Abnormal Development. *Cells*, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 185, 2019. <https://doi.org/10.3390/cells8020185>

KOLEV, Nikolay G.; TSCHUDI, Christian; ULLU, Elisabetta. RNA Interference in Protozoan Parasites: Achievements and Challenges. *Eukaryotic Cell*, [S. l.], v. 10, n. 9, p. 1156, 2011. <https://doi.org/10.1128/EC.05114-11>

KOLLIEN, Astrid H.; SCHAUB, Günter A. *Trypanosoma cruzi* in the rectum of the bug *Triatoma infestans*: effects of blood ingestion of the vector and artificial diuresis. *Parasitology research*, [S. l.], v. 83, n. 8, p. 781–788, 1997. <https://doi.org/10.1007/s004360050339>

KRATZ, Jadel Müller. Drug discovery for chagas disease: A viewpoint. *Acta Tropica*, [S. l.], v. 198, p. 105107, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105107>

LABELLO BARBOSA, Rodrigo; DIAS, Viviane Liotti; LOROSA, Elias Seixas; DE GÓES COSTA, Elenild; PEREIRA, Karen Signori; GILIOLI, Rovilson; GUARALDO, Ana Maria Aparecida; PASSOS, Luiz Augusto Corrêa. Virulence of *Trypanosoma cruzi* from vector and reservoir in in natura açai pulp resulting in food-borne acute Chagas disease at Pará State, Brazil. *Experimental parasitology*, [S. l.], v. 197, p. 68–75, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.10.012>

LANDER, Noelia; CHIURILLO, Miguel A. State-of-the-art CRISPR/Cas9 Technology for Genome Editing in Trypanosomatids. *The Journal of eukaryotic microbiology*, [S. l.], v. 66, n. 6, p. 981, 2019. <https://doi.org/10.1111/jeu.12747>

LANDER, Noelia; CHIURILLO, Miguel A.; DOCAMPO, Roberto. Genome Editing by CRISPR/Cas9 in *Trypanosoma cruzi*. *Methods in Molecular Biology*, [S. l.], v. 1955, p. 61–76, 2019. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9148->

LANDER, Noelia; CHIURILLO, Miguel A.; STOREY, Melissa; VERCESI, Anibal E.; DOCAMPO, Roberto. CRISPR/Cas9-mediated endogenous C-terminal Tagging of *Trypanosoma cruzi* Genes Reveals the Acidocalcisome Localization of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 291, n. 49, p. 25505, 2016. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.749655>

LANDER, Noelia; CRUZ-BUSTOS, Teresa; DOCAMPO, Roberto. A CRISPR/Cas9-riboswitch-Based Method for Downregulation of Gene Expression in *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [S. l.], v. 10, 2020. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00068>

LANDER, Noelia; LI, Zhu Hong; NIYOGI, Sayantanee; DOCAMPO, Roberto. CRISPR/Cas9-Induced Disruption of Paraflagellar Rod Protein 1 and 2 Genes in *Trypanosoma cruzi* Reveals Their Role in Flagellar Attachment. **mBio**, [S. l.], v. 6, n. 4, 2015. <https://doi.org/10.1128/mBio.01012-15>

LARA, F. A. et al. Heme requirement and intracellular trafficking in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Biochemical and biophysical research communications**, [S. l.], v. 355, n. 1, p. 16–22, 2007. LESLIE, M. Drug developers finally take aim at a neglected Disease. **Science**, v. 333, n. 6045, p. 933–935, 19 ago. 2011. <https://doi.org/10.1126/science.333.6045.933>

LI, Jian Feng; NORVILLE, Julie E.; AACH, John; MCCORMACK, Matthew; ZHANG, Dandan; BUSH, Jenifer; CHURCH, George M.; SHEEN, Jen. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana using guide RNA and Cas9. **Nature biotechnology**, [S. l.], v. 31, n. 8, p. 688–691, 2013. <https://doi.org/10.1038/nbt.2654>

