



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIOCIÊNCIAS

ADRIANA CORRÊA DA SILVA

Avaliação do tropismo tissular de *Trypanosoma rangeli* em mamíferos e caracterização das glicoproteínas mucinas-*like* nessa espécie

FLORIANÓPOLIS

2021

Adriana Corrêa da Silva

**Avaliação do tropismo tissular de *Trypanosoma rangeli* em mamíferos e
caracterização das glicoproteínas mucinas-*like* nessa espécie**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia e Biociências
Orientador: Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Patrícia Hermes Stoco

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra

da Silva, Adriana Corrêa
Avaliação do tropismo tissular de *Trypanosoma rangeli* em mamíferos e caracterização das glicoproteínas mucinas-like nessa espécie / Adriana Corrêa da Silva ; orientador, Edmundo Carlos Grisard, coorientadora, Patrícia Hermes Stoco, 2021.
216 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. interação parasita hospedeiro. 3. bioimagem in vivo. 4. glicoproteínas. I. Grisard, Edmundo Carlos. II. Stoco, Patrícia Hermes. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

Adriana Corrêa da Silva

Avaliação do tropismo tissular de *Trypanosoma rangeli* em mamíferos e
caracterização das glicoproteínas mucinas-*like* nessa espécie

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Igor Correia de Almeida
Universidade do Texas em El Paso

Prof. Dr. Wanderson Duarte da Rocha
Universidade Federal do Paraná

Prof. Dr. Rafael Diego Rosa
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi
julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia e Biociências

Prof. Dr. Glauber Wagner
Coordenador do Programa

Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard
Orientador

Florianópolis, 09 de março de 2021.

Este trabalho é dedicado a todos(as) cientistas que se empenham no combate às Doenças Negligenciadas. Seus exemplos de busca verdadeira pela melhoria de saúde do ser humano são minha motivação. Saúde não deve ser privilégio, mas direito de TODA POPULAÇÃO.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Edmundo, que me possibilitou vivenciar o “fazer ciência” no sentido mais sublime do conceito. Obrigada por propiciar o prazer de discutir os resultados, buscar respostas, sugerir hipóteses horas a fio. Sentir “tesão” em fazer pesquisa! Encontrei no Professor um exemplo de liderança e humildade, de organização e zelo, desde o parafuso solto até os resultados finais. Obrigada pela dedicação, pelas reuniões, por indicar caminhos e abrir, não só as portas do laboratório, mas também, de uma área tão linda como Protozoologia. Além do tema de pesquisa que me fascina, encontrei pessoas maravilhosas que me inspiram.

À coorientadora, Prof.^a Patrícia, por proporcionar o equilíbrio no meu doutorado. Quando o Ed foi severo demais, a Pati foi o alento. Quando eu estava meio perdida e indecisa, ela foi pragmática e certa. Obrigada pela disponibilidade e ensinamentos, pelo poder que tem tuas palavras e teu sorriso.

Ao Prof. John Kelly, pelo exemplo de líder de grupo. A sabedoria e simplicidade do John são extraordinárias e acredito que só quem teve a honra de conviver com ele, consegue compreender: Calma, Respeito e o cuidado com cada membro do grupo. Ao Martin Taylor pela genialidade e humor. Obrigado por serem a prova que não precisamos falar, precisamos SER bons cientistas.

À Prof.^a Gislaine, pelo amparo e tenacidade. Serei eternamente grata pela sua empatia e percepção. Esta tese não teria condições de chegar aonde chegou sem a generosidade da Gis. Ela é uma fonte de inspiração e força como mulher cientista.

Poucos professores se dedicam aos estudantes como essas cinco pessoas que citei. Foi uma honra ter convivido com vocês, pelos momentos de descontração e todo whisky que bebemos juntos, pelo laço que foi criado. Pela horizontalidade sem perder a hierarquia e profissionalismo.

Ao Prof. Mário pela sabedoria, críticas e pelos momentos de convívio gastronômico. Ao Prof. Glauber pelo auxílio na PROTO/Bioinfo e que junto com Prof. Rafael Rosa conduziram o PPGBTC no pior momento da pós-graduação no Brasil.

Às companheiras de lab PROTO em pandemia: Bibiana, Laryssa, Amábilli e Vanessa que foram fundamentais na reta final. Tenho um carinho e gratidão imensa pelos dias que dedicaram a me ajudar. Pessoas completamente diferentes uma da outra, mas que só senti carinho e só coisas boas na presença delas.

Aos meus amados IC Bruno e Thaís, agradeço à paciência e compreensão que tiveram com o meu jeito de ser e exigir. Tenho muito orgulho de vocês. À Carime, colega de projeto, qualificação, seminários e sanduíche. À Milene, pelas valiosas “dicas” e a todos(as) que fizeram parte da PROTO e Bioinfo: Prof.^a Patrícia Quaresma, Tati, Caibe, Vivi, Carine, Greicy, Abadio, Nati, Carol, Luiza, Ana e Bea, João, Thomas, Day, Renato, Guilherme, Tati, Erik e Vilmar.

Aos que me receberam na LSHTM e me ensinaram tanto: Fernanda, Paco, Michael e Amanda. Para além do treinamento técnico, sou grata pela demonstração profissionalismo e ótima convivência com vocês. Aos amigos que ganhei em Londres: Shani, Dips e Archie. Obrigada pela imersão cultural, pela inclusão, pelas correções sem julgamento, e pela ironia de estabelecer uma das amizades mais profundas da minha vida com quem está tão longe.

À Prof.^a Marilene Vainstein e Prof. Daniel Mansur por ceder acesso a equipamentos e reagentes. Ao Prof. Álvaro Menin pelas análises histológicas.

Aos estudantes do LIDi (LIm) e LVA, pelo sorriso e piadas no corredor. Aos técnicos LAMEB, pelo suporte diário. Aos colegas da pós-graduação: “Aqui se faz e se luta pela ciência brasileira!”. À APG UFSC pela defesa dos nossos direitos.

Aos que lutaram pelas ações afirmativas. Não tem como desejar aquilo que não se conhece. O acesso à universidade me permitiu conhecer possibilidades que eram inimagináveis para mim, mas hoje são metas e conquistas concretas!

Aos fomentos CAPES, CNPq e FEESC. Ao investimento na ciência nacional!

À minha família, especialmente à minha mãe lolanda, eu peço desculpas. Me distanciei muito mais que os 600 km que nos separaram. Mas agradeço o amor sempre presente. Aos meus sogros, Eliane e Rogério e cunhado Gustavo, muito obrigada pela torcida.

Ao meu companheiro, namorado, as vezes IC e agora marido, Guilherme. Não tenho como expressar meu agradecimento pelo amor e companheirismo. Por ter apoiado, mesmo que contrariado, a minha decisão de fazer doutorado em Florianópolis. Em manter um relacionamento a distância. Obrigada por esse lindo amor que nós temos. “Nem todo mundo tem a sorte de ter um Guilherme, Adriana!”. E de fato! Alguém que compreende a distância, a rotina sem final de semana, mesmo quando viajou para passar o tempo inteiro me vendo fazer experimento e ainda assim, comemora e lamenta os resultados junto. Obrigada pelas *Highlands* e Skye. Alguém assim não se acha fácil. Obrigada por ser maravilhoso!

