



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Departamento de Farmácia

SKARLENT OHARA BATISTA DE OLIVEIRA

**COMPLEXOS PROTÉICOS ENVOLVIDOS NA DIVISÃO CELULAR EM
TRIPANOSSOMATÍDEOS**

Brasília
2019

SKARLENT OHARA BATISTA DE OLIVEIRA

**COMPLEXOS PROTÉICOS ENVOLVIDOS NA DIVISÃO CELULAR EM
TRIPANOSSOMATÍDEOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Farmácia da Universidade de Brasília como parte das exigências para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart
Co-orientador: Msc. Agnelo Rodrigues de Souza Neto

Brasília
2019

SKARLENT OHARA BATISTA DE OLIVEIRA

**COMPLEXOS PROTÉICOS ENVOLVIDOS NA DIVISÃO CELULAR EM
TRIPANOSSOMATÍDEOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de bacharel em Farmácia da Universidade de Brasília como parte das exigências para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Brasília, 02 de Dezembro de 2019

BANCA EXAMINADORA
Prof.ª Dra. Fabiana Brandão
Mat.: FUB 1116762 / SIAPE 1335413
Universidade de Brasília - UnB

Presidente da banca: Prof.ª. Dr.ª. Fabiana Brandão Alves Silva

(Departamento de Farmácia/Universidade de Brasília)

Co-orientador: Msc. Agnelo Rodrigues de Souza Neto

(Departamento de Pós Graduação em Patologia Molecular/Universidade de
Brasília)

Examinador: Dr. Agenor de Castro Moreira dos Santos Júnior

(Laboratório Central de Saúde Pública/Secretaria de Estado de Saúde)

*“...é necessário toda a corrida que você tem para se manter no mesmo lugar. Se
você quer ir a um lugar diferente, você deve correr pelo menos duas vezes mais
rápido...”*

Lewis Carroll

*“Tu não és intolerante e tu não obrigas alguém a adotar
tuas crendices. É por isso que eu comecei a te amar.”*

Mika Waltari

AGRADECIMENTOS

Sou grata a Deus, pois até aqui o Senhor me ajudou e me amparou nas mais diversas situações. Por ter me concedido saúde, força e sabedoria para enfrentar as dificuldades.

Agradeço aos meus pais, Assis e Francisca, por me apoiarem durante a graduação e não medirem esforços para me ajudar, por me amarem incondicionalmente. Em especial, agradeço à minha mãe, por ter sido o meu maior suporte durante toda a vida. Por sacrificar seus próprios sonhos e desejos no intuito de ver a meus irmãos e a mim nos melhores lugares que poderíamos alcançar.

Aos meus irmãos, Franklin e Júnior, por estarem sempre ao meu lado. Por sempre, desde que me conheço por gente, não medirem esforços para me ver feliz e por acreditarem no meu sucesso.

Às minhas queridas cunhadas, Karina e Vanessa, por terem sido maravilhosas companheiras durante essa jornada.

Gostaria de agradecer ao meu orientador, professor Carlos André, por me acolher com os braços abertos em seu projeto e confiar parte dele a mim. Por todo conhecimento compartilhado, pela empatia admirável e por sempre estar disponível. Obrigada por tudo!

Agradeço à professora Beatriz Dolabela de Lima que abriu as portas do laboratório de Biologia do Gene para que esse projeto pudesse ser realizado e por seus vastos ensinamentos durante minha jornada por lá.

Agradeço ao professor nato Agnelo Rodrigues, por me mostrar como a ciência é magnífica e me instigar a conhecer mais e mais a cada experimento. Pela incrível paciência a cada ensinamento e todo entusiasmo durante as jornadas de experimentos que tornou o processo leve e alegre.

Um agradecimento especial à professora Fabiana Brandão que não mediu esforços e gentilmente se dispôs a me ajudar no estágio final deste projeto.

À todos os colegas do laboratório de Biologia do Gene, Bianca, Carol, Mariana, Fabiana, Juliana, e Gabriel por toda ajuda e pelas diversas conversas interessantes e divertidas.

Agradeço ao Dr. Agenor de Castro, por tão gentilmente aceitar compor a banca de avaliação.

Aos meus amigos Bianca, Dinaiane, Alexandre, Érica, Thaís, Roseane, Dina e Lenderson. Muito obrigada por terem me dado tanto suporte nas fases mais difíceis dessa caminhada, por me tirarem as melhores gargalhadas e terem me dado dias e noites memoráveis.

Às minhas amadas amigas Ana Luísa e Mikaella. Obrigada por todos os momentos de risadas, pelo companheirismo durante os momentos de crise entre os corredores da universidade, pelos abraços aconchegantes e pelas rodas de estudos. Foram enviadas como anjos. Minha graduação não teria sido a mesma sem vocês!

Agradeço a todos os professores do Departamento de Farmácia e demais professores da Universidade de Brasília que contribuíram para a minha formação e crescimento pessoal.

Por fim, agradeço à Universidade de Brasília (UnB), ao Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas (LBQP), ao Laboratório de Biologia do Gene (Labiogene), à Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF) pelo suporte logístico e financeiro neste projeto.

RESUMO

O processo de divisão celular é mediado por diversas proteínas que interagem entre si com o objetivo de segregarem igualmente o genoma replicado. Tripanossomatídeos são protozoários flagelados causadores de doenças em humanos que evoluíram geneticamente na linhagem eucariótica, modificando diversas proteínas, ausentando algumas e conservando outras. A coesina é um dos complexos proteicos que regulam o ciclo celular de eucariotos. Ela age do final da fase S do ciclo até a anáfase, promovendo a coesão das cromátides irmãs. Todos os genes que expressam as subunidades proteicas da coesina são conservados em tripanossomatídeos. O objetivo deste estudo foi analisar a interação proteína-proteína entre as subunidades SCC1 e SCC3 de *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas, que atinge entre 7-8 milhões de pessoas no mundo. A metodologia usada foi o sistema duplo-híbrido de leveduras que permite caracterizar interações entre proteínas na forma nativa. Durante o crescimento de leveduras transformadas com os genes para as subunidades TcSCC1 e TcSCC3, foi possível visualizar zigotos em microscópio representando que o acasalamento estava de fato ocorrendo. Após plaqueamento em meio *drop out* SD ágar/-Leu/-Trp/-His/-Ade/canamicina/X- α -Gal foi possível visualizar que apenas o controle positivo cresceu satisfatoriamente. Portanto no presente estudo não foi comprovada interação entre as proteínas TcSCC1 e TcSCC3 através do sistema duplo-híbrido de leveduras.

ABSTRACT

The process of cell division is mediated by several proteins that interact with each other in order to segregate the replicated genome equally. Trypanosomatids are disease-causing flagellated protozoa in humans that have genetically evolved in the eukaryotic strain, modifying several proteins, with the absence of some, and conserving others. Coesin is one of the protein complexes that regulate the eukaryote cell cycle. It acts from the end of the S-phase of the cycle to anaphase, promoting cohesion of sister chromatids. All genes expressing cohesin protein subunits are conserved in trypanosomatids. The aim of this study was to analyze the protein-protein interaction between *Trypanosoma cruzi* subunits SCC1 and SCC3, the etiologic agent of Chagas disease, which affects 7-8 million people worldwide. The methodology used was the double-hybrid yeast system that allows characterizing interactions between proteins in native form. During the growth of yeasts transformed with the genes for the TcSCC1 and TcSCC3 subunits, it was possible to visualize zygotes under a microscope representing that mating was in fact taking place. After plating on SD drop-out medium SD ágar/-Leu/-Trp/-His/-Ade/canamicina/X- α -Gal it was possible to see that only the positive control grew satisfactorily. Therefore in the present study there was no proven interaction between the proteins TcSCC1 and TcSCC3 through the double-hybrid yeast system.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de divisão celular em eucariotos e complexos proteicos envolvidos	17
Figura 2 – Complexo coesina	20
Figura 3 – Inseto vetor que transmite a Doença do Sono, mosca Tsé-Tsé	25
Figura 4 – Ciclo biológico do agente <i>T. brucei</i> , causador da doença do sono	27
Figura 5 – Vetores triatomíneos de <i>Trypanosoma cruzi</i>	28
Figura 6 – Número estimado atual de imigrantes com infecção por <i>T. cruzi</i> em países não endêmicos	28
Figura 7 – Representação do ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	30
Figura 8 – Mapas dos vetores pGADT7 e pGBKT7	35
Figura 9 – <i>Primers</i> usados para clivagem das regiões 3' e 5' do gene SCC3 de <i>T. cruzi</i> .	41
Figura 10 – Análise de PCR a partir do DNA de <i>T. cruzi</i>	41
Figura 11 – Eletroforese para conferência do perfil de restrição dos fragmentos amplificados e clonados no pGEM-T <i>Easy</i>	43
Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose demonstrando produtos de PCR	44
Figura 13 – Eletroforese em gel de agarose demonstrando digestão enzimática para conferência de correta inserção do gene TcSCC1 no vetor pGBKT7 e do gene TcSCC3 no vetor pGADT7	45
Figura 14 – Plaqueamento da cepa Y2HGold da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	46
Figura 15 – Plaqueamento da cepa Y187 da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	46
Figura 16 – Eletroforese em gel de agarose a 1% demonstrando PCR de colônias de leveduras. Cepa Y2HGold transformada para o sistema duplo híbrido	47
Figura 17 – Eletroforese em gel de agarose a 1% demonstrando PCR de colônias de leveduras. Cepa Y187 transformada para o sistema duplo híbrido	47

Figura 18 – Culturas de cepas de leveduras em fase de acasalamento sob um microscópio de contraste de fase (40X), lâminas coradas pelo método Gram, meio mínimo líquido SD/–Leu/–Trp 48

Figura 19. Plaqueamento realizado após o acasalamento das cepas para analisar o resultado de interação 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Genes para as subunidades do complexo coesina identificados no genoma de <i>T. brucei</i>	24
Tabela 2 – <i>Primers</i> usados para amplificação dos genes TcSCC1 e TcSCC3	37
Tabela 3 – Ciclos utilizados para a amplificação do fragmento gênico TcSCC1	37
Tabela 4 – Ciclos utilizados para a amplificação dos fragmentos gênicos de TcSCC3	37
Tabela 5 – Clones das cepas transformadas com os plasmídeos do duplo híbrido	39
Tabela 6 – Descrição das cepas transformadas e os respectivos meios mínimos (SD) utilizados no processo de acasalamento	40
Tabela 7 – Quantificação dos genes TcSCC1 e TcSCC3 eluídos	43
Tabela 8 – Quantificação das construções para posterior transformação em leveduras	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC/C - *anaphase-promoting complex/cyclosome*

CAK - *CDK-activating kinase*

CDC - *centers for disease control and prevention*

CDC6 - *cell division cycle 6*

CDC14 - *cell division cycle 14*

CDC25 - *cell division cycle 25*

CDK1 - *cyclin-dependent kinase 1*

Cdt1 - *chromatin licensing and DNA replication factor 1*

CENP-A - *centromere protein A*

CKI - *CDK-inhibitor kinases*

CRK - *cdc2 related kinase*

DNA - *deoxyribonucleic acid*

E3 - *ubiquitin ligase*

MAPK - *mitogen activated protein kinases*

MCC - *mitotic checkpoint complex*

MCM - *minichromosome maintenance proteins*

MCM10 - *minichromosome maintenance proteins 10*

mRNA - *messenger ribonucleic acid*

ORC - *origin recognition complex*

PCR - *polymerase chain reaction*

PLK - *polo-like kinases*

SBMT - *Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*

SCC - *sister chromatid cohesion*

SMC - *structural maintenance of chromosomes*

WHO - *World Health Organization*

SUMÁRIO

1. Introdução	16
1.1. Proteínas e complexos proteicos	16
1.2. Complexos proteicos envolvidos na divisão celular em eucariotos	16
1.3. Complexos proteicos envolvidos na divisão celular em tripanossomatídeos	21
1.4. Tripanossomatídeos parasitos de humanos	24
1.4.1. <i>Trypanosoma brucei</i> e a Doença do Sono	25
1.4.2. Ciclo de vida do <i>T. brucei</i>	26
1.4.3. <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas	27
1.4.4. Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	29
1.5. Sistema duplo-híbrido de leveduras	31
1.6. Interação entre as proteínas SCC1 e SCC3 em tripanossomatídeos	31
2. Objetivos	32
2.1. Geral	32
2.2. Específicos	32
3. Justificativa	33
4. Metodologia	34
4.1. Organismos utilizados	34
4.1.1. <i>Escherichia coli</i>	34
4.1.2. <i>Trypanosoma cruzi</i>	34
4.1.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
4.2. Plasmídeos	34
4.2.1. Vetor de clonagem para produto de PCR em <i>E. coli</i>	34
4.2.2. Vetores de expressão para produto em leveduras	34
4.2.3. Cultura de células	35
4.3. Meios de crescimento para levedura	36

4.3.1. YPD (Plus Liquid Medium)	36
4.3.2. YPD <i>Plates</i>	36
4.3.3. YPDA (<i>Plus Adenine Liquid Medium</i>)	36
4.3.4. YNB (<i>Yeast Nitrogen Base</i>).....	36
4.4. Clonagem molecular	37
4.5. Sistema duplo-híbrido de leveduras	38
5. Resultados	41
5.1. Amplificação dos genes TcSCC1 e TcSCC3	41
5.2. Clonagem molecular	42
5.3. Sistema duplo-híbrido de leveduras	47
6. Discussão e conclusão	49
7. Resultados	51

1. INTRODUÇÃO

1.1. Proteínas e complexos proteicos

As proteínas são biomacromoléculas formadas por resíduos de alfa-aminoácidos ligados por ligações peptídicas. São encontradas em todos os organismos do planeta Terra e estão envolvidas em todos os processos celulares incluindo metabolismo, transdução de sinais, replicação do DNA, transcrição, tradução, controle do ciclo celular, diferenciação, entre outros (NELSON, *et al.*, 2011).