LIN, Zi Qi; GAN, Soo Wah; TUNG, Szu Yu; HO, Chun Che; SU, Li Hsin; SUN, Chin Hung. Development of CRISPR/Cas9-mediated gene disruption systems in Giardia lamblia. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 14, n. 3, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213594>

LIMA, F. M. et al. The challenge of Chagas' disease: Has the human pathogen, *Trypanosoma cruzi*, learned how to modulate signaling events to subvert host cells? **New Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 837–843, 31 dez. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2010.02.003>

LISBOA, C. V.; MANGIA, R. H.; LUZ, S. L. B.; KLUCZKOVSKI, A.; FERREIRA, L. F.; RIBEIRO, C. T.; FERNANDES, O.; JANSEN, A. M. Stable infection of primates with *Trypanosoma cruzi* I and II. **Parasitology**, [S. l.], v. 133, n. Pt 5, p. 603–611, 2006. <https://doi.org/10.1017/S0031182006000722>

LIU, Zongyuan; ULRICH VONBARGEN, Rebecca; MCCALL, Laura Isobel. Central role of metabolism in *Trypanosoma cruzi* tropism and Chagas disease pathogenesis. **Current opinion in microbiology**, [S. l.], v. 63, p. 204–209, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.07.015>

LOCH, Leonardo; ONOFRE, Thiago Souza; RODRIGUES, João Paulo Ferreira; YOSHIDA, Nobuko. Shedding of *Trypanosoma cruzi* Surface Molecules That Regulate Host Cell Invasion Involves Phospholipase C and Increases Upon Sterol Depletion. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, [S. l.], v. 11, 2021. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.769722>

MA, Yuanwu; ZHANG, Lianfeng; HUANG, Xingxu. Genome modification by CRISPR/Cas9. **The FEBS Journal**, [S. l.], v. 281, n. 23, p. 5186–5193, 2014. <https://doi.org/10.1111/febs.13110>

MACHADO-SILVA, Alice; CERQUEIRA, Paula Gonçalves; GRAZIELLE-SILVA, Viviane; GADELHA, Fernanda Ramos; PELOSO, Eduardo de Figueiredo; TEIXEIRA, Santuza Maria Ribeiro; MACHADO, Carlos Renato. How *Trypanosoma cruzi* deals with oxidative stress: Antioxidant defence and DNA repair pathways. **Mutation research. Reviews in mutation research**, [S. l.], v. 767, p. 8–22, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2015.12.003>

MAEDA, Fernando Yukio; CORTEZ, Cristian; ALVES, Renan Melatto; YOSHIDA, Nobuko. Mammalian cell invasion by closely related *Trypanosoma* species *T. dionisii* and *T. cruzi*. **Acta tropica**, [S. l.], v. 121, n. 2, p. 141–147, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.10.017>

MAGDESIAN, Margaret H.; TONELLI, Renata R.; FESSEL, Melissa R.; SILVEIRA, Mariana S.; SCHUMACHER, Robert I.; LINDEN, Rafael; COLLI, Walter; ALVES, Maria Júlia M. A conserved domain of the gp85/trans-sialidase family activates host cell extracellular signal-regulated kinase and facilitates *Trypanosoma cruzi* infection. **Experimental cell research**, [S. l.], v. 313, n. 1, p. 210–218, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.10.008>

MALDONADO, Edio; ROJAS, Diego A.; MORALES, Sebastian; MIRALLES, Vicente; SOLARI, Aldo. Dual and Opposite Roles of Reactive Oxygen Species (ROS) in Chagas Disease: Beneficial on the Pathogen and Harmful on the Host. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [S. l.], v. 2020, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8867701>

MALI, Prashant; YANG, Luhan; ESVELT, Kevin M.; AACH, John; GUELL, Marc; DICARLO, James E.; NORVILLE, Julie E.; CHURCH, George M. RNA-guided human genome engineering via Cas9. **Science (New York, N.Y.)**, [S. l.], v. 339, n. 6121, p. 823–826, 2013. <https://doi.org/10.1126/science.1232033>