“Você não pode esperar construir um mundo melhor sem melhorar as pessoas. Para esse fim, cada um de nós deve trabalhar para o seu próprio aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, compartilhar uma responsabilidade geral por toda a humanidade” (Curie, Marie. 1923)

RESUMO

Trypanosoma rangeli é um protozoário transmitido pela picada de triatomíneos à mamíferos. Nenhum sintoma ou alteração fisiopatológica foram descritos em mamíferos infectados pelo parasito, sendo o mesmo considerado não patogênico para esses hospedeiros. Além disso, o ciclo de vida, o tropismo tissular, a replicação ou capacidade de invasão celular desse parasito são desconhecidas. As glicoproteínas mucinas-like, fatores de virulência do patógeno *Trypanosoma cruzi*, foram encontradas no genoma e no proteoma de *T. rangeli*. Todavia, sem a compreensão do seu papel na espécie não patogênica. Dessa forma, este estudo buscou avaliar o curso da infecção e determinar os órgãos preferencialmente infectados por *T. rangeli*, além de estabelecer a influência das mucinas desse parasito na infecção de modelo murino. Para tal, foi implementada a expressão de *dual-reporter* luminescente e fluorescente (Luc::Neon) através de transfecção integrativa no locus 18S de *T. rangeli*. Após a verificação da manutenção dos aspectos biológicos do parasito, foram conduzidos ensaios de bioluminescência *in vivo*, que revelaram que, após 13 dias de infecção em camundongos BALB/c, a quantidade de parasitos diminui a níveis indetectáveis pela técnica de bioluminescência. Durante a fase inicial da infecção, o baço e os pulmões são os órgãos com maior concentração do parasito e em machos há também o acúmulo de parasitos na próstata e tecido adiposo gonadal, sem alterar a carga parasitária total. Através da caracterização das mucinas-like de *T. rangeli* (*TrMUC*), que possui de 93 genes classificados em dois grupos - *TrMUCg* e *TrMUCp* -, foi observada a redução de infectividade e alteração da capacidade de *T. rangeli* modular a resposta pró-inflamatória do hospedeiro, *in vivo* e *in vitro*, devido a superexpressão de *TrMUC*. Diferentemente de *T. cruzi*, as mucinas de *T. rangeli* são pouco ou não são glicosiladas, o que pode afetar sua capacidade como aceptoras de ácido siálico, apesar desse parasita possuir maquinaria de glicosilação funcional. Assim, foi desenvolvido o vetor pTRIXrang: o primeiro plasmídeo integrativo específico para *T. rangeli*, que promove expressão intensa do *dual-reporter* Luc::Neon, permitindo verificar que o baço e pulmão concentram grande quantidade de parasitos e os níveis de citocinas nesses órgãos são alterados na presença do parasito.

Palavras-chave: Interação parasita-hospedeiro; bioimagem *in vivo*; glicoproteínas.

ABSTRACT

Trypanosoma rangeli is a protozoan parasite transmitted by the triatomine bite among several mammalian hosts. Since any symptoms or physiopathological events have been described in mammals, *T. rangeli* is considered non-pathogenic for these hosts. Besides, the parasite life cycle, the tissue tropism, the replication, or cell invasion are unknown in these hosts. The glycoproteins mucins-like are virulence factors in *Trypanosoma cruzi* and were found in the *T. rangeli* genome and proteome. However, uncharted role in the non-pathogenic species. Therefore, this study aims to evaluate the course of infection and unveiled the main organs infected by *T. rangeli*. Also, we establish the influence of *T. rangeli* mucins in a mice infection model. For that, we performed the expression of fluorescent and luminescent dual-reporter (Luc::Neon), through integrative transfection into *T. rangeli* 18S locus. After biological features verification, *in vivo* bioluminescence was conducted, which revealed that after 13 days post-infection, the parasites load decrease below the detection threshold in BALB/c mice. During the early phase of infection, the spleen and lungs are the organs with higher parasite concentration, and in male mice, also prostatic lobe and gonadal adipose tissue hold parasites, without affecting the parasite burden. Through *T. rangeli* mucins (*TrMUC*) characterization, 93 genes were classified into two groups: *TrMUCg* e *TrMUCp*. It was noticed a reduction of infectivity and changes in the *T. rangeli* ability to modulate the host pro-inflammatory response, *in vivo* and *in vitro*, due to *TrMUC* expression. Unlike *T. cruzi*, *TrMUC* are little or non-glycosylated, which affects their ability to act as sialic acid acceptors, despite the functional glycosylation machinery. Therefore, it was developed the pTRIXrang vector: the first *T. rangeli* integrative/specific plasmid to strong expression of the dual-reporter Luc::Neon, which allowed verification that spleen and lungs held a large number of parasites and cytokines level in these organs are altered by *T. rangeli* infection.

Keywords: Parasite-host interaction; *in vivo* bioimaging; glycoproteins

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Penetração de <i>Trypanosoma rangeli</i> no epitélio intestinal de <i>Rhodnius prolixus</i>	25
Figura 2 – Ciclo biológico de <i>Trypanosoma rangeli</i> no hospedeiro invertebrado.	26
Figura 3 – Classificação de parasitos da Ordem Kinetoplastida de acordo com tipo de infecção em seus hospedeiros vertebrados.	26
Figura 4 – Abordagem de fluorescência guiada por bioluminescência.....	32
Figura 5 – Ancoramento de proteínas por GPI.....	35
Figura 6 – Organização de mucinas e trans-sialidases na superfície de <i>Trypanosoma cruzi</i>	43
Figura 7 – Método de bioluminescência <i>in vivo</i> e <i>ex vivo</i>	64
Figura 8 – Mapa do plasmídeo pTRIXrang4 e representação de integração genômica desse cassete no <i>locus</i> rRNA.....	68
Figura 9 – Curva dose-resposta de <i>Trypanosoma rangeli</i> à higromicina.....	70
Figura 10 – Análise de estabilidade da expressão do <i>dual-reporter</i>	71
Figura 11 – O cassete pTRIXrang é integrado no <i>locus</i> 18S.....	74
Figura 12 – Análise da integração do cassete pTRIXrang por <i>Southern Blot</i>	75
Figura 13 – O crescimento de epimastigotas transfectadas com pTRIXrang não é alterado.	77
Figura 14 – A diferenciação <i>in vitro</i> de <i>T. rangeli</i> não é alterada pela transfecção com pTRIXrang ou expressão do <i>dual-reporter</i>	78
Figura 15 – Choachí pTRIXrang infecta glândulas salivares de <i>Rhodnius prolixus</i>	79
Figura 16 – Cinética de parasitemia das linhagens pTRIXrang em camundongo.....	81
Figura 17 – Busca por <i>Trypanosoma rangeli</i> em tecido do hospedeiro mamífero.	83
Figura 18 – Observação de formas amastigotas-like de <i>Trypanosoma rangeli</i> no hospedeiro mamífero.	87
Figura 19 – Dinâmica da infecção e padrão de distribuição de <i>Trypanosoma rangeli in vivo</i>	89

Figura 20 – Pulmões e baço são os maiores focos de infecção por <i>Trypanosoma rangeli</i>	90
Figura 21 – A infecção por <i>Trypanosoma rangeli</i> apresenta um padrão de distribuição distinto conforme o sexo dos animais infectados	92
Figura 22 – Hipóteses relativas ao tropismo <i>Trypanosoma rangeli</i> pelo baço e pulmão de mamíferos.....	95
Figura 23 – Plasmídeo FlagGPI-pROCK-Neo para expressão do gene FlagGPI.....	102
Figura 24 – <i>TrMUCg</i> possui os elementos canônicos e motivo conservado exclusivo de <i>Trypanosoma rangeli</i>	120
Figura 25 – Os membros do grupo <i>TrMUCp</i> são mais variáveis e possuem resíduos hidrofóbicos não característicos de mucinas.	125
Figura 26 – A constituição aminoacídica reforça a correlação entre mucinas de <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Trypanosoma rangeli</i>	129
Figura 27 – Resumo gráfico comparativo entre mucinas de <i>Trypanosoma rangeli</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i>	130
Figura 28 – Análise comparativa da <i>TcTS14</i> com <i>TcTS19</i>	135
Figura 29 – Análise da massa molecular das mucinas expressas de forma fusionadas à FlagGPI.....	137
Figura 30 – Avaliação de população fluorescente dos transfectados com FlagGPI_pROCK.....	139
Figura 31 – Avaliação da manutenção do perfil populacional após enriquecimento por <i>cell sorting</i>	141
Figura 32 – As mucinas fusionadas à FlagTag são expressas na face externa da membrana do parasito.....	143
Figura 33 – Integração do cassete FlagGPI no <i>locus</i> β -tubulina.	145
Figura 34 – A expressão de mucinas fusionadas à FlagGPI não altera do crescimento do parasito em cultura axênica.	146
Figura 35 – Cinética de parasitemia de camundongos BALB/c infectados por Choachí expressando mucinas fusionadas à FlagGPI.....	147
Figura 36 – Esplenomegalia induzida pela infecção por <i>Trypanosoma rangeli</i>	151
Figura 37 – A infecção por <i>Trypanosoma rangeli</i> induz surgimento infiltrado inflamatório leve em diferentes tecidos.	153