Para exercer tantas funções é fundamental que as proteínas interajam entre si, muitas vezes formando complexos que podem ser transitórios ou permanentes. A formação de tais complexos possui papel destaque nos processos de divisão celular. A precisão da segregação dos cromossomos na divisão celular depende de uma complexa sequência de processos que garante que cada célula-filha receba o número correto de cromossomos (DÍAZ-MARTÍNEZ, 2009; CLARKE, 2009). Para que isso ocorra, proteínas e complexos proteicos orquestram conjuntamente e de forma sincronizada toda a operação necessária para a correta proliferação celular.

1.2. Complexos proteicos envolvidos na divisão celular em eucariotos

A célula é a unidade básica da vida: um espaço contido que isola reações do ambiente circundante (JONES, *et al.*, 2019). Organismos eucarióticos organizam seu genoma em vários cromossomos fisicamente distintos.

Um desafio fundamental para a sobrevivência de todos os organismos é manter a integridade do genoma em todas as células após a divisão (WESTHORPE, *et al.*, 2015). Assim, os processos associados ao ciclo celular buscam duplicar a imensa quantidade de DNA nos cromossomos e, então, segregar as cópias em duas células-filhas geneticamente idênticas (ALBERTS, *et al.*, 2017). Durante uma única vida humana, quase um quintilhão de

cromossomos se separam de suas irmãs e transitam para seus destinos nas células filhas (HINSHAW, *et al*, 2018).

O ciclo de divisão celular é fortemente regulado pela ativação e inativação de uma série de proteínas que controlam a replicação e segregação do genoma e organelas nas células filhas (LI, 2012) e consiste em quatro fases distintas: G1, S, G2 e M, cada uma das quais deve ser concluída com sucesso antes do início da próxima (Figura 1) (VIALLARD, *et al*, 2001). As fases G1, S e G2 fazem parte da Intérfase que corresponde ao período do ciclo celular em que existe a duplicação do DNA (especificamente na fase S) e no qual a célula monitora o ambiente externo e interno a fim de se assegurar de que as condições para a divisão são adequadas. Já a fase M é chamada de Mitose na qual a segregação dos cromossomos e a divisão celular ocorrem de fato (ALBERTS, *et al*, 2017). A Mitose é subdividida em cinco fases: prófase, em que ocorre a condensação das cromátides irmãs; metáfase, momento em que o centrossomo é ligado ao fuso mitótico; anáfase, em que é promovida a coesão das cromátides; telófase, formação de dois novos núcleos; e, por fim, ocorre a citocinese, divisão do citoplasma da célula.

PRINCIPAIS COMPLEXOS PROTEICOS ATUANTES NO CICLO DE DIVISÃO CELULAR EUKARIÓTICO

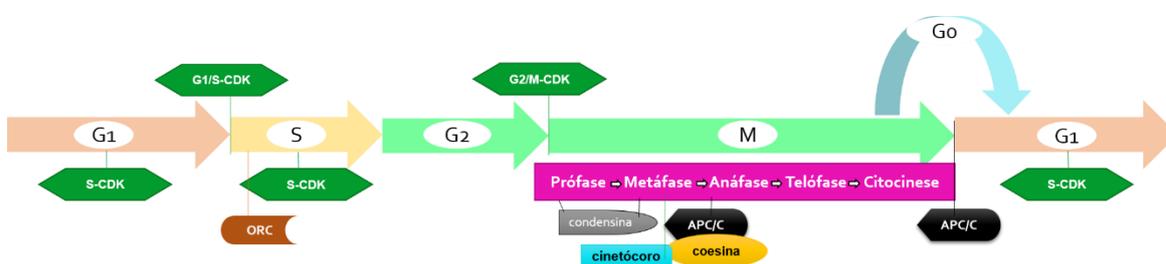


Figura 1. Ciclo de divisão celular em eucariotos e complexos proteicos envolvidos.

Após a mitose as células-filhas entram novamente em fase G1 e podem continuar se dividindo ao seguirem para a fase S ou então entrar em um estágio quiescente chamado fase G0, onde pode permanecer por semanas ou anos antes de retomar a proliferação (ALBERTS, *et al*, 2017).

A progressão das células eucarióticas através das principais transições do ciclo celular é mediada pela ativação de um complexo de proteínas serina-treonina quinases, as quinases dependentes de ciclina (CDKs, do inglês *cyclin-dependent kinases*) (PALMER, *et al*, 2019; VIALARD, *et al*, 2001). A sua ativação é determinada por desfosforilação causada pela quinase Cdc25 (do inglês *cell division cycle 25*) e pela associação de proteínas da classe das ciclinas (PALMER, *et al*, 2019; RISAL, *et al*, 2016). A concentração de CDKs é constante, diferente das ciclinas que oscilam durante o ciclo. Em estágios específicos do ciclo a concentração da ciclina atinge determinado nível o complexo CDK-ciclina é formado. Além disso, há um terceiro fator para a ativação completa do complexo: a fosforilação pela enzima ativadora de CDK (CAK, do inglês *CDK-activating kinase*) (ALBERTS, *et al*, 2017).

Existem quatro classes de ciclinas, cada uma definida pelo estágio do ciclo celular no qual se ligam às CDKs e em que atuam. Todas as células eucarióticas necessitam de três dessas classes: As G1/S-ciclinas ativam CDKs no final de G1 e, com isso, ajudam a desencadear a progressão ao “ponto de restrição”, resultando no comprometimento à entrada no ciclo celular. Seus níveis diminuem na fase S. As S-ciclinas se ligam a CDKs logo após a progressão ao “ponto de restrição” e ajudam a estimular a duplicação dos cromossomos, ao desencadear a ativação da “origem” pela fosforilação específica de proteínas iniciadoras. Os níveis das S-ciclinas permanecem elevados até a mitose, e essas também contribuem para o controle de alguns eventos mitóticos iniciais. As M-ciclinas ativam CDKs que estimulam a entrada na mitose na transição G2/M. Os níveis de M-ciclinas diminuem na metade da mitose. Na maioria das células, uma quarta classe de ciclinas, G1-ciclinas, ajuda a regular as atividades das G1/S-ciclinas (ALBERTS, *et al*, 2017; RISAL, *et al*, 2016; LIM, *et al*, 2013).

A ligação de proteínas inibidoras de CDK (CKIs, do inglês *CDK-inhibitor*) inativam os complexos ciclina-CDK e contribuem para a regulação do ciclo. Outra forma de inibir a

atividade desses complexo é através da fosforilação causada pela quinase *Wee1* (PALMER, *et al*, 2019; ALBERTS, *et al*, 2017; RISAL, *et al*, 2016; VIALARD, *et al*, 2001).

Na fase S, a replicação do DNA é iniciada pela ação do complexo multiproteico ORC (do inglês *origin recognition complex*) ligado às proteína iniciadoras Cdc6 (do inglês *cell division cycle 6*) e Cdt1 (do inglês *chromatin licensing and DNA replication factor 1*) que juntas recrutam o complexo de helicases inativas MCM, um hetero-hexâmero de proteínas de MCM2 a 7, e constituem um grande complexo chamado pré-RC que reconhecem os locais exatos no DNA onde deve iniciar a replicação (chamado de “origens”). Somente as “origens” com pré-RC adequadamente montado podem funcionar como os sítios de iniciação de replicação no DNA (POPOVA, *et al*, 2018). A associação das proteínas Cdc7 com Dbf4 fosforilam o complexo MCM, que será primordial para a formação da forquilha de replicação, colocando a célula em estágio S (PARKER, *et al*, 2017).

A coesina é um complexo de proteínas em forma de anel que envolve as cromátides irmãs após o final da fase S e as mantém unidas até a anáfase, onde se dirigem para pólos opostos da célula. Sua estrutura forma uma anel heterodimérico de duas proteínas SMC (*Structural Maintenance of Chromosomes*), SMC1 e SMC3, que se ligam através de um de seus domínios terminais globulares. Uma proteína chamada SCC1 (*Sister Chromatid Cohesion*) une o outro domínio das proteínas SMC promovendo a estrutura anelar. Há ainda uma outra proteína chamada SCC3 que associa-se à SCC1 (Figura 2) (PETERS; NISHIYAMA, 2012).

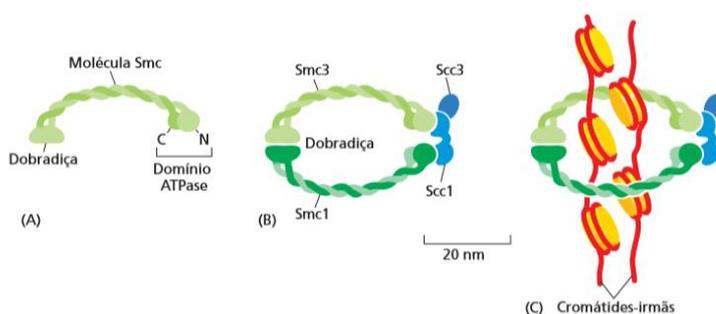


Figura 2. Complexo coesina. (A) Duas subunidades, Smc1 e Smc3 são proteínas super-hélice com um domínio ATPase em uma extremidade; (B) duas subunidades adicionais, Scc1 e Scc3 se conectam à cabeça do domínio

da ATPase, formando uma estrutura em anel que pode circundar as cromátides-irmãs, como mostrado em (C). Retirado de ALBERTS (2017).

No início da mitose, as M-CDKs não atuam sozinhas. Duas famílias adicionais de quinases, as Plk (do inglês *polo-like kinases*) e as quinases Aurora, também dão importantes contribuições ao controle dos eventos mitóticos iniciais. A quinase Plk é necessária à formação normal de um fuso mitótico bipolar e a Aurora A (AURK, do inglês *aurora kinase*), ajuda a controlar proteínas que promovem a formação e a estabilidade do fuso, ao passo que a Aurora B controla a ligação das cromátides-irmãs ao fuso (ALBERTS, *et al*, 2017).

Ainda no início da mitose, um complexo semelhante à coesina, chamado condensina, também com formato anelar, promove a condensação das cromátides irmãs. Ela possui cinco subunidades proteicas, duas SMC (SMC2 e SMC4) e três não SMC, chamados proteínas associadas à condensina (CAP-D2, CAP-G e CAP-H na condensina I; CAP-D3, CAP-G2 e CAP-H2 na condensina II) (PISKADLO, *et al*, 2017; GREEN, *et al*, 2012). Nas células de mamíferos, as condensinas I e II se associam aos cromossomos em diferentes momentos do ciclo celular: condensina II no início da prófase e condensina I após a quebra do envelope nuclear (COLLETTE, *et al*, 2011).

Já a transição de metáfase para anáfase, logo após a progressão G2/M, é regulada pelo complexo protéico APC/C (do inglês *anaphase-promoting complex/cyclosome*), uma grande ubiquitina ligase E3 composta por várias subunidades que medeia a degradação de importantes reguladores do ciclo celular (ALFIERI, *et al*, 2017). O APC/C é ativado pela proteína Cdc20 e adiciona uma proteína de marcação chamada ubiquitina em seus alvos, assim eles são enviados ao proteassoma, rede de proteases que reconhecem a sequência peptídica da ubiquitina e degrada proteínas a ela ligadas (LARA-GONZALEZ, *et al*, 2019). Os principais alvos são ciclinas da fase M que, ao serem degradadas, interrompem a mitose e forçam as células-filhas a entrarem em fase G1.

Um outro alvo do APC/C é a securina, proteína que normalmente é ligada à protease separase, a inibindo. Quando a securina é degradada pelo proteassoma, a separase se torna ativa e cliva a subunidade SCC1 da coesina, permitindo que as cromátides sejam segregadas.

O cinetocoro é composto de múltiplas proteínas unidas e age na metáfase (JOGLEKAR, *et al*, 2017) conectando os cromossomos aos microtúbulos dos eixos mitóticos e meióticos, a fim de distribuir o genoma replicado da célula mãe para suas filhas (MUSACCHIO; DESAI, 2017).

Após a segregação das cromátides irmãs, ocorre por fim, a citocinese. O citoplasma é dividido em dois por um anel contrátil de actina e filamentos de miosina, que comprime a célula em duas partes para criar duas células-filhas, cada uma com um núcleo (ALBERTS, *et al*, 2017).

1.3. Complexos proteicos envolvidos na divisão celular em tripanossomatídeos

Os detalhes do ciclo celular variam de organismo para organismo e em diferentes fases da vida de um organismo. Contudo, todos os eucariotos parecem usar maquinaria e mecanismos similares (ALBERTS, *et al*, 2017).

Os tripanossomatídeos pertencem a um supergrupo eucariótico (SIMPSON, *et al*, 2004; ADL, *et al*, 2005), separados de fungos, animais ou plantas (GLUENZ, *et al*, 2008).