MANGANO, Valentina D.; PRATO, Marco; MARVELLI, Antonella; MOSCATO, Giovanna; BRUSCHI, Fabrizio. Screening of at-risk blood donors for Chagas disease in non-endemic countries: Lessons from a 2-year experience in Tuscany, Italy. **Transfusion Medicine**, [S. l.], v. 31, n. 1, p. 63–68, 2021. <https://doi.org/10.1111/tme.12741>

MARTINS-MELO, Francisco Rogerlândio; DA SILVEIRA LIMA, Mauricélia; RAMOS, Alberto Novaes; ALENCAR, Carlos Henrique; HEUKELBACH, Jörg. Prevalence of Chagas disease in pregnant women and congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Brazil: a systematic review and meta-analysis. **Tropical medicine & international health : TM & IH**, [S. l.], v. 19, n. 8, p. 943–957, 2014. <https://doi.org/10.1111/tmi.12328>

MARTINS, Flávia Alves et al. The Recombinant Form of *Trypanosoma cruzi* P21 Controls Infection by Modulating Host Immune Response. **Frontiers in immunology**, [S. l.], v. 11, 2020. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01010>

MATTHEWS, Qiana L. et al. Epitope Capsid-Incorporation: A New Effective Approach for Vaccine Development for Chagas Disease. **Pathogens & Immunity**, [S. l.], v. 1, n. 2, p. 214, 2016. <https://doi.org/10.20411/pai.v1i2.114>

MATTOS, Eliciane C.; TONELLI, Renata R.; COLLI, Walter; ALVES, Maria Julia M. The

Gp85 surface glycoproteins from *Trypanosoma cruzi*. **Sub-cellular biochemistry**, [S. l.], v. 74, p. 151–180, 2014. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7305-9_7

MAZZETI, Ana Lia; CAPELARI-OLIVEIRA, Patricia; BAHIA, Maria Terezinha; MOSQUEIRA, Vanessa Carla Furtado. Review on Experimental Treatment Strategies Against *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Experimental Pharmacology**, [S. l.], v. 13, p. 409, 2021. <https://doi.org/10.2147/JEP.S267378>

MIR, A. et al. Type II-C CRISPR-Cas9 Biology, Mechanism, and Application. **ACS chemical biology**, v. 13, n. 2, p. 357–365, 16 fev. 2018. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00855>

MIRANDA, M. R.; SAYÉ, M. M. Chagas Disease Treatment: From New Therapeutic Targets to Drug Discovery and Repositioning. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 36, p. 6517–6518, 16 dez. 2019. <https://doi.org/10.2174/092986732636191202125919>

MCGRATH, M. E.; EAKIN, A. E.; ENGEL, J. C.; MCKERROW, J. H.; CRAIK, C. S.; FLETTERICK, R. J. The crystal structure of cruzain: a therapeutic target for Chagas' disease. **Journal of molecular biology**, [S. l.], v. 247, n. 2, p. 251–9, 1995. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.0137>

MORETTI, Nilmar Silvio; MORTARA, Renato Arruda; SCHENKMAN, Sergio. *Trypanosoma cruzi*. **Trends in Parasitology**, [S. l.], v. 36, n. 4, p. 404–405, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.10.002>

MORILLO, Carlos A. et al. Benznidazole and Posaconazole in Eliminating Parasites in Asymptomatic T. Cruzi Carriers: The STOP-CHAGAS Trial. **Journal of the American College of Cardiology**, [S. l.], v. 69, n. 8, p. 939–947, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.12.023>

MOTTA, Flávia Nader; AZEVEDO, Clênia dos Santos; NEVES, Beatriz Pereira; ARAÚJO, Carla Nunes De; GRELLIER, Philippe; SANTANA, Jaime Martins De; BASTOS, Izabela Marques Dourado. Oligopeptidase B, a missing enzyme in mammals and a potential drug target for trypanosomatid diseases. **Biochimie**, [S. l.], v. 167, p. 207–216, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.10.006>