Figura 38 – Dosagem de citocinas no baço e no pulmão de camundongos BALB/c infectados por <i>Trypanosoma rangeli</i>	154
Figura 39 - Infecção <i>in vitro</i> por <i>Trypanosoma rangeli</i> em células murinas.	157
Figura 40 – Interação <i>in vitro</i> de Choachí expressando mucinas fusionadas à FlagGPI com fibroblastos murinos.	157
Figura 41 – Interação <i>in vitro</i> de macrófagos murinos com tripomastigotas expressando mucinas heterólogas e superexpressas.....	159
Figura 42 – Purificação de mucinas fusionadas à FlagGPI para avaliação da resposta pró-inflamatória.....	162
Figura 43 – <i>Trypanosoma rangeli</i> reprime a resposta pró-inflamatória de macrófagos ativados, mas TrMUCg3 purificada estimula a secreção de TNF.	164
Figura 44 – Avaliação de metaciclogênese <i>in vivo</i> de <i>Trypanosoma rangeli</i> expressando mucinas fusionadas à FlagGPI.	167
Figura 45 – Avaliação de infectividade oral de <i>Trypanosoma rangeli</i> expressando as mucinas fusionadas à FlagGPI em triatomíneo.....	168
Figura 46 – <i>Trypanosoma rangeli</i> é capaz de incorporar ácido siálico <i>in vitro</i>	171
Figura 47 – Análise de expressão de pTRIXrang durante processo de seleção de <i>T. rangeli</i> transfectado.....	205
Figura 48 – Observação de morfologia lítica em tripomastigotas de <i>T. rangeli</i> durante a infecção em camundongos	212

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação de famílias multigênicas entre <i>Trypanosoma rangeli</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i>	33
Tabela 2 – Iniciadores utilizados para construção do vetor específico de <i>Trypanosoma rangeli</i>	53
Tabela 3 – Iniciadores para PCR convencional utilizados para clonagem de mucinas e trans-sialidases.....	104
Tabela 4 – Anticorpos e diluições utilizados em ensaios de Western Blot.	107
Tabela 5 – Anticorpos e diluições utilizados nos ensaios de imunofluorescência.....	108
Tabela 6 – Iniciadores para amplificação de cDNA de citocinas de camundongo para quantificação por RT-qPCR.....	114
Tabela 7 – Análise de elementos canônicos de mucinas presentes no grupo <i>TrMUCg</i>	119
Tabela 8 – Identificação das sequências clonadas referentes à <i>TcMUCII</i> .	133
Tabela 9 – Comparativo da massa molecular das mucinas fusionadas à FlagGPI.....	137
Tabela 10 – Sequências homólogas à <i>TrMUCg</i> em <i>T. cruzi</i>	207
Tabela 11 – Descrição dos membros e subclassificação do grupo <i>TrMUCp</i>	207
Tabela 12 – Sequências homólogas à <i>TrMUCp</i> em <i>T. cruzi</i>	209
Tabela 13 – Análise leucocitária periférica em camundongos infectados por <i>T. rangeli</i> expressando mucinas fusionadas.....	214
Tabela 14 – Resultados sumarizados da análise de histopatológica de camundongos infectados por <i>Trypanosoma rangeli</i> expressando mucinas fusionadas.....	215

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	aminoácidos
ATCC	do inglês <i>American Type Culture Collection</i>
aTS	trans-sialidases ativas
BLAST	do inglês <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Albumina Bovina Sérica
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CRP	do inglês <i>Complement Regulatory Protein</i>
d.p.i.	dias pós-infecção
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DTT	Ditiotreitol
DTU	do inglês <i>Discrete Typing Units</i>
EdU	5-etinil-20 deoxiuridina
G418	Geneticin
GalNAc	<i>N</i> -acetilgalactosamina
GAPDH	do inglês <i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GlcN	glicosamina
GlcNAc	<i>N</i> -acetilglicosamina
GPI	glicosilfosfatidilinositol
HMW	do inglês <i>High Molecular Weight</i>
HRP	do inglês <i>horseradish peroxidase</i>
HU	hidroxiuréia
Hyg	Higromicina
i.p.	Intraperitoneal
IFN	Interferon
IL	Interleucina
iTS	trans-sialidases inativas
LAMEB	Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia
LAR II	do inglês <i>Luciferase Assay Reagent II</i>
LB	Luria Bertani (Meio de cultivo)
LIT	do inglês <i>Liver Infusion Tryptose Medium</i>
Man	manose
MASP	do inglês <i>Mucin-Associated Surface Protein</i>
MCP	do inglês <i>Monocyte chemoattractant protein</i>
mNG	mNeonGreen
mRNA	Ácido Ribonucléico mensageiro
NCBI	do inglês <i>National Center for Biotechnology Information</i>
nt	nucleotídeos
ORF	do inglês <i>Open Reading Frame</i>
PAGE	do inglês <i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
pb	pares de bases
PBS	do inglês <i>Phosphate Buffer Saline</i>

PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PI-PLC	Fosfatidilinositol fosfolipase C
PVDF	do inglês <i>Polyvinylidene fluoride</i>
RE	Retículo Endoplasmático
ROI	do inglês <i>Regions of interest</i>
s.p.i.	Semanas pós-infecção
SAPA	do inglês <i>Shed Acute Phase Antigen</i>
SB	<i>Southern Blot</i>
SDS	do inglês <i>Sodium Sodecyl Sulfate</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
Sia	Ácido Siálico
TA	temperatura ambiente
TBE	do inglês <i>Tris - Boric acid - EDTA</i>
TcSAP	do inglês <i>Serine-, Alanine-, and Proline-Rich Protein de T. cruzi</i>
TcSMUG	do inglês <i>Small Mucin Gene family de T. cruzi</i>
TcTASV	do inglês <i>Trypomastigote, Alanine, Serine, Valine de T. cruzi</i>
TcTS	trans-sialidase de <i>T. cruzi</i>
TLCK	do inglês <i>Tosyl-L-lysine Chloromethyl ketone hydrochloride</i>
TNF	do inglês <i>Tumor Necrosis Factor</i>
TSSA	do inglês <i>Trypomastigote Small Surface Antigen</i>
UTR	região não traduzida (do inglês <i>untranslated region</i>)
VSG	do inglês <i>Variant Surface Glycoproteins</i>
WB	Western Blot
α Galp	α -galactopiranosil
β Galp	β -galactopiranosil
ω	Sítio ômega

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	<i>Trypanosoma rangeli</i> E SEUS HOSPEDEIROS.....	23
1.2	SEQUENCIAMENTO DO GENOMA DE <i>Trypanosoma rangeli</i>	28
1.3	FERRAMENTAS MOLECULARES NA INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO	30
1.4	GLICOPROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE	32
1.4.1	Trans-sialidases e mucinas-like de <i>Trypanosoma cruzi</i>	36
1.4.2	Sialidases e mucinas-like de <i>Trypanosoma rangeli</i>	45
2	PREFÁCIO	47
	CAPÍTULO I	49
3	OBJETIVOS I	50
4	MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1	CULTIVO DA FORMA EPIMASTIGOTA	51
4.2	EXTRAÇÃO DE DNA	51
4.3	ADAPTAÇÃO DO VETOR pTRIX2-LUC::NEON-HYG	52
4.3.1	Busca de sequências do locus rRNA de <i>Trypanosoma rangeli</i>	52
4.3.2	Desenhos de iniciadores e clonagens <i>in silico</i>	52
4.3.3	Amplificação das sequências gênicas	54
4.3.4	Clonagens	54
4.4	DETERMINAÇÃO DE IC ₅₀ DO ANTIBIÓTICO DE SELEÇÃO.....	55
4.5	TRANSFECCÃO.....	56
4.6	AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO DE LUC::NEON	57
4.6.1	Fluorescência direta	57
4.6.2	Citometria de fluxo	57
4.6.3	Avaliação de atividade de luciferase <i>in vitro</i>	58
4.6.3.1	<i>Ensaio com formas epimastigotas</i>	58
4.6.3.2	<i>Ensaio com formas tripomastigotas sanguíneas</i>	58