A expressão gênica exhibe algumas características incomuns nos tripanossomatídeos. A maioria de seus genes é transcrita constitutivamente dentro de unidades policistrônicas pela RNA polimerase II, e a expressão é controlada através de eventos pós-traducionais (ALSFORD; HORN, 2004). Também possuem fatores reguladores do ciclo celular que são evolutivamente conservados ou exclusivos de cinetoplastídeos. Seguem o esquema regulatório típico do ciclo celular eucariótico, porém aparentemente, desenvolveram novas vias para controlar seu ciclo, pois carecem de alguns reguladores cruciais que são bem conservados ao longo da evolução, como o Cdc6 e o Cdt1, envolvidos na permissão da

replicação de DNA, o motor de fuso cinesina 5, necessária para a formação do fuso e o anel contrátil da actomiosina, localizado no sulco de clivagem (LI, 2012; HAMMARTON, 2007).

A via da entrada na mitose e a progressão para a metáfase até a chegada à anáfase foi elucidada em leveduras e, embora todas as etapas não tenham sido confirmadas em tripanossomas, foram identificados genes ortólogos de G2/M-CDK, APC/C e homólogos de separase (Tb927.1.3120) e Cdc14 (Tb11.01.4270) nos genomas de tripanossomatídeos (AKIYOSHI; GULL, 2013; BESSAT, *et al.*, 2013; GLUENZ, 2008).

Ortólogos de muitas proteínas quinases conservadas, como as CDKs, MAPKs (do inglês *mitogen activated protein kinases*) e subunidades de complexos como Aurora, PLKs, condensina e coesina estão presentes em *T. brucei* por exemplo, embora suas funções sejam frequentemente divergentes e difiram em diferentes estágios do ciclo de vida. Portanto, a maquinaria mais básica do ciclo celular parece estar conservada nesses eucariotos distantes (AKIYOSHI; GULL, 2013; HAMMARTON, 2007).

O genoma do *T. brucei* codifica um total de 10 ciclinas e 11 CRKs (do inglês *cdc2 related kinase*). CRKs são homólogos dos CDKs em mamíferos. Embora se agrupem filogeneticamente com CDKs, mais da metade contém inserções em seu domínio catalítico da quinase e a maioria possui extensões no terminal N e/ou C, isso sugere que outros mecanismos evoluíram para regular a atividade das CRKs em tripanossomatídeos (HAMMARTON, *et al.*, 2003). A proteína CRK1 parece interagir com quatro ciclinas, CYC2, CYC4, CYC5 e CYC7 (GOURGUECHON, *et al.*, 2007; TAKEDA, *et al.*, 2005), enquanto a CRK2 interage apenas com o CYC2, ambas regulam a fase G1/S. Já a proteína CRK3 interage com CYC2 e CYC6, com a finalidade de regular a fase G2/M (TU, *et al.*, 2004; HAMMARTON, *et al.*, 2003).

Demonstrou-se que os componentes da APC/C são necessários para os últimos estágios da mitose em tripanossomatídeos, e é possível que eles possam fornecer uma ligação entre mitose e citocinese (KUMAR, *et al.*, 2005; HAMMARTON, 2007).

Em mamíferos, como comentado anteriormente, o complexo de reconhecimento de origem ORC (compreendendo subunidades ORC1-ORC6) inicia um processo para promover o desenrolamento do DNA na origem. As sequências do genoma de tripanossomatídeos indicam que essa maquinaria é conservada, mas apenas uma subunidade do ORC está presente; outras proteínas de iniciação de replicação, incluindo MCM10, Cdt1 e Dbf4, também parecem ausentes, sugerindo que o início da replicação de DNA em tripanossomatídeos pode se assemelhar ao de *Archaea* (TAKEDA, 2005), onde frequentemente possuem apenas uma única cópia do OriC (LEONARD; MECHALI, 2013).

Cinetocoros putativos foram visualizados por microscopia eletrônica em *T. brucei* (GULL, *et al*, 1998). Porém há ausência de CENP-A (do inglês, *centromere protein A*) em todos os cinetoplastídeos sequenciados, sugerindo que seus cinetocoros podem ser diferentes de maneira fundamental. CENP-A é uma variante de histona H3 que marca a localização do centrômero no DNA (MATURANO, 2010). É essencial examinar se os cinetocoros de cinetoplastídeos são completamente diferentes ou compartilham alguma semelhança com os cinetocoros de outros eucariotos (AKIYOSHI; GULL, 2013).

Observou-se também que o genoma de *T. brucei* codifica ortólogos putativos das subunidades do complexo condensina SMC2, SMC4 e CAP-D2, necessárias para a condensação da cromatina em outros organismos (GLUENZ, 2008). No entanto, dado que o DNA nuclear não se condensa na mitose em *T. brucei*, o significado disso não é claro (HAMMARTON, 2007).

Há evidências de que os genes ortólogos dos componentes da coesina estão presentes nos tripanossomatídeos e que os mecanismos básicos da coesão de cromátides irmãs são conservados (LANDEIRA, *et al*, 2009; GLUENZ, 2008). Ortólogos aparentes de alguns componentes do complexo de coesina (SMC1, SMC3 e SCC1, SCC3) (tabela 1), bem como a protease separase são codificados pelo genoma de *T. brucei* (HAMMARTON, 2007).

Tabela 1. Genes para as subunidades do complexo coesina identificados no genoma de *T. brucei* através de pesquisas *HMMER* usando alinhamentos de descendentes da *Pfam*. Os números de acesso para os domínios GeneDB (<http://www.genedb.org>) e Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) estão listados. (Adaptado de GLUENZ, *et al.*, 2008).

Complex	Protein	Pfam domains	<i>T. brucei</i>	GeneDB
Cohesin	SMC1	PF02463, PF06470	TbSMC1	Tb09.211.2970
	SMC3	PF02463, PF06470	TbSMC3	Tb927.5.3510
	α -kleisin	PF04824, PF04825	TbSCC1	Tb927.7.6900
	STAG-domain	PF08514	TbSCC3	Tb10.70.0870
	α -kleisin	PF04824, PF04825	-	-
	STAG-domain	PF08514	-	-

1.4. Tripanossomatídeos parasitos de humanos

Mais de 150 espécies de tripanossomatídeos foram descritas, parasitando todas as classes de vertebrados. A subdivisão *Stercoraria* apresenta três subgêneros, e a *Salivaria*, quatro subgêneros. A primeira subdivisão agrupa os tripanossomas com desenvolvimento no intestino posterior de triatomíneos hematófagos, e transmissão através da contaminação dos vertebrados com as fezes do vetor; como exemplo, temos o *T. cruzi*. A segunda subdivisão agrupa os tripanossomas, como o *T. brucei*, com desenvolvimento e transmissão através das porções anteriores do tubo digestivo de dípteros. Os tripanossomas apresentam diferentes estágios morfológicos ao longo de seu ciclo de vida como amastígotas, epimastígotas e tripomastígotas (NEVES, 2005).

Os tripanossomas pertencem à família Trypanosomatida e à Classe Kinetoplastida cujos membros são chamados de cinetoplastídeos. Estes formam um grupo de eucariotos unicelulares flagelados que possuem uma única mitocôndria com um genoma incomumente estruturado, o cinetoplasto, que contém uma rede de moléculas de DNA circulares concatenadas e bem compactadas. (AKIYOSHI; GULL, 2013; GLUENZ, 2008).

Duas espécies de *Trypanosoma* são bastante estudadas pela sua importância médica: *T. cruzi*, causador da doença de Chagas, que ocorre nas Américas, parasito do homem, animais silvestres e domésticos, e *T. brucei*, que ocorre na África, causador da doença do sono em homens (NEVES, 2005; CASANOVA, *et al.*, 2009).

1.4.1. *Trypanosoma brucei* e a Doença do Sono

Reino *Protista*, filo *Euglenozoa*, classe *Kinetoplastidae*, Ordem *Trypanosomatida*, família *Trypanosomatidae*, gênero *Trypanosoma* e espécie *brucei*. É um protozoário hemoflagelado, de formato fusiforme e membrana ondulante. Faz reprodução assexuada por divisão binária e possui entre 16 e 42 µm (FERNANDES, 2016).

Os vetores desta espécie parasita são dípteros hematófagos do gênero *Glossina*, conhecidos popularmente como moscas Tsé-Tsé (Figura 3) (FERNANDES, 2016).



Figura 3. Inseto vetor que transmite a Doença do Sono, mosca Tsé-Tsé. Retirado de <https://sosyalforum.org/tsetse-fly-sleeping-sickness>.

A tripanossomíase africana humana, também conhecida como doença do sono, é causada pelas duas sub espécies que infectam vertebrados: *T. b. gambiense* é o agente etiológico da tripanossomíase gambiana e causa a fase crônica da doença, prevalente na África Ocidental e Central enquanto o *T. b. rhodesiense* é o agente da tripanossomíase rodesiana e causa a fase aguda, observada na África Oriental e Austral (CDC, 2019; PEPIN, 2017).

A doença não é fácil de diagnosticar e ocorre em áreas rurais, remotas e às vezes inseguras, onde os sistemas de saúde são fracos (WHO, 2011). Os sinais clínicos iniciais incluem dor de cabeça intensa, insônia, linfonodos aumentados, anemia e erupção cutânea (WHO, 2012). Após alguns meses, a infecção atinge o sistema nervoso central, resultando em meningoencefalite linfocítica crônica. Sintomas neurológicos, como sonolência diurna e dores de cabeça persistentes, tornam-se evidentes e a perda de peso pode ser profunda (CDC, 2019; PEPIN, 2017).

Entre as espécies de cinetoplastídeos, *T. brucei* é atualmente o organismo mais experimentalmente tratável. Além da sequência do genoma, muitas ferramentas moleculares estão disponíveis para abordagem terapêutica (AKIYOSHI; GULL 2013). Entre os medicamentos usados para tratamento estão os antiparasitários Isionionato de Pentamidina na forma intramuscular (eficaz apenas no estágio inicial da doença), Eflornitina e Nifurtimox (SBMT, 2018). Contudo, nenhuma vacina está atualmente disponível para a infecção por *T. brucei* (PEPIN, 2017?).

1.4.2. Ciclo de vida do *T. brucei*

O ciclo de vida de *T. brucei* é heteroxeno, possuindo o mamífero como hospedeiro definitivo e a mosca do gênero *Glossina sp.* como hospedeiro intermediário (FERNANDES, 2016).

Quando uma mosca tsé-tsé pica um mamífero infectado, as formas tripomastigotas da corrente sanguínea são ingeridas. Na mosca, os tripanossomas movem-se para o lúmen do intestino médio, onde se diferenciam no estágio procíclico. Essas formas deixam o intestino médio e se diferenciam em epimastigotas onde se multiplicam e, em duas ou três semanas, após várias alterações no desenvolvimento, tornam-se tripanossomas metacíclicos maduros (a forma infectiva), que são injetados na pele de um humano ou animal durante uma refeição de sangue. Os parasitos então entram na corrente sanguínea, sistema linfático e líquido cefalorraquidiano, tornando-se tripomastigotas (Figura 4) (FERNANDES, 2016).

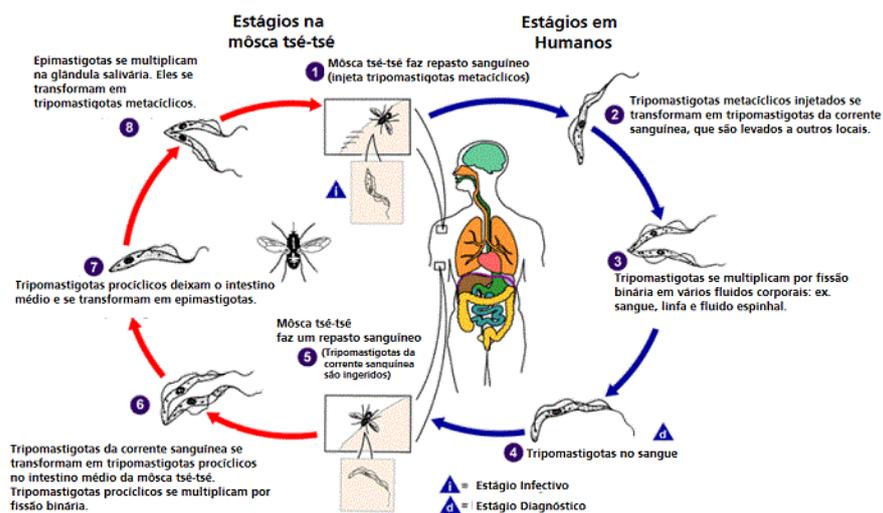


Figura 4. Ciclo biológico do agente *T. brucei*, causador da doença do sono. Retirado de <https://www.microbiologybook.org/Portuguese/para-port-chapter3.htm>.

1.4.3. *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

O *T. cruzi* é um microrganismo eucarioto unicelular do reino *Protista*, filo *Euglenozoa*, classe *Kinetoplastea*, ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, caracterizado pela presença de um flagelo e um cinetoplasto (BRENER, 1992).

É o agente causador da doença de Chagas (tripanossomíase americana ou esquizotripanose), transmitida através de vetores hematófagos da família *Reduviidae*, subfamília *Triatominae* (Figura 5), conhecidos popularmente como “barbeiros” (KROPF, *et al.*, 2009; COUTINHO, *et al.*, 1999; NEVES, 2005). Esses vetores são encontrados em toda a América Latina e até no sul dos EUA, principalmente nas áreas rurais (HEMMIGE, *et al.*, 2012).