MURTA, Silvane M. F. et al. Deletion of copies of the gene encoding old yellow enzyme (TcOYE), a NAD(P)H flavin oxidoreductase, associates with in vitro-induced benznidazole resistance in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and biochemical parasitology**, [S. l.], v. 146, n. 2, p. 151–162, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.12.001>

NABA, Alexandra; CLAUSER, Karl R.; DING, Huiming; WHITTAKER, Charles A.; CARR, Steven A.; HYNES, Richard O. The extracellular matrix: Tools and insights for the “omics” era. **Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology**, [S. l.], v. 49, p. 10–24, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.06.003>

NOGUEIRA, Natália P. et al. Heme modulates *Trypanosoma cruzi* bioenergetics inducing mitochondrial ROS production. **Free radical biology & medicine**, [S. l.], v. 108, p. 183–191, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.03.027>

NORMAN, Francesca F.; LÓPEZ-VÉLEZ, Rogelio. Chagas disease: Comments on the 2018

PAHO Guidelines for diagnosis and management. **Journal of Travel Medicine**, [S. l.], v. 26, n. 7, 2019. <https://doi.org/10.1093/jtm/taz060>

NUNES, Maria Carmo Pereira; DONES, Wistremundo; MORILLO, Carlos A.; ENCINA, Juan Justiniano; RIBEIRO, Antônio Luiz. Chagas Disease: An Overview of Clinical and Epidemiological Aspects. **Journal of the American College of Cardiology**, [S. l.], v. 62, n. 9, p. 767–776, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.05.046>

OLIVEIRA, Francisco Odencio Rodrigues De et al. *Trypanosoma cruzi* heparin-binding proteins and the nature of the host cell heparan sulfate-binding domain. **Microbial pathogenesis**, [S. l.], v. 44, n. 4, p. 329–338, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2007.10.003>

OLIVEIRA, Inés; TORRICO, Faustino; MUOZ, Jose; GASCON, Joaquim. Congenital transmission of Chagas disease: a clinical approach. **Expert review of anti-infective therapy**, [S. l.], v. 8, n. 8, p. 945–956, 2010. <https://doi.org/10.1586/eri.10.74>

OPAS divulga novo guia para diagnóstico e tratamento da doença de Chagas - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde. [s.d.]. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/7-1-2019-opas-divulga-novo-guia-para-diagnostico-e-tratamento-da-doenca-chagas>.

OUAISSI, M. A.; CORNETTE, J.; AFCHAIN, D.; CAPRON, A.; GRAS-MASSE, H.; TARTAR, A. *Trypanosoma cruzi* infection inhibited by peptides modeled from a fibronectin cell attachment domain. **Science (New York, N.Y.)**, [S. l.], v. 234, n. 4776, p. 603–607, 1986. <https://doi.org/10.1126/science.3094145>

PAIVA, Cláudia N. et al. Oxidative stress fuels *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 122, n. 7, p. 2531, 2012. <https://doi.org/10.1172/JCI58525>

PANDEY, Ramendra Pati; NASCIMENTO, Marilda Savoia; MOORE, Catrin E.; RAJ, V. Samuel; KALIL, Jorge; CUNHA-NETO, Edecio. New Approaches for the Treatment of Chagas Disease. **Current drug targets**, [S. l.], v. 22, n. 7, p. 835–841, 2021. <https://doi.org/10.2174/1389450121999201124122643>

PATINO, Luz Helena; RAMÍREZ, Juan David. RNA-seq in kinetoplastids: A powerful tool for the understanding of the biology and host-pathogen interactions. **Infection, Genetics and Evolution**, [S. l.], v. 49, p. 273–282, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.02.003>

PEREIRA, Karen Signori; SCHMIDT, Flávio Luis; BARBOSA, Rodrigo L.; GUARALDO, Ana M. A.; FRANCO, Regina M. B.; DIAS, Viviane L.; PASSOS, Luiz A. C. Transmission of chagas disease (American trypanosomiasis) by food. **Advances in food and nutrition research**, [S. l.], v. 59, p. 63–85, 2010. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(10\)59003-X](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(10)59003-X)