4.7	AVALIAÇÃO DE INTEGRAÇÃO GENÔMICA	59
4.7.1	PCR	59
4.7.2	Southern Blot	59
4.8	CURVA DE CRESCIMENTO	60
4.9	INFECÇÃO INTRACELÔMICA	60
4.10	DIFERENCIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>Trypanosoma rangeli</i>	61
4.11	INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGO	62
4.11.1	Observação direta de parasitos no sangue (Método Pizzi-Brener)	62
4.11.2	Bioimagem <i>in vivo</i> e <i>ex vivo</i>	63
4.12	HISTOLOGIA FLUORESCENTE	64
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
5.1	DESENVOLVIMENTO DO VETOR ESPECÍFICO DE <i>Trypanosoma rangeli</i>	66
5.2	APRIMORAMENTO DE EFICIÊNCIA DE TRANSFECCÃO	69
5.2.1	Susceptibilidade de <i>Trypanosoma rangeli</i> à higromicina	69
5.2.2	pTRIXrang: Maior estabilidade e expressão	71
5.3	INTEGRAÇÃO DE pTRIXrang AO GENOMA	74
5.4	CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE <i>Trypanosoma rangeli</i> TRANSFECTADO COM pTRIXrang	76
5.4.1	Avaliação de replicação <i>in vitro</i>	76
5.4.2	Diferenciação <i>in vitro</i>	77
5.4.3	A expressão de Luc::Neon não altera a invasão da glândula salivar em triatomíneos	78
5.5	INFEÇÃO EM MAMÍFEROS	80
5.5.1	Parasitos pTRIXrang exibem o mesmo padrão de infecção que as cepas parentais	80
5.6	APLICAÇÃO DE pTRIXrang NA BUSCA DE <i>Trypanosoma rangeli</i> EM MAMÍFERO	83

5.7	AVALIAÇÃO DE INFECÇÃO POR <i>Trypanosoma rangeli</i> ATRAVÉS DE BIOLUMINESCÊNCIA.....	88
5.7.1	<i>Trypanosoma rangeli</i> apresenta padrão de distribuição difuso até a diminuição da carga parasitária.....	88
5.7.2	Determinação do tropismo tissular de <i>Trypanosoma rangeli</i>	90
6	RESUMO DOS RESULTADOS – CAPÍTULO I	97
	CAPÍTULO II.....	98
7	OBJETIVOS II	99
8	MATERIAIS E MÉTODOS	100
8.1	CARACTERIZAÇÃO <i>IN SILICO</i> DE MUCINAS DE <i>Trypanosoma rangeli</i> .	100
8.2	GERAÇÃO DE PARASITOS GENETICAMENTE MODIFICADOS	101
8.2.1	Desenvolvimento do vetor FlagGPI	101
8.2.2	Planejamento e execução das clonagens	103
8.3	TRANSFEÇÃO.....	105
8.4	ANÁLISE DE EXPRESSÃO DAS MUCINAS FUSIONADAS À FlagGPI	105
8.4.1	Western Blot	105
8.4.2	Imunofluorescência indireta	107
8.5	CELL SORTING	108
8.6	PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE.....	109
8.7	ENSAIO DE ATIVIDADE DE TRANS-SIALIDASE.....	110
8.8	ENSAIOS DE INFECÇÃO <i>IN VITRO</i>	110
8.8.1	Cultivo de linhagens murinas.....	110
8.8.2	Considerações do desenho experimental <i>in vitro</i>	111
8.8.3	Cinética de interação com células de mamífero	111
8.8.4	Avaliação de incorporação de ácido siálico	112
8.8.5	Dosagem de citocinas do sobrenadante	112
8.8.5.1	<i>Cytometric Bead Array - CBA</i>	112
8.8.5.2	<i>Extração de RNA e preparo de cDNA para RT-qPCR</i>	113

8.9	INFECÇÃO EM HOSPEDEIRO MAMÍFERO.....	115
8.9.1	Cinética de infecção	115
8.9.2	Contagem diferencial de leucócitos	115
8.9.3	Histopatologia.....	115
8.9.4	Dosagem de citocinas de plasma e extrato tecidual de camundongos infectados com <i>Trypanosoma rangeli</i>.....	116
8.10	INFECÇÃO EM HOSPEDEIRO TRIATOMÍNEO	117
8.10.1	Inoculação via intracelômica.....	117
8.10.2	Alimentação artificial.....	117
9	RESULTADOS E DISCUSSÃO	119
9.1	ANÁLISE DESCRITIVA E COMPARATIVA <i>IN SILICO</i> DE MUCINAS DE <i>Trypanosoma rangeli</i>	119
9.1.1	Avaliação do grupo <i>TrMUCg</i>	119
9.1.2	Análise do grupo <i>TrMUCp</i>	123
9.1.3	Comparação entre mucinas de <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Trypanosoma rangeli</i>	129
9.2	CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE <i>Trypanosoma rangeli</i> SUPEREXPRESSANDO <i>TrMUCg1</i> , <i>TrMUCg3</i> , <i>TrMUCp35</i> , <i>TcMUCI</i> E <i>TcMUCII</i> ..	131
9.2.1	Abordagem de clonagem com <i>FlagGPI_pROCK</i>	131
9.2.2	Clonagem dos genes <i>TcMUCI</i> e <i>TcMUCII</i> e expressão heteróloga por <i>Trypanosoma rangeli</i>.....	132
9.2.3	Clonagem dos genes <i>TrMUCg1</i>, <i>TrMUCg3</i> e <i>TrMUCp35</i> no vetor <i>FlagGPI_pROCK</i>.....	133
9.2.4	Clonagem do gene da <i>TcTS</i> ativa.....	134
9.3	ANÁLISE DE EXPRESSÃO DOS GENES CLONADOS	136
9.3.1	Massa molecular de <i>TrMUCg3</i> e <i>TrMUCp35</i> indica baixa ou ausência de glicosilação das mucinas de <i>Trypanosoma rangeli</i>.....	136
9.3.2	Enriquecimento da população transfectada para expressão de mucinas fusionadas à <i>FlagGPI</i>.....	139

9.3.3	Citolocalização das mucinas heterólogas e superexpressas	142
9.4	ANÁLISE DE INTEGRAÇÃO AO GENOMA.....	144
9.5	ANÁLISE DA TAXA DE REPLICAÇÃO DE EPIMASTIGOTAS EM CULTURA	145
9.6	INFECÇÃO EM MAMÍFERO	146
9.6.1	Expressão de <i>TcMUCII</i> promove aumento de parasitemia, enquanto <i>TrMUC</i> diminui a infectividade da cepa Choachí em mamíferos	146
9.6.2	Resposta do hospedeiro à infecção por <i>Trypanosoma rangeli</i> expressando mucinas fusionadas à FlagGPI.	150
9.6.3	<i>Trypanosoma rangeli</i> modula negativamente a produção de INF γ no baço	153
9.7	INFECÇÃO <i>IN VITRO</i>	156
9.7.1	A expressão das mucinas fusionadas não altera o padrão de infecção do <i>Trypanosoma rangeli</i> para células não fagocíticas	156
9.7.2	A expressão de mucinas heterólogas ou superexpressão de mucinas não alteram a interação dos parasitos com macrófagos.....	159
9.7.3	Modulação da secreção de citocinas pró-inflamatórias por <i>Trypanosoma rangeli</i> e mucinas fusionadas à FlagGPI purificadas.....	162
9.8	INFECÇÃO EM TRIATOMÍNEOS.....	166
9.8.1	Infecção por via intracelômica	166
9.8.2	Alimentação artificial.....	168
9.9	RECONHECIMENTO DE ÁCIDO SIÁLICO POR <i>Trypanosoma rangeli</i>	170
10	RESUMO DE RESULTADOS CAPÍTULO II	173
11	CONCLUSÕES	175
12	PERSPECTIVAS	176
13	CONSIDERAÇÕES FINAIS	177
	REFERÊNCIAS.....	179
	APÊNDICE A	205
	APÊNDICE B	207
	APÊNDICE C	212

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Trypanosoma rangeli* E SEUS HOSPEDEIROS