Figura 5. Vetores triatomíneos de *Trypanosoma cruzi*. Retirada de <https://vitalrecord.tamhsc.edu/fast-facts-chagas-disease/>.

Desde que descoberta, há cento e nove anos, a doença de Chagas é um problema médico-social. Endêmica em países tropicais, constitui uma das principais causas de morte súbita, com altos efeitos sociais e econômicos entre populações pobres (WHO, 2019; SANTANA, *et al*, 2019; NEVES, 2005). Totaliza um gasto global de US \$ 627,5 milhões por ano em custos com saúde (LIDANI, *et al*, 2019). Na América Latina, a doença de Chagas é prevalente em 21 países e é um dos problemas de saúde pública mais preocupantes do subcontinente. Com a globalização e a migração de indivíduos infectados, no entanto, a doença se espalhou e estima-se que 6-7 milhões de pessoas em todo o mundo estejam infectadas (Figura 6) (WHO, 2019).

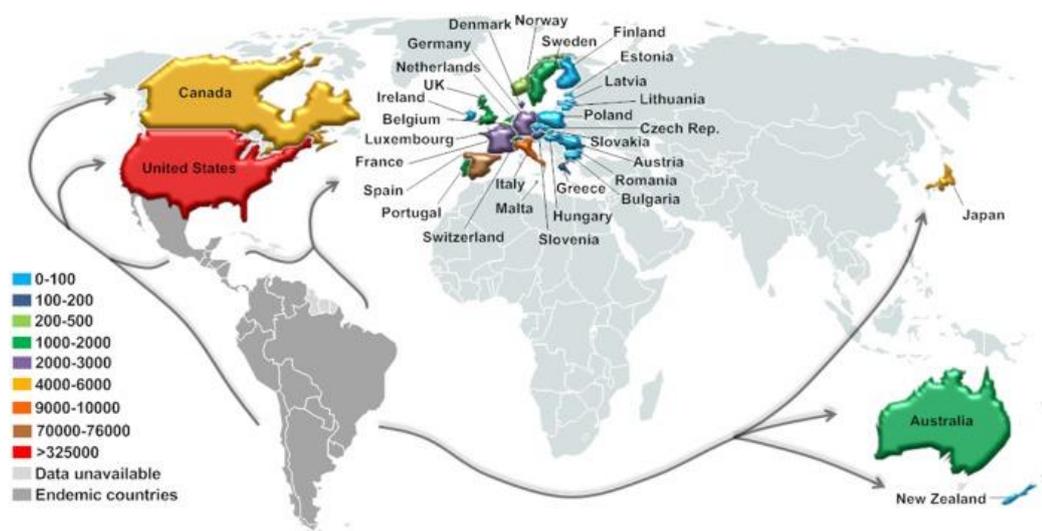


Figura 6. Número estimado atual de imigrantes com infecção por *T. cruzi* em países não endêmicos (LIDANI, *et al*, 2019).

Possui dois estágios clinicamente distintos: a fase aguda, que dura de 4 a 8 semanas após a infecção e a fase crônica, que evolui de forma assintomática para uma fase sintomática crônica em 10 a 30 anos em um terço dos casos. Na maioria das vezes não é diagnosticada, pois os sintomas estão ausentes ou leves e inespecíficos, e quando surgem já caracterizam uma fase avançada (BONNEY, *et al*, 2008; ENGMAN, 2002).

A fase crônica do coração é uma cardiomiopatia associada às infecções crônicas pelo *T. cruzi* e foi considerada por CUBILLOS-GARZON (2004) a doença endêmica mais letal do mundo ocidental. O aumento do coração em pacientes chagásicos é um sinal indicativo de prognóstico ruim. A insuficiência cardíaca congestiva cardiomiopática é uma causa comum de morte nesses pacientes (TEIXEIRA, 2007; BONNEY, *et al.*, 2008; DUTRA, *et al.*, 2008; ENGMAN, 2002).

A doença crônica pode, ainda, se apresentar na chamada forma digestiva da doença de Chagas, que afeta principalmente o esôfago e cólon do hospedeiro humano. Megacólon e megaesôfago são frequentemente encontrados em áreas endêmicas da doença de Chagas e pacientes que mostram essas condições têm anticorpos específicos contra *T. cruzi*. Os principais sintomas são regurgitação do alimento ingerido e constipação (TEIXEIRA, 2007; ENGMAN, 2002).

1.4.4. Ciclo de vida do *T. cruzi*

Durante seu complexo ciclo de vida, o *T. cruzi* é encontrado em três formas parasitárias diferentes. Epimastigotas e amastigotas são os estágios replicativos encontrados no lúmen do intestino dos vetores de insetos triatomíneos ou no citosol das células hospedeiras infectadas, respectivamente. As formas infectantes de *T. cruzi* são tripomastigotas metacíclicas e tripomastigotas de corrente sanguínea, ambas com capacidade de invadir um grande número de diferentes tipos de células (SALASSA, *et al.*, 2019).

Durante uma refeição de sangue de um hospedeiro mamífero infectado, o inseto ingere formas tripomastigotas no sangue, que se diferenciam em formas epimastigotas replicativas no lúmen de seu trato gastrintestinal (TGI). Dentro de 3 a 4 semanas, na porção final do TGI se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos infecciosos e não replicativos e são depositados nas fezes do vetor durante as refeições de sangue subsequentes (HEMMIGE, *et al.*, 2012; COLLIEN, *et al.*, 2000). A transmissão para o novo hospedeiro

ocorre quando as fezes carregadas de parasitas o contaminam por meio de abrasões na mucosa ou na pele (HERRERA, 2014). As tripomastigotas entram na célula hospedeira e se diferenciam em amastigotas intracelulares, que se multiplicam por fissão binária e, finalmente, se diferenciam em tripomastigotas de circulação sanguínea, que são liberadas quando a célula hospedeira se rompe. Esses tripomastigotas infectam células adjacentes ou se disseminam através dos linfáticos e da corrente sanguínea e infectam novas células (Figura 7) (AZAMBUJA; GARCIA, 2017; HEMMIGE, *et al*, 2012; NEVES, 2005).

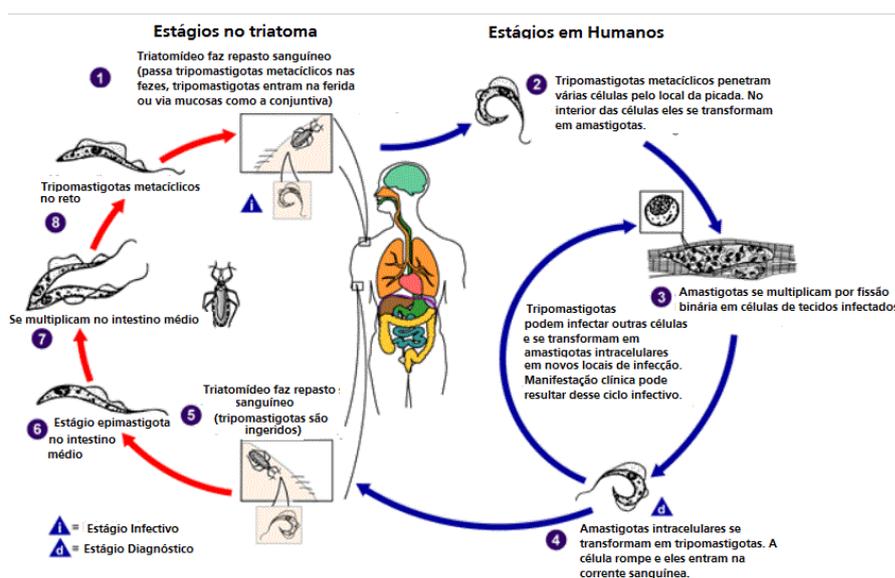


Figura 7. Representação do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Retirada de <<https://www.microbiologybook.org/Portuguese/para-port-chapter3.htm>>.

Outras formas de transmissão consistem em contaminação oral através de alimentos infectados (SANTANA, *et al*, 2019), transfusão sanguínea (GÓMEZ, *et al*, 2019), verticalmente de mãe para filhos (BUEKENS, *et al*, 2018), transplante de órgãos (LA HOZ, *et al*, 2019) e acidente de laboratório (HOFFLIN, *et al*, 1987).

1.5. Sistema duplo-híbrido de leveduras

O sistema duplo-híbrido de levedura (do inglês, *yeast two-hybrid system*) é uma metodologia para identificar e caracterizar interações proteína-proteína que se tornou um

componente integrante de muitas investigações proteômicas. São ferramentas padrão usadas também para realizar análises de estrutura-função. É eficaz com uma fração substancial de proteínas eucarióticas e têm desempenhado um papel importante em análises proteômicas de alto rendimento (SEREBRIISKII, *et al*, 2005).

O fator de transcrição GAL4 de levedura consiste em dois domínios separáveis responsáveis pela ligação do DNA e ativação transcricional, respectivamente (STASI, *et al*, 2015). O genes que expressam as duas proteínas de interesse, denominados “isca” e “presa”, são expressos em fusão com o domínio de ligação ao DNA da proteína GAL-4 (BD, do inglês *binding domain*) e o domínio de ativação da GAL4 (AD, do inglês *activation domain*), respectivamente. Quando as proteínas de fusão da “isca” e da “presa” interagem na levedura, o DNA-BD e a AD são aproximados, restauram o GAL4 funcional, que se liga a uma sequência de ativação a montante (UAS), ativando a transcrição de genes repórteres (LIN; LAI, 2017).

1.6. Interação entre as proteínas SCC1 e SCC3 em tripanossomatídeos

A associação da proteína SCC3 ao complexo Coesina em leveduras depende que esta se ligue à SCC1. A SCC3 se liga diretamente aos resíduos de aminoácido da região C-terminal da SCC1 (FERREIRA, 2011). Os genes para as subunidades SCC1 e SCC3 da coesina foram descritos em tripanossomatídeos, porém ainda não é sabido se ocorre interação entre estas proteínas similarmente como ocorre em leveduras.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Contribuir para um melhor entendimento dos microrganismos cinetoplastídeos da família *Trypanosomatidae*, causadores de doenças endêmicas em países tropicais, com destaque nas interações moleculares de proteínas de *Trypanosoma cruzi* supostamente envolvidas na divisão celular.

2.2 Específicos

- 1) Buscar informações sobre complexos proteicos em tripanossomatídeos causadores de doenças em humanos por meio da literatura.
- 2) Averiguar a atividade do complexo nuclear coesina em *T. cruzi*, potencialmente envolvido na divisão celular, através da análise de interações entre as suas subunidades proteicas TcSCC1 e TcSCC3, por meio de procedimentos de biologia molecular e método de análise de interação proteica, o sistema duplo-híbrido de levedura.

3. JUSTIFICATIVA

Apesar das pesquisas nos últimos anos sobre a estrutura e função do complexo nuclear coesina em humanos e leveduras, pouco se sabe sobre a sua complexidade em tripanossomatídeos, em especial em *T. cruzi*.

As funções da maioria das proteínas específicas dos tripanossomatídeos são desconhecidas, dificultando o entendimento da biologia e patogênese desses parasitos. As interações proteína-proteína são altamente informativas sobre a função da proteína (GAZESTANI, *et al.*, 2016). Ao realizar o ensaio de duplo-híbrido, que analisa interações proteicas, podemos prever a função das proteínas envolvidas no complexo coesina.

A divisão celular é uma importante ferramenta molecular para abordagem terapêutica, tendo em vista que, ao inativar uma significativa molécula do processo, existe a possibilidade de neutralizar o microrganismo causador de doença. Assim, este estudo também contribui como pesquisa de base para futuros alvos terapêuticos da doença de Chagas.

4. METODOLOGIA

4.1. Organismos utilizados

4.1.1 *Escherichia coli*

A linhagem bacteriana utilizada para procedimentos de clonagem foi a DH5 α da empresa *Invitrogen* (genótipo: F ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rK $^-$, mK $^+$) phoA supE44 λ^- thi-1 gyrA96 relA1).

4.1.2 *Trypanosoma cruzi*

Em todos os procedimentos, a cepa de *T. cruzi* utilizada foi a CL brener.

4.1.3. *Saccharomyces cerevisiae*

Foram utilizadas as seguintes cepas de levedura nos procedimentos de duplo-híbrido: Y187 para expressar a proteína “presa” (genótipo: MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1901, leu2-3, 112, gal4 Δ , gal80 Δ , met $^-$, URA3 : : GAL1UAS–Gal1TATA–LacZ, MEL1) e Y2HGold para expressar a proteína “isca” (genótipo MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 Δ , gal80 Δ , LYS2 : : GAL1UAS–Gal1TATA–His3, GAL2UAS–Gal2TATA–Ade2 URA3 : : MEL1UAS–Mel1TATA AUR1-C MEL1).

4.2. Plasmídeos

4.2.1. Vetor de clonagem para produto de PCR em *E. coli*

Foi utilizado o vetor pGEM-T *Easy* com terminações de base timina que permitem a clonagem de produtos de PCR amplificados pela enzima Taq DNA polimerase, que gera terminações de base Adenina nas extremidades 3'. Esse vetor possui duas marcas de seleção, gene de resistência a antibiótico, e o gene que codifica a enzima β -galactosidase, que cliva o substrato X-Gal presente no meio Ágar e resulta num produto de cor azul.