PICCHI-CONSTANTE, Gisele Fernanda Assine; HIRAIWA, Priscila Mazzocchi; MAREK, Martin; ROGERIO, Vanessa Zulkievicz; GUERRA-SLOMPO, Eloise Pavão; ROMIER, Christophe; ZANCHIN, Nilson Ivo Tonin. Efficient CRISPR-Cas9-mediated genome editing for characterization of essential genes in *Trypanosoma cruzi*. **STAR protocols**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 101324, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101324>

PINEDA, Miguel A.; CUERVO, Henar; FRESNO, Manuel; SOTO, Manuel; BONAY, Pedro.

Lack of Galectin-3 Prevents Cardiac Fibrosis and Effective Immune Responses in a Murine Model of *Trypanosoma cruzi* Infection. **Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 212, n. 7, p. 1160–1171, 2015. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv185>

PINO-MARÍN, Antonia et al. Chagas Cardiomyopathy: From Romaña Sign to Heart Failure and Sudden Cardiac Death. **Pathogens**, [S. l.], v. 10, n. 5, 2021. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050505>

Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Doença de Chagas. [S. l.], [s.d.]. Disponível em: <http://conitec.gov.br>.

RAMÍREZ, Galia et al. *Trypanosoma cruzi* calreticulin: a novel virulence factor that binds complement C1 on the parasite surface and promotes infectivity. **Immunobiology**, [S. l.], v. 216, n. 1–2, p. 265–273, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.04.001>

RAWLINGS, Neil D.; BARRETT, Alan J.; THOMAS, Paul D.; HUANG, Xiaosong; BATEMAN, Alex; FINN, Robert D. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 46, 2018. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1134>

RESENDE, B. C. et al. The Influence of Recombinational Processes to Induce Dormancy in *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 10, 28 jan. 2020. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00005>

RIBEIRO, Aline Rimoldi et al. Biological and Molecular Characterization of *Trypanosoma cruzi* Strains from Four States of Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [S. l.], v. 98, n. 2, p. 453, 2018. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0200>

ROCHA, Ivonete Helena; FERREIRA MARQUES, Ana Luisa; MORAES, Giselle Vanessa; ALVES DA SILVA, Djalma Alexandre; SILVA, Marcos Vinicius Da; RODRIGUES, Virmondes; CUNHA, Daniel Ferreira Da; CORREIA, Dalmo. Metabolic and immunological evaluation of patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas disease. **Medicine**, [S. l.], v. 99, n. 51, p. e23773, 2020. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000023773>

RODRIGUES, Adele A. et al. A recombinant protein based on *Trypanosoma cruzi* P21 enhances phagocytosis. **PloS one**, [S. l.], v. 7, n. 12, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051384>

RODRIGUES, João Paulo Ferreira; TAKAHASHI SANT'ANA, Guilherme Hideki; JULIANO, Maria Aparecida; YOSHIDA, Nobuko. Inhibition of Host Cell Lysosome Spreading by *Trypanosoma cruzi* Metacyclic Stage-Specific Surface Molecule gp90 Downregulates Parasite Invasion. **Infection and immunity**, [S. l.], v. 85, n. 9, 2017. <https://doi.org/10.1128/IAI.00302-17>

ROZARIO, Tania; DESIMONE, Douglas W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. **Developmental biology**, [S. l.], v. 341, n. 1, p. 126–140, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.10.026>

RYTER, Stefan W.; TYRRELL, Rex M. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. **Free radical**

biology & medicine, [S. l.], v. 28, n. 2, p. 289–309, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00223-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00223-3)

SANTANA, J. M. et al. A *Trypanosoma cruzi*-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. **The Biochemical journal**, v. 325 (Pt 1), n. Pt 1, p. 129–137, 1 jul. 1997. <https://doi.org/10.1042/bj3250129>

SANTANA, R. A. G. et al. Oral Transmission of *Trypanosoma cruzi*, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n. 1, p. 132, 1 jan. 2019a