O *Trypanosoma rangeli* é um parasito hemoflagelado e heteroxênico, que alterna seu ciclo de vida entre hospedeiros mamíferos e insetos da Família Reduviidae (Subfamília Triatominae) (CUBA CUBA, 1998). Esse parasito pertence à Ordem Kinetoplastida, que tem como principal característica a presença de uma mitocôndria única, que possui uma região rica em ácido desoxirribonucleico (DNA) circular, chamada cinetoplasto. A posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e ao flagelo varia, sinalizando distintas formas do parasito, que podem ser associadas a diferentes hospedeiros e formas de replicação (CAVALCANTI; DE SOUZA, 2018; FIELD; CARRINGTON, 2009; VARGAS-PARADA, 2010). Pertencem ainda à essa ordem taxonômica os agentes etiológicos da doença de Chagas (Tripanossomíase Americana) e da Doença do Sono (Tripanossomíase Africana), o *Trypanosoma cruzi* e o *Trypanosoma brucei*, respectivamente, além das diversas espécies do gênero *Leishmania* associadas a diversas manifestações clínicas. Essas doenças são de grande importância médica e social, uma vez que mais de um bilhão de pessoas estão sob risco de infecção e são registradas cerca de 30 mil mortes por ano (LEE *et al.*, 2013; LIDANI *et al.*, 2019; RAO *et al.*, 2019). No setor agropecuário, os patógenos *Trypanosoma vivax* e *Trypanosoma evansi*, agentes da tripanossomíase bovina e Mal das cadeiras em equinos, respectivamente, causam impactos econômicos significativos (AREGAWI *et al.*, 2019; BIRHANU *et al.*, 2015). Não só mamíferos podem ser parasitados por tripanosomatídeos, mas também aves, anfíbios, répteis, peixes e até mesmo plantas, o que evidencia a grande variedade e adaptabilidade dos tripanosomatídeos, ao mesmo tempo em que possuem diversas características em comum (DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010; GULL, 2001; SKALICKÝ *et al.*, 2017).

O *T. rangeli* e *T. cruzi* são endêmicos das Américas do Sul e Central, coincidindo com a dispersão geográfica de seus vetores (AZAMBUJA *et al.*, 2017; FLORES-FERRER *et al.*, 2018; GOURBIERE *et al.*, 2012; GRISARD *et al.*, 1999; MACHADO *et al.*, 2001; MAIA DA SILVA *et al.*, 2004). Essas espécies compartilham um grande número de reservatórios, que incluem mamíferos das Ordens Edentata, Marsupialia, Carnivora, Rodentia e Primata, assim como uma gama de vetores como *Rhodnius prolixus*, *Rhodnius domesticus* e *Triatoma dimidiata*, dentre outros. O que

torna comum a ocorrência de infecções mistas *T. cruzi* / *T. rangeli*, tanto em mamíferos quanto nos triatomíneos (BARRETO-SANTANA *et al.*, 2015; DE NOYA; GONZÁLEZ; GONZALEZ, 2015; MACHADO *et al.*, 2001; VALLEJO *et al.*, 2003, 2007; VALLEJO; GUHL; SCHAUB, 2009). Devido a tais similaridades biológicas e ao elevado número de proteínas de superfície compartilhadas entre *T. cruzi* e *T. rangeli*, há grande ocorrência de reações cruzadas em testes sorológicos, o que pode acarretar o incorreto diagnóstico da Doença de Chagas (BASSO; MARINI, 2015; CUBA CUBA, 1998; DE MORAES *et al.*, 2008; GRISARD *et al.*, 1999, 2010; WAGNER *et al.*, 2013).

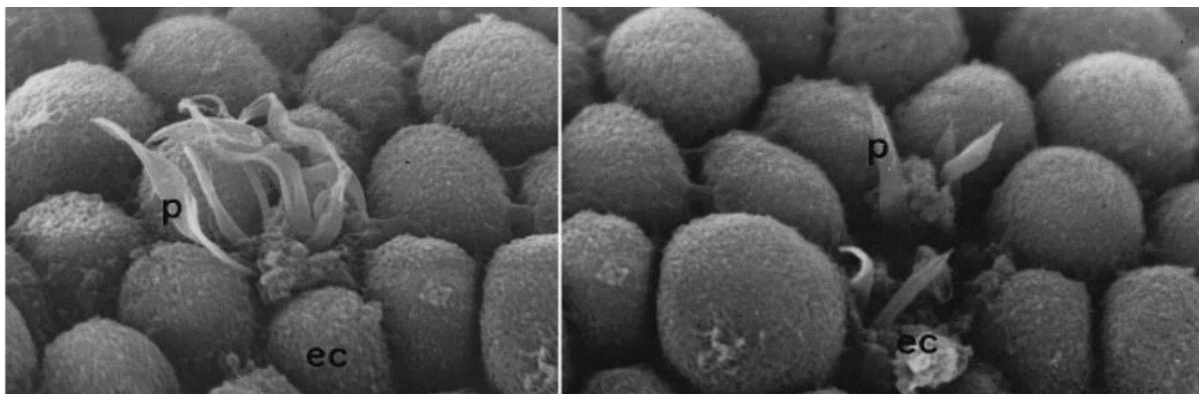
T. cruzi e *T. rangeli* possuem comportamentos biológicos surpreendentemente distintos. Para ambas as espécies, a infecção dos insetos vetores ocorre pela ingestão de formas tripomastigotas durante o repasto sanguíneo em hospedeiros mamíferos infectados. No lúmen intestinal do triatomíneo, o *T. rangeli* se diferencia em formas epimastigotas, que podem atravessar o epitélio intestinal alcançando a hemolinfa (Figura 1) (DE OLIVEIRA; DE SOUZA, 2001). Uma vez na hemocele, o *T. rangeli* se multiplica e migra para as glândulas salivares onde, após penetrá-las, diferencia-se em tripomastigotas metacíclicos – a forma infectante para os hospedeiros mamíferos (Figura 2)

Assim, durante a picada do inseto, os parasitos são inoculados junto com a saliva diretamente na corrente sanguínea. Essa forma de transmissão é denominada de anterior ou inoculativa (GUARNERI; ATELLA; PRETO, 2012; MELLO *et al.*, 1995)

Diversas particularidades da interação parasito-vetor já foram elucidadas, como a capacidade patogênica de *T. rangeli* para diversos triatomíneos, em especial do gênero *Rhodnius* (BARRETO-SANTANA *et al.*, 2015). A infecção de *T. rangeli* em triatomíneos pode persistir durante toda a vida do inseto, como também causar a morte devido a perturbação do processo de ecdise e alterações de reprodução, como problemas de fertilidade e ovoposição (FELLET *et al.*, 2014; PETERSON; GRAHAM, 2016). Esse parasito interfere na microbiota dos triatomíneos, tendo influência no retardo do desenvolvimento ninfal e aumento nos distúrbios na digestão e excreção (VALLEJO; GUHL; SCHAUB, 2009; VIEIRA *et al.*, 2015). De forma distinta, o *T. cruzi*, que não possui a capacidade de atingir a hemocele, mantém-se na luz intestinal do vetor até alcançar a ampola retal onde se diferencia em tripomastigotas metacíclicos, e é liberado com as fezes. Essa forma de infecção é chamada posterior ou contaminativa (EGER-MANGRICH *et al.*, 2001; GRISARD *et al.*, 1999; GUEVARA *et al.*, 2005; STOCO *et al.*, 2014b, 2017; VALLEJO; GUHL; SCHAUB, 2009).

Figura 1 – Penetração de *Trypanosoma rangeli* no epitélio intestinal de *Rhodnius prolixus*.

Eletromicrografia de varredura demonstrando a penetração da cepa Choachí de *T. rangeli* (p) nas células epiteliais (ec) do intestino posterior de *R. prolixus* experimentalmente infectado. À esquerda etapas iniciais do processo de invasão celular (Aumento: 7000x). À direita, finalização do processo de penetração (Aumento: 9500x).