4.2.2. Vetores de expressão em levedura

essenciais, exceto leucina e triptofano, que são omitidos da formulação (ou *dropped out*). As células transformadas com os plasmídeos pGADT7 e pGBKT7 são capazes de crescer, porque os plasmídeos codificam os genes da biossíntese de leucina e triptofano, respectivamente, que são ausentes na célula. O meio *drop out* SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp é usado para selecionar as cepas logo após o *mating* e, além disso, para a ativação dos genes HIS3 e ADE2 responsivos ao fator de transcrição Gal como parte da etapa de confirmação do sistema duplo-híbrido. As colônias que crescem nas placas contendo esse meio de seleção contêm tanto plasmídeos de “isca”, quanto de “presa” e também expressam proteínas que interagem entre si para ativar HIS3 e ADE2. Este meio é usado no final do sistema duplo-híbrido para confirmar as interações (Clontech, 2007).

4.3. Meios para crescimento de leveduras

4.3.1. YPD (*Plus Liquid Medium*)

Extrato de levedura 1% (p/V), peptona 2% (p/V), dextrose 2% (p/V). Todos os ingredientes foram dissolvidos em água e autoclavados a 15 Psi, 121°C por 30 min no ciclo líquido.

4.3.2. YPD *Plates*

Extrato de levedura 1% (p/V), peptona 2% (p/V), dextrose 2% (p/V), ágar 2% (p/V).

4.3.3. YPDA (*Plus Adenine Liquid Medium*)

Extrato de levedura 1% (p/V), peptona 2% (p/V), dextrose 2% (p/V), adenina 0.02% (p/V). Todos os ingredientes foram dissolvidos em água e auto clavados a 15 Psi, 121°C por 30 min no ciclo líquido. Meio nutritivo em forma sólida (ágar) para o crescimento e propagação de culturas de leveduras. Contêm sulfato de adenina usada para inibir a reversão de mutações em *ade1* e *ade2*.

4.3.4. YNB (*Yeast Nitrogen Base*)

YNB sem aminoácido 0,17%, dextrose 2%, sulfato de amônio 0,5%, esterilizado por filtração (membrana de 0,22 µm).

4.4. Clonagem molecular

Inicialmente foi realizada extração de DNA de *T. cruzi* para seleção dos genes TcSCC1 e TcSCC3 através do método fenol/clorofórmio. Para a clonagem, o gene TcSCC3 foi amplificado com *primers* em dois fragmentos para viabilizar a ligação no plasmídeo pGEM-T *Easy* (tabela 2), pois o gene completo possui 3.453pb e é maior que o plasmídeo, com 3.000pb. A primeira região, chamada de 3', com 1.747pb e a segunda região, chamada de 5', com 1.706pb.

Tabela 2. *Primers* usados para amplificação dos genes TcSCC1 e TcSCC3.

TcSCC1	TcSCC3	
Gene completo	Fragmento 3'	Fragmento 5'
PR526 + PR472	PR274 + PR581	PR580 + PR275

Foi realizada então, a técnica de PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*) para a amplificação do fragmento TcSCC1 e as regiões 3' e 5' do gene TcSCC3 nas condições descritas nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Ciclos utilizados para a amplificação do fragmento gênico TcSCC1.

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	94°C	1 min	1x
Desnaturação	94°C	30 s	35x
Anelamento	58°C	30 s	
Extensão	72°C	70 s	
Extensão final	72°C	1 min	1x

Tabela 4. Ciclos utilizados para a amplificação dos fragmentos gênicos de TcSCC3.

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	94°C	1 min	1x
Desnaturação	94°C	30 s	35x
Anelamento	60°C	30 s	
Extensão	72°C	60 s	
Extensão final	72°C	1 min	1x

Na etapa de ligação, o fragmento foi inserido no vetor pGEM-T *Easy* através da enzima de ligação DNA ligase de acordo com o manual técnico da PROMEGA. A seguir, o

vetor contendo o fragmento foi transformado na célula DH5_α por choque térmico, de acordo com CAVETE, *et al*, 2015.

Após a transformação, as células foram plaqueadas em meio LB ágar *overnight*.

A extração do DNA plasmidial foi feita por lise alcalina. A solução I (Tris-HCL 25 mM; EDTA 10 mM; glicose 50 mM) garantiu a ressuspensão das células sem a ocorrência de lise. A solução II (0,2 M NaOH, 1% SDS) promoveu a lise alcalina, uma vez que contém um detergente e hidróxido de sódio, solubilizantes dos lipídeos das membranas celulares. A solução III (acetato de potássio 5M 60mL; ácido acético glacial 11,5 mL; H₂O qsp 100 mL) foi utilizada para neutralização do pH do lisado e, em razão de alta concentração salina, precipitou o DNA cromossomal. A eliminação do RNA foi feita com RNase. A precipitação do DNA foi realizada com adição de álcool. O álcool promoveu a desidratação do DNA, sem água as moléculas de DNA passam a interagir entre si e precipitam. A amostra foi centrifugada para obter a sedimentação do precipitado.

O fragmento gênico foi clivado do vetor através de enzimas de restrição EcoRI/PstI para o gene TcSCC1 e NdeI/Hind III para os fragmentos de TcSCC3 em banho-maria a 37° C por 2 horas.

Posteriormente foram realizadas novas construções, os fragmentos de interesse foram inseridos em vetores apropriados para sistema duplo-híbrido de leveduras, para efetuação da transformação em leveduras, onde ocorre a expressão dos genes para tradução das proteínas TcSCC1 e TcSCC3. No procedimento de transformação foi utilizado o método de eletroporação, no qual 10 µL das construções (200 ng de DNA) em 90 µL de células (1 x 10⁸ cel/mL) foram introduzidas artificialmente em cepas diferentes em cubetas de 0,2 cm. As condições utilizadas na foram as seguintes: voltagem 1,5 kV, 25 µF e 200 Ω.

4.5. Sistema duplo-híbrido de leveduras

O gene TcSCC3 clonado em pGEM-T *Easy* e transformado em *E. coli* foi eluído e inserido no vetor pGADT7, que possui em sua sequência de DNA o gene que codifica o domínio AD da proteína Gal-4, além de possuir as seguintes marcas de seleção: resistência a ampicilina para seleção em *E. coli* e marca de auxotrofia para leucina, seleção em leveduras. Enquanto o gene TcSCC1 foi inserido no vetor pGBKT7, que possui o gene que codifica o domínio BD da Gal-4, além de possuir as seguintes marcas de seleção: resistência a canamicina para seleção em *E. coli* e marca de auxotrofia para triptofano, seleção em leveduras. Assim, o híbrido 1 ou “presa” consiste na proteína SCC3 ligada ao domínio AD, e o híbrido 2 ou “isca” na proteína SCC1 ligada ao domínio BD. A proteína “presa” foi transformada na cepa Y187 e a proteína “isca” na cepa Y2HGold, ambas da espécie *Saccharomyces cerevisiae*.

Após transformação, as células foram crescidas em meio sólido mínimo SD/–Leu para a cepa Y187, e SD/–Trp para a cepa Y2HGold por 3 a 5 dias a 30°C. Os clones das duas cepas transformadas com os plasmídeos foram coletados e colocados para crescerem em meio mínimo para posterior acasalamento, como mostra a tabela 5.

Tabela 5. Clones das cepas transformadas com os plasmídeos do duplo híbrido.

Clones	Meios líquido seletivos para leveduras
Y2HGold [pGBKT7+Lam]	SD/-triptofano
Y2HGold [pGBKT7+53]	SD/-triptofano
Y2HGold [pGBKT7+TcSCC1]	SD/-triptofano
Y187 [pGADT7+TcSCCC3]	SD/-leucina
Y187 [pGADT7+T]	SD/-leucina

Como a proteína p53 e o antígeno T são conhecidos por interagirem em ensaio de duplo-híbrido de levedura (LI; FIELDS, 1993), o acasalamento de Y2HGold [pGBKT7-53] com Y187 [pGADT7+T] resulta em células diploides contendo ambos os plasmídeos que podem ativar os genes repórteres por interação proteica, em vista disso, foi usado como controle positivo. Um controle negativo também foi realizado usando pGBKT7+Lam e pGADT7+T. Leveduras diploides contendo pGBKT7+Lam e pGADT7+T crescerão nos

meios mínimos SD/-Leu e SD/-Trp, mas nenhuma colônia deve crescer no meio usado para realizar o acasalamento (SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal). Logo após o cultivo das cepas haploides contendo os plasmídeos de interesse (tabela 4), foi realizado plaqueamento em 25mL de meio seletivo sólido (YPD ágar/-Leu/-Trp) e incubado por 5 dias a 30°C. Em seguida o acasalamento foi realizado coletando clones de ambas as cepas e os colocando para crescerem juntos em meio líquido YPD. Foi então realizado plaqueamento em 25mL de meio seletivo sólido (YPD ágar/-Leu/-Trp/-His/Ade/canamicina/X- α -Gal) e incubado por 5 dias a 30°C (tabela 6).

Tabela 6. Descrição das cepas transformadas e os respectivos meios mínimos (SD) utilizados no processo de acasalamento.

Clones	Meios sólido seletivos para leveduras
Y2HGold [pGBKT7+Lam] + Y187 [pGADT7+T]	SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal
Y2HGold [pGBKT7+53] + Y187 [pGADT7+T]	SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal
Y2HGold [pGBKT7+TcSCC1] + Y187 [pGADT7+TcSCCC3]	SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal
Y2HGold [pGBKT7+TcSCC1] + Y187 [pGADT7+Empty]	SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal
Y187 [pGADT7+TcSCCC3] + Y2HGold [pGBKT7+Empty]	SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal

5. RESULTADOS

5.1. Amplificação dos genes TcSCC1 e TcSCC3

O gene que transcreve a subunidade TcSCC3 do complexo coesina possui 3.453 pares de bases e após extraído do DNA de *T. cruzi*, foi amplificado por PCR. Os *primers* usados para a amplificação da região 5', com 1.706pb foram PR580 + PR275 e para amplificar a região 3' com 1.747pb foram PR274 + PR581 (Figura 9). O gene TcSCC1 foi amplificado usando os *primers* PR472 e PR561.

Na Figura 10.A, a eletroforese em gel de agarose a 1% demonstra que os fragmentos realmente correspondem aos tamanhos teóricos esperados para o gene TcSCC3. Na Figura 10.B, a eletroforese mostra a amplificação dos fragmentos com os tamanhos esperados para o gene TcSCC1.

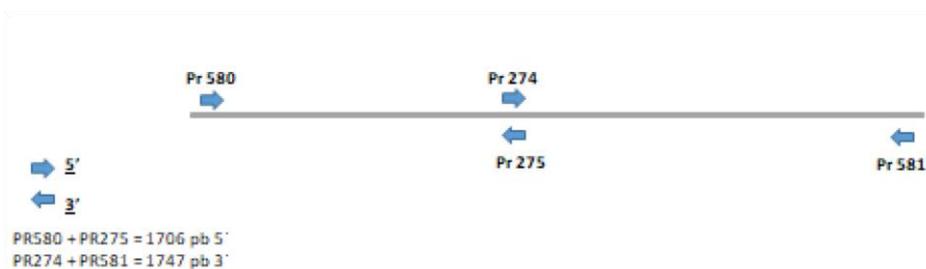


Figura 9. *Primers* usados para clivagem das regiões 3' e 5' do gene SCC3 de *T. cruzi*. Figura ilustrativa.

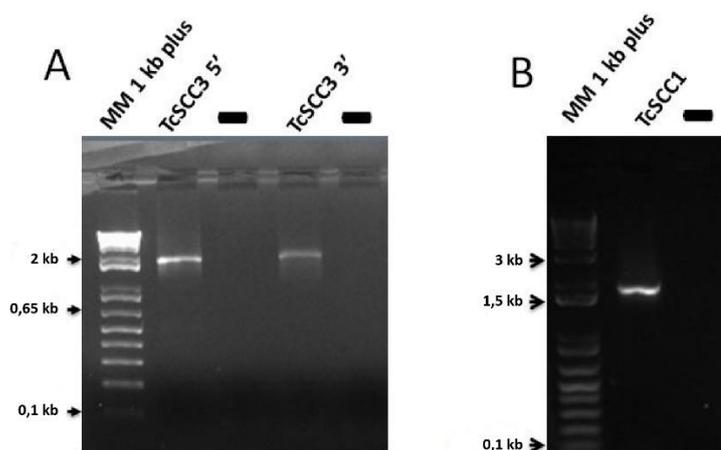


Figura 10. Análise de PCR a partir do DNA de *T. cruzi*. Em A e B: eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo. **A)** Poço 1: Marcador molecular *1 kb plus*. Poço 2: TcSCC3 5' *amplicon* com 1,706 kb. Poço 3: controle negativo - *primers* (PR274 + PR581) mais água. Poço 4: TcSCC3 3' *amplicon* com 1747 pb. Poço 5: Controle negativo - *primers* (PR274 + PR581) mais água. **B)** Poço 1: Marcador molecular *1 kb plus*. Poço 2: TcSCC1 *amplicon* com 1,7 kb. Poço 3: controle negativo - *primers* (PR526 + PR472) mais água.

5.2. Clonagem molecular

Os genes TcSCC1 e TcSCC3 amplificados foram inseridos no vetor pGEM-T *Easy* com a enzima de ligação DNA ligase na proporção de 3 insertos para 1 vetor (o cálculo foi feito de acordo com a equação 1).