SAMPAIO, George Harisson Felinto; DA SILVA, Andressa Noronha Barbosa; BRITO, Carlos Ramon Do Nascimento; HONORATO, Nathan Ravi Medeiros; DE OLIVEIRA, Luara Musse; DA CÂMARA, Antônia Claudia Jácome; GALVÃO, Lúcia Maria da Cunha. Epidemiological profile of acute Chagas disease in individuals infected by oral transmission in northern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S. l.], v. 53, p. 1–7, 2020. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0088-2020>

SAN FRANCISCO, Juan et al. Decreased cruzipain and gp85/trans-sialidase family protein expression contributes to loss of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote virulence. **Microbes and infection**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 55–61, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.08.003>

SÁNCHEZ-VALDÉZ, Fernando J.; PADILLA, Angel; WANG, Wei; ORR, Dylan; TARLETON, Rick L. Spontaneous dormancy protects *Trypanosoma cruzi* during extended drug exposure. **eLife**, [S. l.], v. 7, 2018. <https://doi.org/10.7554/eLife.34039>

SANTIAGO, Helton C. et al. NADPH phagocyte oxidase knockout mice control *Trypanosoma cruzi* proliferation, but develop circulatory collapse and succumb to infection. **PLoS neglected tropical diseases**, [S. l.], v. 6, n. 2, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001492>

SANTOS, Marlus Alves Dos et al. A successful strategy for the recovering of active P21, an insoluble recombinant protein of *Trypanosoma cruzi*. **Scientific reports**, [S. l.], v. 4, 2014. <https://doi.org/10.1038/srep04259>

SANTOS, Emily F. et al. Acute Chagas disease in Brazil from 2001 to 2018: A nationwide spatiotemporal analysis. [S. l.], 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008445>

SCHIJMAN, Alejandro G. Molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi*. **Acta tropica**, [S. l.], v. 184, p. 59–66, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.02.019>

SCHOFIELD, C. J. Eradication of *Triatoma infestans*: a new regional programme for southern Latin America. **Annales de la Societe belge de medecine tropicale**, [S. l.], v. 72 Suppl 1, p. 69–70, 1992.

SHEN, Bin; ZHANG, Jun; WU, Hongya; WANG, Jianying; MA, Ke; LI, Zheng; ZHANG, Xueguang; ZHANG, Pumin; HUANG, Xingxu. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. **Cell research**, [S. l.], v. 23, n. 5, p. 720–723, 2013. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.46>

SILVEIRA, Antônio Carlos; DIAS, João Carlos Pinto. [The control of vectorial transmission]. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S. l.], v. 44 Suppl 2, n. SUPPL. 2,

p. 52–63, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822011000800009>

STROBER, Warren. Wright-Giemsa and Nonspecific Esterase Staining of Cells. **Current Protocols in Cytometry**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. A.3D.1-A.3D.4, 2000. <https://doi.org/10.1002/0471142956.cya03ds11>

SVIDRITSKIY, Egor; LING, Clarence; ERMOLENKO, Dmitri N.; KOROSTELEV, Andrei A. Blastocidin S inhibits translation by trapping deformed tRNA on the ribosome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 110, n. 30, p. 12283–12288, 2013. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304922110>

TARLETON, Rick L. Chagas disease: a role for autoimmunity? **Trends in parasitology**, [S. l.], v. 19, n. 10, p. 447–451, 2003. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2003.08.008>

TEIXEIRA, Samuel Cota et al. Mechanistic Insights into the Anti-angiogenic Activity of *Trypanosoma cruzi* Protein 21 and its Potential Impact on the Onset of Chagasic Cardiomyopathy. **Scientific reports**, [S. l.], v. 7, 2017. <https://doi.org/10.1038/srep44978>

TEIXEIRA, Thaise L. et al. Experimental evidences that P21 protein controls *Trypanosoma cruzi* replication and modulates the pathogenesis of infection. **Microbial pathogenesis**, [S. l.], v. 135, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103618>