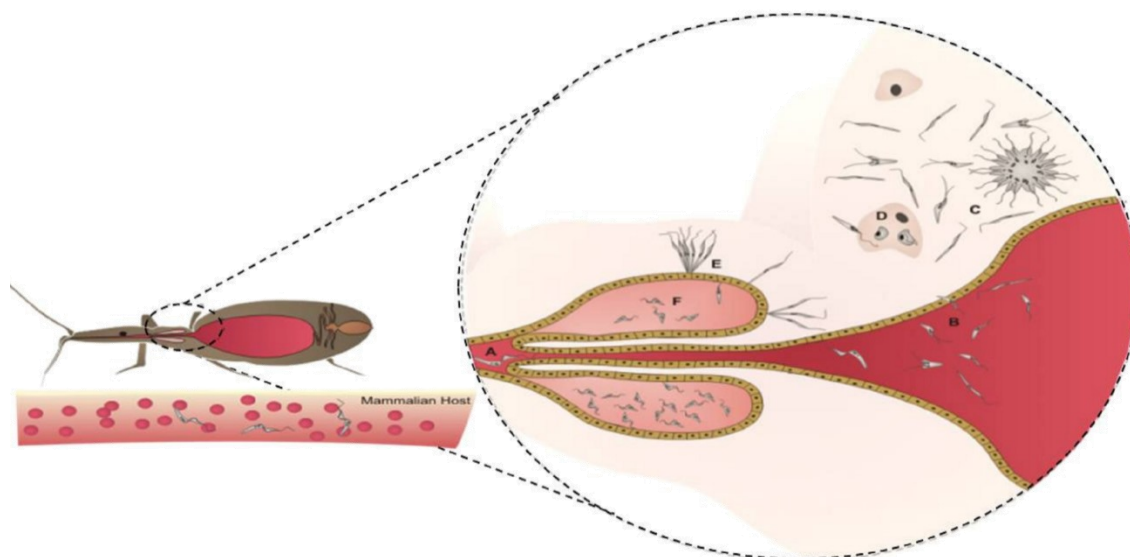


Fonte: De Oliveira e De Souza (2001).

Devido às diferenças na forma de transmissão dos parasitos por seus vetores, as espécies do gênero *Trypanosoma* podem ser divididas em duas seções: Stercoraria e Salivaria. Na seção Stercoraria estão incluídas as espécies em que as formas tripomastigotas se desenvolvem exclusivamente no intestino do triatomíneo, sendo dispersas juntamente com as fezes do inseto. Como ocorre com *T. cruzi* e o *Trypanosoma carassii* (patógeno de peixes). Na seção Salivaria estão inclusos os tripanosomas africanos (*T. brucei*, *T. vivax* e o *Trypanosoma congolense*), para os quais a diferenciação das formas tripomastigotas metacíclicas se dá nas glândulas salivares das moscas tsé-tsé (HOARE, 1972). Entretanto, casos como o de *Trypanosoma grayi*, patógeno transmitido pelas fezes de moscas a crocodilos (KELLY *et al.*, 2014), ou o caso de *T. rangeli* que é transmitido pela pica de triatomíneos, seguem em debate por apresentarem características biológicas não comuns às seções Stercoraria e Salivaria (GRISARD, 2002; MAIA DA SILVA *et al.*, 2004; STEINDEL *et al.*, 1998; STEVENS; NOYES; GIBSON, 1998).

Figura 2 – Ciclo biológico de *Trypanosoma rangeli* no hospedeiro invertebrado.

Ilustração de *R. prolixus* infectado por *T. rangeli*. No detalhe, estão demonstradas as fases da infecção em A) ingestão de formas tripomastigotas sanguíneas. B) Diferenciação para formas epimastigotas e invasão epitelial. C) Replicação das formas epimastigotas na hemolinfa. D) Fagocitose por hemócitos. E) Penetração dos parasitos na glândula salivar. F) Diferenciação em tripomastigotas metacíclicos.



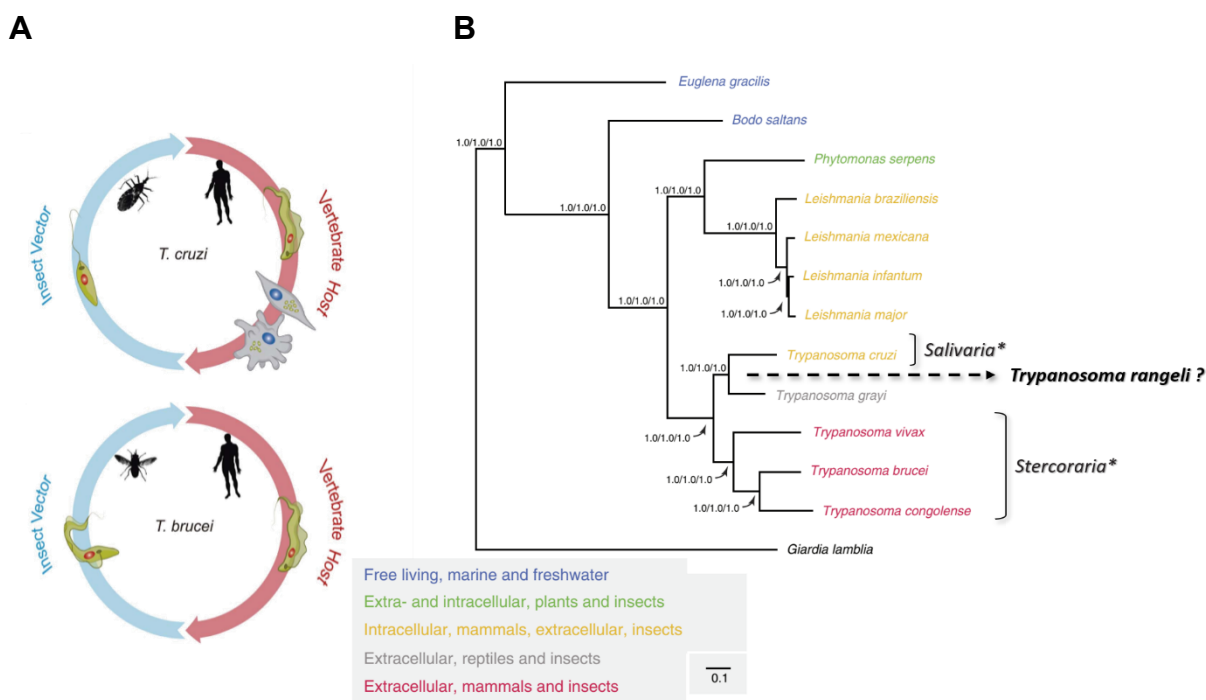
Fonte: Stoco *et al.* (2017).

Outra classificação que é aplicada aos tripanosomatídeos, leva em consideração a capacidade de invasão celular e replicação em seus hospedeiros. O *T. cruzi* é classificado como um parasito intracelular em mamíferos e extracelular no vetor (ATWOOD 3RD *et al.*, 2005; BARTHOLOMEU *et al.*, 2014; BERN, 2015; DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010; FERNANDES; ANDREWS, 2012; FIELD; CARRINGTON, 2009); enquanto, o *T. brucei* é categorizado como extracelular em hospedeiros mamíferos e invertebrados. O ciclo dos tripanosomas africanos não envolve penetração celular, mas sim a replicação dos parasitos na corrente sanguínea no mamífero e no intestino, proventrículo e glândula salivar de *Glossina* spp. (Figura 3) (RADWANSKA *et al.*, 2018; SHARMA *et al.*, 2009; TRINDADE *et al.*, 2016).

Figura 3 – Classificação de parasitos da Ordem Kinetoplastida de acordo com tipo de infecção em seus hospedeiros vertebrados.

A) Representação comparativa do ciclo de vida de *T. cruzi* e *T. brucei*. Em cada ciclo, é demonstrada a forma replicativa do parasito no vetor e inseto (*T. cruzi* epimastigota – triatomíneo e *T. brucei* tripomastigota procíclico – mosca tsé-tsé). No homem, as formas infectivas tripomastigotas em ambas as espécies e a forma replicativa intracelular, amastigota de *T. cruzi*. B) Árvore filogenética de membros do filo Euglenozoa com base em análise de BLASTp. Destaque em cores nas espécies indica diferentes formas de replicação nos hospedeiros indicados na legenda interna da imagem. Barra de

escala referente ao número de mudanças por sítio. Nós internos: valores de *bootstrap Bayesian inference*, *Maximum Likelihood* e *Neighbor Joining*. * indica classificação de secções com base em filogenia proposta por Fraga *et al.* (2016). Seta sombreada indica posicionamento, para fins didáticos, de *T. rangeli* na árvore filogenética, com base no proposto por Fraga *et al.* (2016).



Fonte: Bartholomeu *et al.* (2014) e Adaptado de Kelly *et al.* (2014).