Equação 1: Cálculo da relação vetor x inserto.

$$\frac{\text{ng of vector} \times \text{kb size of insert}}{\text{kb size of vector}} \times \text{insert:vector molar ratio} = \text{ng of insert}$$

O plaqueamento resultou em colônias brancas, de nosso interesse e colônias azuis, as quais o gene não foi inserido corretamente porque não interceptou o gene da β galactosidase, sendo assim utilizadas como comparativo. Desta forma, colônias de 2-3nm foram coletadas e foi realizado o procedimento de extração de plasmídeo e consequente digestão dupla com enzimas de restrição, mostrado na Figura 11. No poço 3.A a eletroforese mostra bandas correspondentes ao tamanho do vetor pGEM-T *Easy* (3,0 kb) e dos fragmentos 3' (1,747 kb) e 5' (1,706 kb) do gene TcSCC3, soltos no processo de digestão. No poço 3.B a eletroforese mostra bandas correspondentes ao tamanho do vetor pGEM-T *Easy* (3,0 kb) e o gene TcSCC1 (1,7 kb) excisado no processo de digestão, como esperado. As amostras intactas em ambos os géis demonstram vetor mais fragmento que não sofreram processo de digestão enzimático.

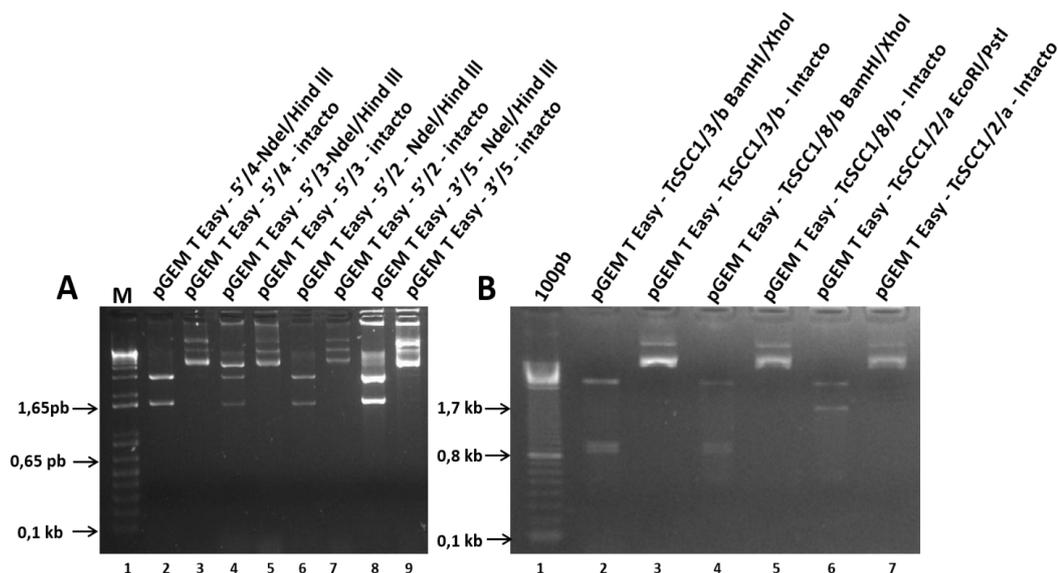


Figura 11: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio para conferir o perfil de restrição dos fragmentos amplificados e clonados no pGEM-T *Easy*. **A) Poço 1:** marcador molecular *1 kb Plus*. **Poços 2, 4, 6, 8:** digestão dupla dos fragmentos 5' com 1,706 kb e 3' com 1,747 kb com enzimas de restrição NdeI/Hind III em diferentes clones. **Poços 3, 5, 7 e 9:** vetor pGEM-T *Easy* mais insertos 5' e 3' de TcSCC3 intacto, usado para controle. **B) Poço 1:** marcador molecular de 100pb. **Poços 2 e 4:** digestão dupla do gene TcSCC1 (1,7 kb) dos clones 3 e 8 com gene alelo "b" que possui sítio para enzimas de restrição BamHI/XhoI. **Poço 6:** digestão dupla do gene TcSCC1 (1,7 kb) do clone 2 com gene alelo "a" que possui sítio para enzimas de restrição EcoRI/PstI. **Poços 3, 5 e 7:** vetor mais inserto intacto usado para controle. Obs: Foi utilizado o alelo "a" de TcSCC1 em todos os posteriores experimentos do presente estudo.

Após a digestão foi realizada eluição das amostras dos genes TcSCC1 e TcSCC3 com o kit GE *Healthcare* e feita a quantificação dos produtos da eluição com *Nanodrop* da *Thermo Scientific* (tabela 7).

Tabela 7: Quantificação dos genes TcSCC1 e TcSCC3 eluídos.

TcSCC1	TcSCC3
16,5 ng/ μ L	14,4 ng/ μ L

A Figura 12 demonstra por eletroforese a confirmação da clonagem dos genes nos vetores para levedura através de PCR. A Figura 12.A mostra o mapeamento teórico do gene TcSCC3 usando os *primers* internos demonstrados na Figura 12.B pelo experimento de PCR. Na 12.C é confirmado que o gene TcSCC1 está inserido no pGBKT7. Adicionalmente foi realizado experimento de digestão enzimática das mesmas amostras apresentadas nas

imagens para confirmar a ligação nos vetores, resultando em fragmentos soltos (resultados não mostrados).

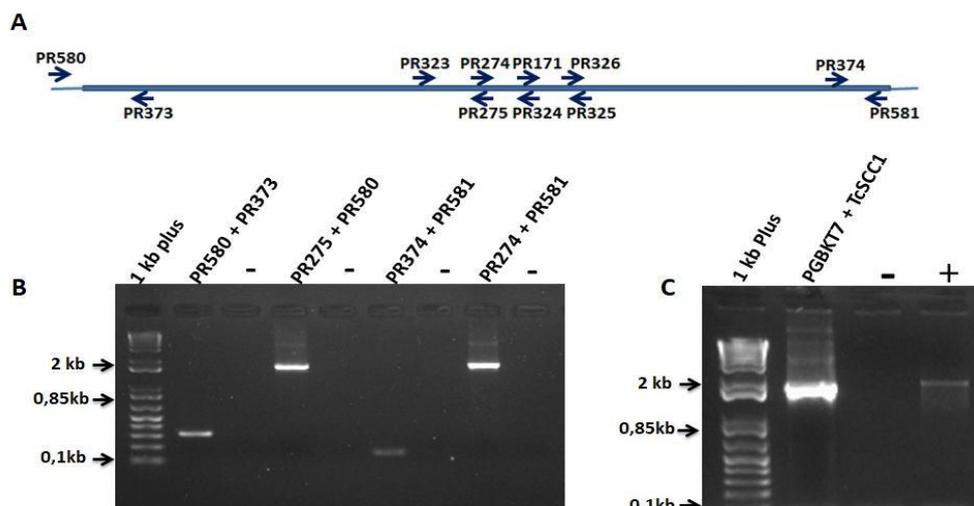


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose a 1% demonstrando produtos de PCR. A) Mapeamento do gene TcSCC3 com *primers* desenhados para amplificar diferentes tamanhos de *amplicons*, PR274 + PR581 = 1747pb, PR580 + PR275 = 1706 pb, PR580 + PR373 = 310 pb e PR374 + PR581 = 155 pb. Os *amplicons* referentes aos *primers* estão mostrado na figura B. C) Marcador molecular *1 kb plus*; pGBKT7 mais TcSCC1, *amplicon* com 1,7 kb; controle negativo (*primers* mais água) e controle positivo (DNA CL brener).

Sucedeu-se a quantificação das construções realizadas e dos controles para a posterior transformação em leveduras (tabela 8), e, em paralelo à quantificação, foi feita uma eletroforese em gel de agarose a uma concentração de 1 %, o qual confirmou as ligações dos genes de interesse em seus respectivos vetores para posterior transformação das cepas Y187 e Y2HGold (Figura 13).

Tabela 8. Quantificação das construções para posterior transformação em leveduras.

CONSTRUÇÕES Cepa Y2HGold	CONSTRUÇÕES Cepa Y187	Designação
[pGBKT7] 261,8 ng/ μ L	[pGADT7] 93,5 ng/ μ L	<i>Empty vector</i>
[pGBKT7+53] 112,3 ng/ μ L	[pGADT7+T] 106,9 ng/ μ L	Controle positivo para interação
[pGBKT7+Lam] 87,6 ng/ μ L	[pGADT7+T] 106,9 ng/ μ L	Controle negativo para interação
[pGBKT7+TcSCC1] 210,5 ng/ μ L	[pGADT7+TcSCC3] 73,7 ng/ μ L	Proteínas de interesse

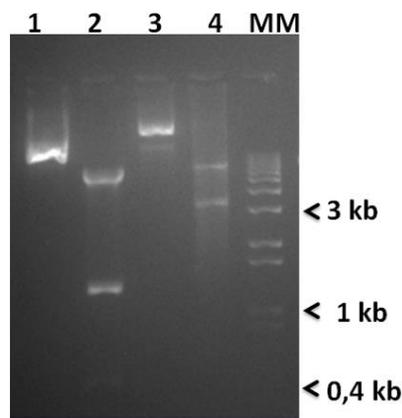


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose a 1% demonstrando digestão enzimática para conferir a correta inserção do gene TcSCC1 no vetor pGBKT7 e do gene TcSCC3 no vetor pGADT7. **Poço 1:** pGBKT7+TcSCC1 intacto. **Poço 2:** pGBKT7+TcSCC1 digerido com enzimas EcorI/BamHI. **Poço 3:** pGADT7+TcSCC3 intacto. **Poço 4:** pGADT7+TcSCC3 digerido com enzimas NdeI/BamHI.

A eletroporação é um método que consiste na aplicação de pulsos elétricos a células para aumentar transitoriamente a permeabilidade da membrana plasmática e foi usada neste estudo para facilitar a entrada da construção plasmídeo + inserto para dentro da células de levedura.

As imagens das culturas da cepa Y2HGold em placas de Petri (Figura 14) mostram que as células-controle eletroporadas com água não cresceram, como esperado, pois sem o vetor, a cepa é incapaz de produzir todos os aminoácidos essenciais para sua sobrevivência, como mostrado na placa SD/-Trp. Na placa Y2HGold pGBKT7+TcSCC1 obtivemos $8,745 \times 10^3$ colônias/ μg , o que mostra uma grande eficiência de acordo com Becker (1991). Na placa que inoculamos a cepa transformada com o pGBKT7+vazio, a quantidade de clones foi de 1×10^4 colônias/ μg , relativamente semelhante à quantidade de transformantes obtidas por Becker (1991), que obtiveram uma quantidade razoável de transformantes por micrograma de DNA ($1 - 5 \times 10^4$ colônias/ μg). Em todas as placas foram aplicadas 100 μL de um sistema final de 1100uL, eletroporadas com 0,2 μg de DNA. Na placa pGBKT7+Lam obtivemos $2,365 \times 10^3$ colônias/ μg e na placa pGBKT7+53 a quantidade de clones foi $2,75 \times 10^2$, relativamente baixa.

A Figura 15 mostra placas de cultura da cepa Y187. Nela vemos que as células-controlado eletroporadas com água não cresceram, como esperado. Na placa Y187 pGADT7+T obtivemos $3,3 \times 10^3$ colônias/ μg . Já na placa pGADT7 vazio alcançamos $1,870 \times 10^4$. Na placa pGADT7+TcSCC3, a quantidade de clones obtidos foi de $1,045 \times 10^4$ colônias por micrograma de DNA, considerada eficiente segundo Becker (1991).

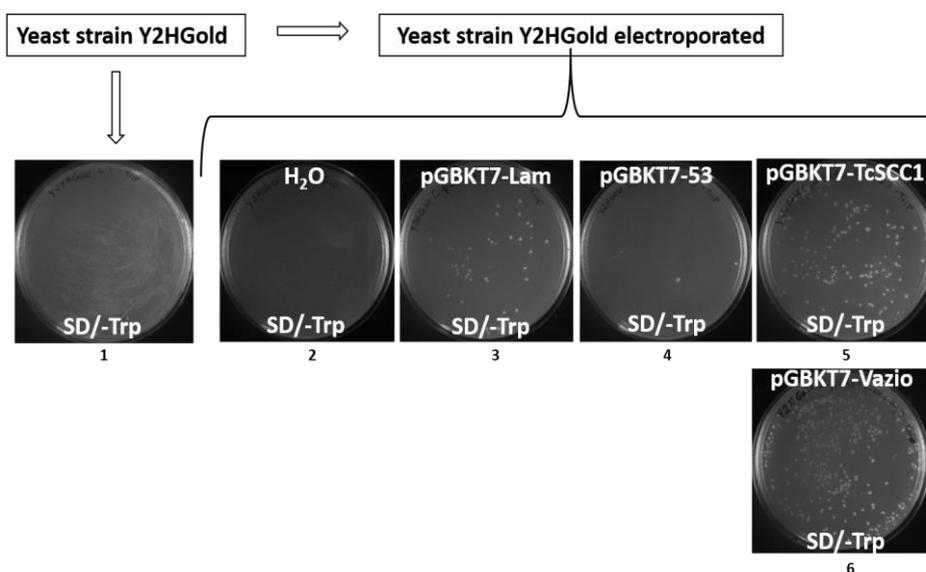


Figura 14. Plaqueamento da cepa Y2HGold da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Placa 1:** Cepa não transformada. **Placa 2:** Cepa eletroporada com água Milli Q, utilizada para controle. **Placa 3:** Cepa transformada com a amostra controle pGBKT7-Lam. **Placa 4:** Cepa transformada com a amostra controle pGBKT7-53. **Placa 5:** Cepa transformada com amostra pGBKT7-TcSCC1. **Placa 6:** Cepa transformada com o vetor vazio.