TEIXEIRA, Thaise Lara et al. *Trypanosoma cruzi* P21: a potential novel target for chagasic cardiomyopathy therapy. **Scientific reports**, [S. l.], v. 5, 2015. <https://doi.org/10.1038/srep16877>

TEIXEIRA, Thaise Lara et al. Ablation of the P21 Gene of *Trypanosoma cruzi* Provides Evidence of P21 as a Mediator in the Control of Epimastigote and Intracellular Amastigote Replication. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [S. l.], v. 12, p. 1, 2022. a. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.799668>

THAKARE, R.; DASGUPTA, A.; CHOPRA, Sidharth. Update on nifurtimox for treatment of Chagas disease. **Drugs of Today**, [S. l.], v. 57, n. 4, p. 251–263, 2021. <https://doi.org/10.1358/dot.2021.57.4.3251712>

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. **The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited**. International Journal for Parasitology. **Anais...**Pergamon, 1 maio 2001.

VELGE, P.; OUAISSI, M. A.; CORNETTE, J.; AFCHAIN, D.; CAPRON, A. Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote collagen-binding proteins: possible role in cell-parasite interaction. **Parasitology**, [S. l.], v. 97 (Pt 2), p. 255–68, 1988.

VILLALTA, Fernando; RACHAKONDA, Girish. Advances in preclinical approaches to Chagas disease drug discovery. **Expert opinion on drug discovery**, [S. l.], v. 14, n. 11, p. 1161, 2019. <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1652593>

VILLALTA, F. et al. Perspectives on the *Trypanosoma cruzi*–host cell receptor interactions. **Parasitology research**, v. 104, n. 6, p. 1251, 13 jun. 2009. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1383-3>

VILLALTA, Fernando; ZHANG, Yuan; BIBB, Kartz E.; PRATAP, Siddharth; BURNS, James

- M.; LIMA, Maria F. Signal transduction in human macrophages by gp83 ligand of *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote gp83 ligand up-regulates trypanosome entry through protein kinase C activation. **Molecular cell biology research communications: MCBRC**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 64–70, 1999. <https://doi.org/10.1006/mcbr.1999.0150>
- WARD, A. I. et al. *Trypanosoma cruzi* amastigotes that persist in the colon during chronic stage murine infections have a reduced replication rate. **Open biology**, v. 10, n. 12, 1 dez. 2020. <https://doi.org/10.1098/rsob.200261>
- WALKER, Dawn M.; OGHUMU, Steve; GUPTA, Gaurav; MCGWIRE, Bradford S.; DREW, Mark E.; SATOSKAR, Abhay R. Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [S. l.], v. 71, n. 7, p. 1245–1263, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1491-1>
- WEN, Jian Jun; VYATKINA, Galina; GARG, Nisha. Oxidative damage during chagasic cardiomyopathy development: Role of mitochondrial oxidant release and inefficient antioxidant defense. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 37, n. 11, p. 1821–1833, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.08.018>
- YADAV, Neelam; NARANG, Jagriti; CHHILLAR, Anil Kumar; RANA, Jogender Singh. CRISPR: A new paradigm of theranostics. **Nanomedicine**, [S. l.], v. 33, p. 102350, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2020.102350>
- YOSHIDA, Nobuko; CORTEZ, Mauro. *Trypanosoma cruzi*: parasite and host cell signaling during the invasion process. **Sub-cellular biochemistry**, [S. l.], v. 47, p. 82–91, 2008. https://doi.org/10.1007/978-0-387-78267-6_6
- ZAIDEL, Ezequiel José et al. COVID-19: Implications for People with Chagas Disease. **Global Heart**, [S. l.], v. 15, n. 1, 2020. <https://doi.org/10.5334/gh.891>
- ZINGALES, Bianca. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. **Acta tropica**, [S. l.], v. 184, p. 38–52, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017>
- ZUMA, Aline A.; DOS SANTOS BARRIAS, Emile; DE SOUZA, Wanderley. Basic Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current Pharmaceutical Design**, [S. l.], v. 27, n. 14, p. 1671–1732, 2020. <https://doi.org/10.2174/1381612826999201203213527>