No que diz respeito a *T. rangeli*, esse é classificado como extracelular no vetor pois, apesar de invadir o epitélio intestinal, esse parasito não apresenta ciclo replicativo no interior das células do triatomíneo. Já, ao que se refere ao hospedeiro mamífero, muitas questões permanecem em aberto. Apesar da existência equivocada de literatura que relate a ocorrência de replicação e persistência por *T. rangeli in vivo* e *in vitro* (DE SCORZA; URDANETA-MORALES; TEJERO, 1986); grupos de pesquisa com maior prática na experimentação com *T. rangeli*, e que utilizam controles rigorosos de certificação de pureza de suas culturas – afim de prevenir possíveis contaminações com linhagens de outras espécies –, descrevem a infecção por *T. rangeli* como sendo de curta duração (CUBA CUBA, 1998). A quantidade de parasitos no sangue é crescente até atingir o pico de parasitemia, que é único e ocorre entre os 3º e 5º dia pós-infecção (d.p.i.). A partir desse ponto, o número de parasitos decresce continuamente, persistindo em média por duas semanas (HERBIG-SANDREUTER, 1957). Com base em diferentes técnicas de detecção, cepas do parasito e hospedeiros mamíferos, foi constatada a identificação de *T. rangeli* em: camundongos (*Mus musculus*) meses após infecção experimental através de hemocultura (GUHL;

VALLEJO, 2003; HERBIG-SANDREUTER, 1957); até dois anos em cobaia (*Cavia porcellus*) (CUBA CUBA, 1998) e por até três semanas através de xenodiagnóstico e hemocultura em macaco rhesus (*Macaca mulatta*) (HERBIG-SANDREUTER, 1957).

Herbig-Sandreuter (1957) avaliou por histopatologia diferentes tecidos de mais de 130 camundongos recém nascidos, os quais são particularmente susceptíveis à infecção pelo parasito, não tendo observado nenhuma alteração histopatológica em relação aos animais controle. Estudos recentes realizados com diferentes hospedeiros, metodologias e cepas de *T. rangeli* obtiveram os mesmos resultados (BASSO; MORETTI; FRETES, 2014; GRANUCCI; STOCO, 2013; SCHLINDWEIN; STOCO, 2014).

A capacidade de divisão de *T. rangeli*, até o momento, é descrita apenas para a forma epimastigota (PRESTES *et al.*, 2019). Diversos trabalhos buscaram observar a replicação do parasito durante a infecção em mamíferos ou *in vitro* com a utilização de diferentes tipos celulares como macrófagos e fibroblastos (EGER-MANGRICH *et al.*, 2001; OSORIO *et al.*, 1995; TANOURA *et al.*, 1999). Esses trabalhos demonstraram a capacidade de sobrevivência de *T. rangeli* em cultura e registram a ocorrência de uma forma amastigota-like intracelular. Contudo, apesar da morfologia arredondada, não apresenta divisão celular dentro das condições experimentais testadas, não sendo considerada uma amastigota tradicional e que não evolui para formas tripomastigotas como é observado para *T. cruzi*. Osorio *et al.* (1995) demonstraram que amastigotas-like de *T. rangeli* são formas intracelulares viáveis, uma vez que são capazes de sustentar infecção em *R. prolixus* alimentado com macrófagos infectados. De forma que os autores sugerem que a manutenção do parasito no hospedeiro mamífero, poderia ocorrer através de uma forma encriptada (OSORIO *et al.*, 1995). Todavia, não há consenso acerca dessa observação, pois há outros autores que associam a manutenção de uma parasitemia subpatente a um indicativo de replicação celular. Dessa forma, há a demanda de novos estudos utilizando técnicas mais sensíveis e que possam indicar caminhos mais sólidos que os traçados por estudos realizados a 30 ou 50 anos atrás.

1.2 SEQUENCIAMENTO DO GENOMA DE *Trypanosoma rangeli*

A elucidação do genoma de um organismo permite diversas inferências e comparações. Além da determinação do número de cromossomos é possível saber a

organização dos genes, analisar quais conjuntos de genes são compartilhados entre espécies, avaliar a presença de elementos genéticos móveis, assinaturas gênicas relacionadas a interação patógeno-hospedeiro, análise de resistência a fármacos, entre outras possibilidades que visam elencar alvos terapêuticos e vacinais. Essas são apenas algumas das frentes de trabalho que a era genômica possibilitou nas últimas décadas (BUSCAGLIA; KISSINGER; AGÜERO, 2015).

Nessa linha, El-Sayed *et al.* (2005) publicaram o genoma de *T. cruzi*, simultaneamente com as divulgações dos genomas de *T. brucei* (BERRIMAN *et al.*, 2005) e *Leishmania major* (IVENS *et al.*, 2005), permitindo refinar diversas informações quanto a constituição gênica dessas espécies (CHOI; EL-SAYED, 2012; EL-SAYED *et al.*, 2005; TEIXEIRA *et al.*, 2012). Alguns anos após, uma nova leva de genomas de tripanosomatídeos foi publicada (CARNES *et al.*, 2015; KELLY *et al.*, 2014; LLANES *et al.*, 2015; REAL *et al.*, 2013), dentre eles, o genoma de *T. rangeli* (STOCO *et al.*, 2014b).

Comparando o genoma de *T. rangeli* ao dos demais tripanosomatídeos patogênicos, nota-se que aproximadamente 93% dos genes de *T. rangeli* são comuns à esses outros tripanosomatídeos, possuindo somente 512 genes exclusivos (STOCO *et al.*, 2014b). Do ponto de vista filogenético, *T. cruzi* e *T. rangeli* são muito próximos, como demonstrado em diversos estudos (BARTHOLOMEU *et al.*, 2014; BELTRAME-BOTELHO *et al.*, 2016b; DA SILVA *et al.*, 2004; FRAGA *et al.*, 2016; VILLAFRAZ *et al.*, 2018), o que sugere a possibilidade de que *T. rangeli* tenha características biológicas no hospedeiro mamífero semelhantes à *T. cruzi*. Contudo, apesar de filogeneticamente mais distante de *T. brucei*, o *T. rangeli* apresenta semelhanças quanto ao ciclo biológico de tripanosomas africanos como a transmissão anterior no vetor, por exemplo (STOCO *et al.*, 2014b).

Com relação às diferenças entre *T. rangeli* e *T. cruzi*, destaca-se a redução do número de cópias gênicas das famílias relacionadas a fatores de virulência, tais como as proteínas de superfície associadas a mucinas (MASP), trans-sialidases e mucinas. Diversos determinantes de virulência já foram estudados em *T. cruzi*, incluindo a função de diversas glicoproteínas de superfície (que serão abordadas em maior detalhe no tópico 1.4); o papel da sinalização celular que promove o acionamento de endocitose para internalização do parasito e a importância de certas enzimas que auxiliam a sobrevivência intracelular de *T. cruzi*, entre outros eventos.

Muito do que se sabe quanto à função de fatores de virulência em *T. cruzi* é proveniente de técnicas de manipulação genética, que permitiram a determinação da função biológica de diversas moléculas a partir de abordagens como superexpressão, deleção, fusão à genes repórteres e mutações sítio dirigidas (TAYLOR; HUANG; KELLY, 2011).

Algumas dessas abordagens de estudos funcionais já propiciaram importantes contribuições no entendimento da biologia de *T. rangeli*, como a expressão de proteínas fluorescentes durante a interação parasito-vetor (GUEVARA *et al.*, 2005), a elucidação da rota biossintética de tripanotona a partir de expressão heteróloga (ROMERO *et al.*, 2015) e avaliação da contribuição de tripanotona redutase no sistema antioxidante por superexpressão (BELTRAME-BOTELHO *et al.*, 2016a). Parte desses trabalhos são anteriores ou se encontravam em andamento, quando foi publicada a primeira versão do genoma de *T. rangeli*, fundamentados nos dados de transcriptoma desse parasito (GRISARD *et al.*, 2010) ou em clonagens baseadas em sequências de genes ortólogos. Conseqüentemente, com a publicação do genoma se espera potencializar os estudos funcionais de diversos genes de *T. rangeli*, utilizando a abordagem de genômica reversa (BEVERLEY, 2003).

Para tal, ferramentas moleculares como plasmídeos são essenciais para os estudos funcionais (BATISTA *et al.*, 2010; TAYLOR; HUANG; KELLY, 2011), sendo amplamente utilizados para edição gênica em *T. cruzi*, *T. brucei* e *Leishmania* spp. Entretanto, para *T. rangeli* ainda são escassos os estudos de genética reversa. Até o momento, utiliza-se plasmídeos com sequências de *T. cruzi*, que podem não ser reconhecidos ou serem regulados diferentemente em outra espécie e, por esse motivo, não apresentam resultados plenamente satisfatórios em *T. rangeli*.