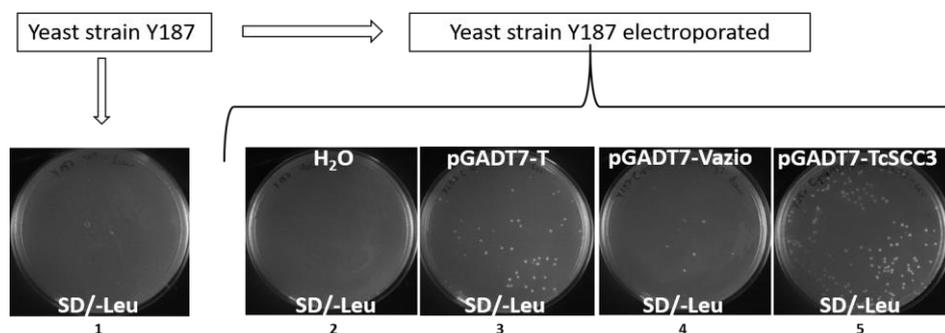


Figura 15. Plaqueamento da cepa Y187 da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Placa 1:** Cepa não transformada. **Placa 2:** Cepa eletroporada com água Milli Q, utilizada para controle. **Placa 3:** Cepa transformada com a amostra controle pGADT7-T. **Placa 4:** Cepa transformada com o vetor vazio. **Placa 5:** Cepa transformada com amostra pGADT7-TcSCC3.

Posteriormente realizou-se técnica de PCR de colônia para comprovar a transformação. Através das figuras 16 e 17 é possível observar que os tamanhos dos *amplicons* confirmam a presença do plasmídeo dentro da célula.

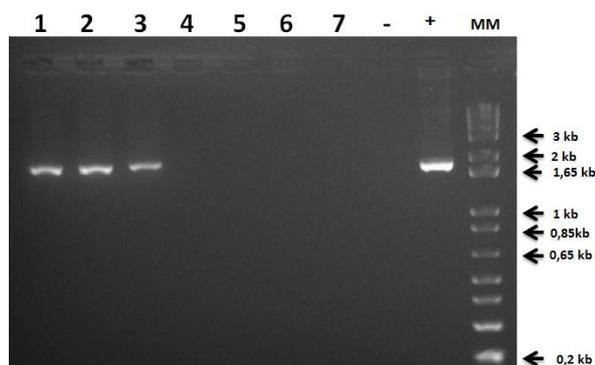


Figura 16. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% demonstrando PCR de colônias de leveduras. Cepa Y2HGold transformada para o sistema duplo híbrido. **Poço 1:** Y2HGold [pGBKT7+TcSCC1.1]. **Poço 2:** Y2HGold [pGBKT7+TcSCC1.2]. **Poço 3:** Y2HGold [pGBKT7+TcSCC1.3]; **Poço 4:** Y2HGold [pGBKT7+p53.2]. **Poço 5:** Y2HGold [pGBKT7+LAM.2]. **Poço 6:** Y2HGold [pGBKT7+Empty.1]. **Poço 7:** Y2HGold + água. **Poço 8:** Água + *primers*. **Poço 10:** plasmídeo purificado. **Poço 11:** 1 kb plus DNA Invitrogen™.

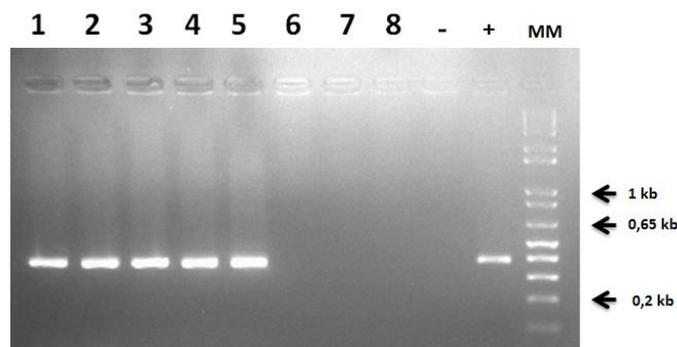


Figura 17. Eletroforese em gel de agarose a 1% demonstrando PCR de colônias de leveduras. Cepa Y187 transformada para o sistema duplo híbrido. **Poço 1:** Y187 [pGADT7+TcSCC3.1]. **Poço 2:** Y187 [pGADT7+TcSCC3.2]. **Poço 3:** Y187 [pGADT7+TcSCC3.3]. **Poço 4:** Y187 [pGADT7+TcSCC3.4]. **Poço 5:** Y187 [pGADT7+TcSCC3.5]. **Poço 6:** Y187 [pGADT7+T.1]. **Poço 7:** Y187 [pGADT7+Empty.1]. **Poço 8:** Y187 + água. **Poço 9:** Água + *primers*. **Poço 10:** plasmídeo purificado. **Poço 11:** 1 kb plus DNA Invitrogen™.

5.3. Sistema duplo-híbrido de leveduras

Para o acasalamento foi usada a quantidade de 0,5mL da cepa isca Y2HGold na concentração de 5×10^7 cel/total e 2,5mL da cepa “presa” Y187 na concentração de $1,25 \times 10^8$ cel/total em meio líquido YPDA. Para analisar a interação entre as subunidades de proteínas foi realizado acasalamento das cepas Y187 e Y2HGold de *S. cerevisiae*. Estas são células haploides que contêm quatro genes repórteres: HIS3, ADE2, MEL1 e AUR1-C, que

6. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Pode-se afirmar que existem diferenças estruturais em proteínas e complexos proteicos entre tripanosomatídeos e os demais eucariotos. Diversas proteínas foram evolutivamente modificadas, enquanto outras foram, por algum motivo, ausentadas. Isso pode ter ocorrido com subunidades proteicas da coesina. Além disso, levando em consideração que tripanossomatídeos não condensam a cromatina como os eucariotos superiores (GALANTI, *et al*, 1998), faz sentido que os mesmos não promovam a coesão da mesma forma, já que a estrutura do DNA permanece sem compactação. Assim, é possível que *T. cruzi* tenha desenvolvido novas vias para promover a coesão das cromátides irmãs durante a divisão celular.

Embora os mapas de co-complexos proteicos forneçam uma ferramenta para a anotação funcional de proteínas, como se espera que subunidades de um complexo estejam envolvidas em processos biológicos semelhantes, o conhecimento atual sobre esses mapas ainda é rudimentar (GAZESTANI, *et al.*, 2016).

Por outro lado, também é possível que, mesmo que as proteínas apresentem um alto nível de conservação, elas possam funcionar diferentemente em diferentes organismos devido a um ambiente diferente ou a outros fatores (AKIYOSHI; GULL, 2013). Por exemplo, uma fosfatase Cdc14 altamente conservada desempenha papéis críticos na regulação de eventos mitóticos tardios em leveduras que brotam, mas não em muitos outros eucariotos (MOCCIARO; SCHIEBEL, 2010).

Em tripanossomatídeos diversas proteínas sofrem modificações pós traducionais (CORDERO, *et al*, 2019), confirmando que, mesmo que haja a transcrição de um determinado gene e sua subsequente tradução, a proteína pode sofrer modificações que a inativam ou ser direcionada para outra função que não a que se supõe.

Além disso, a transcrição de tripanossomatídeos é realizada de forma policistrônica, com diversos genes sendo transcritos em conjunto ao mesmo tempo. Não necessariamente todos esses genes transcritos expressam proteínas funcionais.

É importante ressaltar que o sistema duplo-híbrido é complementar aos métodos bioquímicos, como co-imunoprecipitação/*pulldown* seguida por western *blotting* ou análise por espectrometria de massa para aumentar a precisão e a dinâmica e assim obter um mapa de interações mais completo e confiável (LIN; LAI, 2017). Assim, faz-se necessária a realização de um ou mais desses testes para examinar a validade dos resultados obtidos neste estudo.

Ainda, levando em consideração as limitações do ensaio, é possível que as interações entre as proteínas não consigam ser reproduzidas porque podem ser sensíveis a variações na construção do sistema ocasionando um resultado falso negativo (ITO, *et al*, 2002). Além disso, os plasmídeos utilizados para as construções podem afetar o *foldings* da proteína afetando a interação (ITO, *et al*, 2001). Apesar de não ter ocorrido interação *in vitro*, é possível que ocorra *in vivo*, para tanto é necessária investigação, que pode ser feita através de métodos como detecção de fluorescência em células vivas, Transferência de Energia Fluorescente por Ressonância (FRET) e ainda a Transferência de Energia de Bioluminescência por Ressonância (BRET) (SANTOS, 2009).

Por fim, a investigação de funções e interações proteicas pode ser importante na descoberta de novos alvos terapêuticos para patologias como a doença de Chagas. Ao inibir a função de um complexo tão importante para a replicação do parasito como a coesina, seria possível interromper a divisão celular de formas replicativas amastigotas, que são as formas intracelulares em humanos. Desta forma, seria viável impedir a multiplicação do protozoário e reduzir a carga parasitária, combatendo a doença.

7. REFERÊNCIAS

- ADL, Sina M. *et al.* The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 399-451, 2005.
- Aprovado primeiro tratamento exclusivamente oral para doença do sono. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (SBMT), 2018. Disponível em: <<https://www.sbmt.org.br/portal/first-exclusively-oral-treatment-for-sleeping-sickness-is-approved/>>. Acesso em: 23 de set. de 2019.
- AKIYOSHI, Bungo; GULL, Keith. Evolutionary cell biology of chromosome segregation: insights from trypanosomes. **Open biology**, v. 3, n. 5, p. 130023, 2013.
- ALBERTS, Bruce *et al.* **Fundamentos da biologia celular**. 6 ed. Artmed Editora, v. 1, n. 6, p. 963 - 1021, 2017.
- ALFIERI, Claudio; ZHANG, Suyang; BARFORD, David. Visualizing the complex functions and mechanisms of the anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C). **Open biology**, v. 7, n. 11, p. 170204, 2017.
- ALSFORD, Sam; HORN, David. Trypanosomatid histones. **Molecular microbiology**, v. 53, n. 2, p. 365-372, 2004.
- AZAMBUJA, Patrícia; GARCIA, Eloi. Ciclo evolutivo. Portal de Doenças de Chagas, 2017. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/ciclo-evolutivo/>>. Acesso em: 20 de set. de 2019.
- BECKER, Daniel M.; GUARENTE, Leonard. [12] High-efficiency transformation of yeast by electroporation. **Methods in enzymology**. Academic Press, 1991. p. 182-187.
- BENCHIMOL, Jayme Larry *et al.* Doctor Thomas e a medicina tropical na Amazônia no início do século XX. 2018.
- BERRIMAN, Matthew *et al.* The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 416-422, 2005.
- BESSAT, Mohamed *et al.* A minimal anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C) in *Trypanosoma brucei*. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e59258, 2013.
- BIOLOGY. Centers for disease control and prevention (CDC), 2019. Disponível em <<https://www.cdc.gov/parasites/sleepingsickness/biology.html>>. Acesso em: 08 de out. de 2019.
- BONNEY, K. M.; ENGMAN, D. M. Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many?. **Current molecular medicine**, v. 8, n. 6, p. 510-518, 2008.
- BRENER, Zigman. *Trypanosoma cruzi*: taxonomy, morphology and life cycle. **Chagas' disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine**. ISBT, Sao Paulo, Brazil, p. 13-29, 1992.
- BUEKENS, Pierre *et al.* Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Argentina, Honduras, and Mexico: An observational prospective study. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 98, n. 2, p. 478-485, 2018.
- CALVETE, Crislaine Lambiase; CASEIRO, Marcos Montani; DE SOUZA, Cleide Barbieri. BIOTECNOLOGIA: Transformação bacteriana por método de choque térmico. **UNILUS Ensino e Pesquisa**, v. 12, n. 26, p. 41-53, 2015.
- CASANOVA, Magali *et al.* Microtubule-severing proteins are involved in flagellar length control and mitosis in *Trypanosomatids*. **Molecular microbiology**, v. 71, n. 6, p. 1353-1370, 2009.
- Chagas Disease (American trypanosomiasis). World Health Organization (WHO), 2019. Disponível em: <[https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))>. Acesso em: 03 de nov. de 2019.
- CLONTECH MATCHMAKER™ GAL4 two hybrid system 3 & libraries user manual. 2007. Disponível em: <<http://www.clontech.com/images/pt/PT3247-1.PDF>>. Acessado em: 25 de out. de 2019.
- COLLETTE, Karishma S. *et al.* Different roles for Aurora B in condensin targeting during mitosis and meiosis. **J Cell Sci**, v. 124, n. 21, p. 3684-3694, 2011.
- CORDERO, Esteban M. *et al.* Signal peptide recognition in *Trypanosoma cruzi* GP82 adhesin relies on its localization at protein N-terminus. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 7325, 2019.
- COUTINHO, Marília; DIAS, João Carlos Pinto. A descoberta da doença de Chagas. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 16, n. 2, p. 11-51, 1999.
- DÍAZ-MARTÍNEZ, Laura A.; CLARKE, Duncan J. Chromosome cohesion and the spindle checkpoint. **Cell cycle**, v. 8, n. 17, p. 2733-2740, 2009.
- DUTRA, Walderez O.; GOLLOB, Kenneth J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. **Current opinion in infectious diseases**, v. 21, n. 3, p. 287, 2008.

- ENGMAN, David M.; LEON, Juan S. Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. **Acta tropica**, v. 81, n. 2, p. 123-132, 2002.
- FERNANDES, Anabela. *Trypanosoma brucei*. Knoow, 2016. Disponível em: <<https://knoow.net/ciencterravida/biologia/trypanosoma-brucei/>>. Acesso em: 22 de out. de 2019.
- FERREIRA, Renata Cristina Grangeiro. Caracterização do complexo coesina de *Trypanosoma cruzi*. 2011.
- GAZESTANI, Vahid H. *et al.* A protein complex map of *Trypanosoma brucei*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004533, 2016.
- GLUENZ, Eva *et al.* Functional characterization of cohesin subunit SCC1 in *Trypanosoma brucei* and dissection of mutant phenotypes in two life cycle stages. **Molecular microbiology**, v. 69, n. 3, p. 666-680, 2008.
- GÓMEZ, Lina Andrea; GUTIERREZ, Fredy RS; PEÑUELA, Oscar Andres. *Trypanosoma cruzi* infection in transfusion medicine. **Hematology, transfusion and cell therapy**, 2019.
- GOURGUECHON, Stéphane; SAVICH, Jason M.; WANG, Ching C. The multiple roles of cyclin E1 in controlling cell cycle progression and cellular morphology of *Trypanosoma brucei*. **Journal of molecular biology**, v. 368, n. 4, p. 939-950, 2007.
- GREEN, Lydia C. *et al.* Contrasting roles of condensin I and condensin II in mitotic chromosome formation. **J Cell Sci**, v. 125, n. 6, p. 1591-1604, 2012.
- GREEN, Lydia C. *et al.* Contrasting roles of condensin I and condensin II in mitotic chromosome formation. **J Cell Sci**, v. 125, n. 6, p. 1591-1604, 2012.
- GRUBER, Stephan; HAERING, Christian H.; NASMYTH, Kim. Chromosomal cohesin forms a ring. **Cell**, v. 112, n. 6, p. 765-777, 2003.
- GULL, Keith; ALSFORD, Sam; ERSFELD, Klaus. Segregation of minichromosomes in trypanosomes: implications for mitotic mechanisms. **Trends in microbiology**, v. 6, n. 8, p. 319-323, 1998.
- HAMMARTON, Tansy C. Cell cycle regulation in *Trypanosoma brucei*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 153, n. 1, p. 1-8, 2007.
- HAMMARTON, Tansy C.; ENGSTLER, Markus; MOTTRAM, Jeremy C. The *Trypanosoma brucei* cyclin, CYC2, is required for cell cycle progression through G1 phase and for maintenance of procyclic form cell morphology. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 23, p. 24757-24764, 2004.
- HAMMARTON, Tansy C. *et al.* Stage-specific differences in cell cycle control in *Trypanosoma brucei* revealed by RNA interference of a mitotic cyclin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 25, p. 22877-22886, 2003.
- HEMMIGE, Vagish; TANOWITZ, Herbert; SETHI, Aisha. *Trypanosoma cruzi* infection: a review with emphasis on cutaneous manifestations. **International journal of dermatology**, v. 51, n. 5, p. 501-508, 2012.
- HERRERA, Leidi. *Trypanosoma cruzi*, the causal agent of Chagas disease: boundaries between wild and domestic cycles in Venezuela. **Frontiers in public health**, v. 2, p. 259, 2014.
- HINSHAW, Stephen M.; HARRISON, Stephen C. Kinetochore function from the bottom up. **Trends in Cell Biology**, v. 28, n. 1, p. 22-33, 2018.
- HOFFLIN, Jesse M. *et al.* Laboratory-acquired Chagas disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 3, p. 437-440, 1987.
- Human african trypanosomiasis, control and surveillance. World Health Organization (WHO), [s.d.]. Disponível em: <https://www.who.int/trypanosomiasis_african/surveillance/en/>. Acesso em 08 de out. de 2019.
- Human african trypanosomiasis, the current situation. World Health Organization (WHO), (s.d.). Disponível em: <https://www.who.int/trypanosomiasis_african/country/country_situation/en/>. Acesso em: 28 de out. de 2019.
- International travel and health, trypanosomiasis. World Health Organization (WHO), [s.d.]. Disponível em: <<https://www.who.int/ith/diseases/trypanosomiasis/en/>>. Acesso em 08 de out. de 2019.
- ITO, Takashi *et al.* A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. **PNAS**, v. 98, n. 8, p. 4569-4574, 2001.
- ITO, Takashi *et al.* Roles for the two-hybrid system in exploration of the yeast protein interactome. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 1, n. 8, p. 561-566, 2002.
- JOGLEKAR, Ajit P.; KUKREJA, Alexander A. How kinetochore architecture shapes the mechanisms of its function. **Current Biology**, v. 27, n. 16, p. R816-R824, 2017.
- JONES, Angharad R.; BAND, Leah R.; MURRAY, James AH. Double or Nothing? Cell Division and Cell Size Control. **Trends in Plant Science**, 2019.

- KOLLIEN, Astrid; SCHAUB, Günter. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. **Parasitology today**, v. 16, n. 9, p. 381-387, 2000.
- KROPF, Simone Petraglia; SÁ, Magali Romero. The discovery of *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease (1908-1909): tropical medicine in Brazil. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 16, p. 13-34, 2009.
- KUMAR, Praveen; WANG, C. C. Depletion of APC/C subunit homolog APC1 or CDC27 of *Trypanosoma brucei* arrests the procyclic form in metaphase but the bloodstream form in anaphase. **Journal of Biological Chemistry**, 2005.
- LANDEIRA, David *et al.* Cohesin regulates VSG monoallelic expression in trypanosomes. **The Journal of cell biology**, v. 186, n. 2, p. 243-254, 2009.
- LARA-GONZALEZ, Pablo *et al.* The G2-to-M transition is ensured by a dual mechanism that protects cyclin b from degradation by cdc20-activated APC/C. **Developmental cell**, 2019.
- LA HOZ, Ricardo M.; MORRIS, Michele I. Tissue and blood protozoa including toxoplasmosis, Chagas disease, leishmaniasis, Babesia, Acanthamoeba, Balamuthia, and Naegleria in solid organ transplant recipients - Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. **Clinical transplantation**, p. e13546, 2019.
- LEONARD, Alan C.; MÉCHALI, Marcel. DNA replication origins. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 5, n. 10, p. a010116, 2013.
- LI, Bin; FIELDS, Stanley. Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system. **The FASEB Journal**, v. 7, n. 10, p. 957-963, 1993.
- LI, Ziyin. Regulation of the cell division cycle in *Trypanosoma brucei*. **Eukaryotic cell**, v. 11, n. 10, p. 1180-1190, 2012.
- LIDANI, Kárita *et al.* Chagas disease: from discovery to a worldwide health problem. **Frontiers in public health**, v. 7, 2019.
- LIM, Shuhui; KALDIS, Philipp. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. **Development**, v. 140, p. 3079-3093, 2013.
- LIN, Jer-Sheng; LAI, Erh-Min. Protein-protein interactions: yeast two-hybrid system. In: **Bacterial Protein Secretion Systems**. Humana Press, New York, NY, 2017. p. 177-187.
- MATURANO, Arlei. A proteína dos centrômeros. Biotec AHG, 2010. Disponível em: <<http://biotec-ahg.com.br/index.php/pt/acervo-de-materias/assuntos-diversos/665-a-proteina-dos-centromeros>>. Acesso em: 11 de set. de 2019.
- MOLOO, Ashok. Human african trypanosomiasis, progress on eliminating sleeping sickness as a public health problem. World Health Organization (WHO), 2018. Disponível em: <https://www.who.int/trypanosomiasis_african/news/progress-on-eliminating-hat-as-public-health-problem/en/>. Acesso em: 15 de set. de 2019.
- MOLOO, Ashok. Neglected tropical diseases, who publishes new guidelines for the treatment of sleeping sickness. World Health Organization (WHO), 2019. Disponível em: <https://www.who.int/neglected_diseases/news/WHO-publishes-guidelines-treatment-sleeping-sickness/en/>. Acesso em: 13 de set. de 2019.
- MOLOO, Ashok. World Chagas Disease Day: raising awareness of neglected tropical diseases. World Health Organization (WHO), 2019. Disponível em: <https://www.who.int/neglected_diseases/news/world-Chagas-day-approved/en/>. Acesso em: 20 de out. de 2019.
- MUSACCHIO, Andrea; DESAI, Arshad. A molecular view of kinetochore assembly and function. **Biology**, v. 6, n. 1, p. 5, 2017.
- NEVES, David Pereira *et al.* Parasitologia Humana. 11 ed. Atheneu, São Paulo, p. 85, 2005.
- NELSON, David L.; COX, Michael M. **Lehninger: princípios de bioquímica**. 5 ed. Artmed editora, Porto Alegre. 2011.
- PALMER, Nathan; TALIB, S. Zakiah A.; KALDIS, Philipp. Diverse roles for CDK-associated activity during spermatogenesis. **FEBS letters**, 2019.
- PARKER, Matthew W.; BOTCHAN, Michael R.; BERGER, James M. Mechanisms and regulation of DNA replication initiation in eukaryotes. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, v. 52, n. 2, p. 107-144, 2017.
- PEPIN, Jacques. *Trypanosoma brucei gambiense* and *Trypanosoma brucei rhodesiense* (African Trypanosomiasis). Antimicrob, [s.d]. Disponível em: <<http://www.antimicrobe.org/b54.asp>>. Acesso em: 22 de out. de 2019.
- PETERS, Jan-Michael; NISHIYAMA, Tomoko. Sister chromatid cohesion. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 4, n. 11, p. a011130, 2012.
- PINES, Jonathon. Cubism and the cell cycle: the many faces of the APC/C. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 12, n. 7, p. 427, 2011.

- PISKADLO, Ewa; TAVARES, Alexandra; OLIVEIRA, Raquel A. Metaphase chromosome structure is dynamically maintained by condensin I-directed DNA (de) catenation. **Elife**, v. 6, p. e26120, 2017.
- POPOVA, Varvara V. *et al.* Nonreplicative functions of the origin recognition complex. **Nucleus**, v. 9, n. 1, p. 460-473, 2018.
- RISAL, Sanjiv; ADHIKARI, Deepak; LIU, Kui. Animal models for studying the in vivo functions of cell cycle CDKs. In: **Cyclin-Dependent Kinase (CDK) Inhibitors**. Humana Press, New York, NY, 2016. p. 155-166.
- SALASSA, Betiana Nebaí; ROMANO, Patricia Silvia. Autophagy: a necessary process during the *Trypanosoma cruzi* life-cycle. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 460-469, 2019.
- SANTANA, Rosa Amelia G. *et al.* Oral Transmission of *Trypanosoma cruzi*, Brazilian Amazon. **Emerging infectious diseases**, v. 25, n. 1, p. 132, 2019.
- SANTOS, Debora Regina dos. **Revisão bibliográfica do sistema de duplo-híbrido em leveduras e suas variações e aplicação experimental do sistema de duplo-híbrido clássico**. Trabalho de conclusão de curso (bacharel em Ciências Biológicas) – Departamento de Patologia Básica do setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Paraná, 2009.
- SEREBRIISKII, Ilya G. *et al.* A combined yeast/bacteria two-hybrid system: development and evaluation. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 4, n. 6, p. 819-826, 2005.
- SIMPSON, Alastair GB; ROGER, Andrew J. The real 'kingdoms' of eukaryotes. **Current biology**, v. 14, n. 17, p. R693-R696, 2004.
- STASI, Mariangela; DE LUCA, Maria; BUCCI, Cecilia. Two-hybrid-based systems: Powerful tools for investigation of membrane traffic machineries. **Journal of biotechnology**, v. 202, p. 105-117, 2015.
- TAKEDA, David Y.; DUTTA, Anindya. DNA replication and progression through S phase. **Oncogene**, v. 24, n. 17, p. 2827, 2005.
- TEIXEIRA, Antônio. Doença de Chagas e evolução. **Doença de Chagas e evolução**, 2007.
- TU, Xiaoming; WANG, Ching C. The involvement of two cdc2-related kinases (CRKs) in *Trypanosoma brucei* cell cycle regulation and the distinctive stage-specific phenotypes caused by CRK3 depletion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 19, p. 20519-20528, 2004.
- VIALARD, J. F. *et al.* Molecular mechanisms controlling the cell cycle: fundamental aspects and implications for oncology. **Cancer radiotherapie: journal de la Societe francaise de radiotherapie oncologique**, v. 5, n. 2, p. 109-129, 2001.
- ZEIBIG, Elizabeth. Parasitologia Clínica: Uma abordagem clínico-laboratorial. **Elsevier Brasil**, 2014.
- WESTHORPE, Frederick G.; STRAIGHT, Aaron F. The centromere: epigenetic control of chromosome segregation during mitosis. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 7, n. 1, p. a015818, 2015.