1.3 FERRAMENTAS MOLECULARES NA INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO

A clonagem gênica é considerada um dos grandes marcos na área biomédica, e talvez o método mais importante em todo campo biotecnológico. Através da clonagem do DNA, se pode conhecer a função dos genes e a regulação da expressão gênica, permitindo a descoberta de mecanismos biológicos que revolucionaram a indústria biotecnológica e farmacêutica (COHEN *et al.*, 1973; COHEN, 2013). Por certo, na área de parasitologia não seria diferente (BEVERLEY, 2003).

Plasmídeos de expressão gênica para tripanosomatídeos começaram a ser desenvolvidos no final da década de 80, e contribuíram para a elucidação dos elementos de regulação da expressão gênica em tripanosomatídeos. O vetor pTEX foi um importante plasmídeo gerado por Kelly *et al.* (1992), sendo o primeiro plasmídeo episomal estável para expressão em *T. cruzi* e *Leishmania* spp. A partir do uso desse plasmídeo, foram descobertas algumas das sequências regulatórias específicas de *T. cruzi* como as sequências flanqueadoras do gene da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), que contém regiões não traduzidas (UTR – do inglês *untranslated region*) que promovem o controle da transcrição de gene constitutivo (KELLY *et al.*, 1992). A partir do conhecimento dos elementos básicos de um vetor para tripanosomatídeos, diferentes modificações foram feitas para melhorar o controle e eficiência das transfecções, de acordo com a maquinaria de expressão de cada espécie (BOUVIER *et al.*, 2013; TAYLOR; HUANG; KELLY, 2011). Assim, com base no vetor pTEX, diversos plasmídeos foram gerados como pRIBOTEX, pTRES, pTcINDEX, pTRIX entre outros, que foram amplamente empregados no estudos de engenharia genética em *T. cruzi* (BATISTA *et al.*, 2010; BOULANGER, 2018; DAROCHA *et al.*, 2004; KELLY *et al.*, 1992; MARTINEZ-CALVILLO *et al.*, 1997; TAYLOR; KELLY, 2006; VAZQUEZ; LEVIN, 1999).

Dentre essas ferramentas, publicações recentes demonstram o grande potencial do uso de parasitos geneticamente modificados para monitoramento *in vivo* de infecções (COSTA *et al.*, 2018; HYLAND *et al.*, 2008; LEWIS *et al.*, 2014; MCLATCHIE *et al.*, 2013). Um dos maiores desafios da doença de Chagas é a compreensão do caráter silencioso dessa doença. Após o primeiro contato com o parasito, o paciente passa por uma fase aguda, na qual é possível visualizar formas tripomastigotas na corrente sanguínea. Após a diminuição da quantidade de parasitos circulantes devido à resposta imune celular, o hospedeiro passa por longo período sem sintomas. Contudo, aproximadamente 30% dos infectados apresentam acometimento do coração e órgãos do trato gastrointestinal décadas após a infecção (BERN, 2015; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). Com um número extremamente baixo de parasitos, até mesmo as técnicas que visam a identificação por amplificação de ácido nucleico podem ser falhas em detectar o parasito e não retratam o estado metabólico do patógeno. Essa característica biológica é relatada em diversos protozoários, o que afeta diretamente a avaliação da eficácia de novos tratamentos,

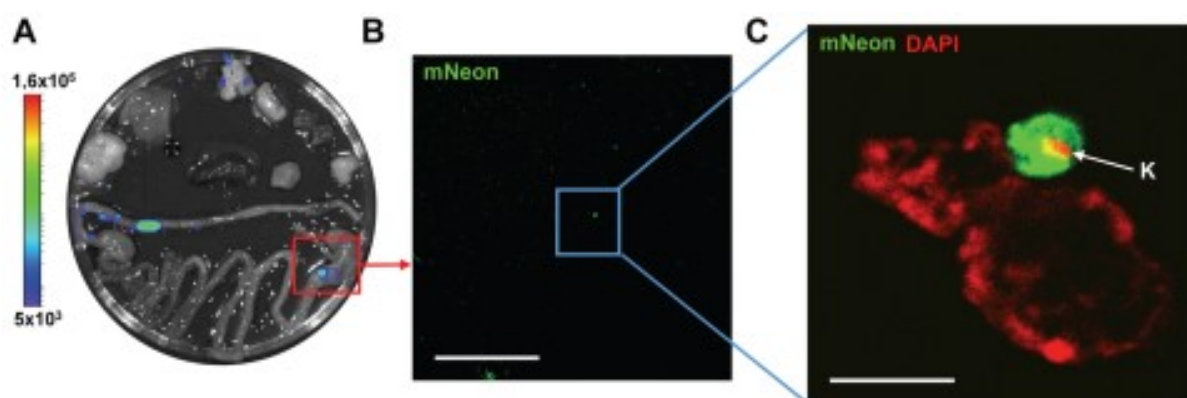
uma vez que, a diminuição drástica da parasitemia não significa a cura da doença (FIELD *et al.*, 2017; TAVARES *et al.*, 2017).

Felizmente, técnicas mais sofisticadas e acuradas tornam possível a investigação de questões biológicas que ainda não são compreendidas e, cujo entendimento é essencial para o avanço na busca por novos tratamentos e prevenção das doenças negligenciadas (KRATZ, 2019), podendo ainda auxiliar na compreensão de questões biológicas complexas como o ciclo de *T. rangeli* no hospedeiro mamífero.

McLatchie *et al.* (2013) e Lewis *et al.* (2014) desenvolveram metodologia baseada em parasitos bioluminescentes para avaliação da eficácia de drogas para o tratamento de infecções por *T. brucei* e por *T. cruzi*. Essa técnica foi recentemente aperfeiçoada pela expressão fusionada do gene da enzima luciferase com a proteína verde fluorescente mNeonGreen (Neon), sendo essa de maior fotoestabilidade e brilhância do que a GFP (HOSTETTLER *et al.*, 2017; SHANER *et al.*, 2013). Devido à alta sensibilidade da abordagem de bioluminescência e fluorescência combinadas, Costa *et al.* (2018) relatam a detecção a nível de um único parasito no tecido do hospedeiro (Figura 4).

Figura 4 – Abordagem de fluorescência guiada por bioluminescência.

A) Bioimagem de órgãos de camundongo BALB/c infectado com *T. cruzi* (fase crônica – dia 117). **B)** Avaliação de histologia fluorescente da região assinalada em A. **C)** Identificação de forma amastigota de *T. cruzi* próxima ao núcleo da célula hospedeira.



Fonte: Costa *et al.* (2018).

1.4 GLICOPROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE

Como explanado brevemente, ao comparar o genoma de *T. cruzi* ao de *T. rangeli*, foi identificado que os genes que codificam para proteínas de superfície

concentram grande parte das diferenças entre essas duas espécies (STOCO *et al.*, 2014b). Mais precisamente, uma distinção no número de cópias gênicas das glicoproteínas mucinas, trans-sialidases e MASP, como demonstrado na Tabela 1.

Essas glicoproteínas atuam em processos chave da interação do *T. cruzi* com seus hospedeiros. Para o estabelecimento de uma infecção intracelular são necessários processos como o reconhecimento, adesão e internalização do parasito na célula hospedeira. A etapa de adesão envolve o reconhecimento de moléculas de superfície pelas células do parasito e do hospedeiro (DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010; MCCONVILLE; FERGUSON, 1993). Estima-se que aproximadamente 50% dos genes codificantes de *T. cruzi* sejam traduzidos em proteínas de superfície, sendo que Nakayasu *et al.* (2009) indicam que 12% dos genes de *T. cruzi* codificam proteínas localizadas na superfície do parasito por ancoramento através de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (NAKAYASU *et al.*, 2009; QUEIROZ *et al.*, 2014).

Âncoras GPI são modificações pós-traducionais presentes em todos os organismos eucariotos, sendo particularmente abundantes em protozoários. Não por acaso, a primeira estrutura de GPI completamente elucidada foi a da glicoproteína variante de superfície (VSG) de *T. brucei* em 1987 (FERGUSON *et al.*, 1988; SCHMITZ *et al.*, 1987). Proteínas desse tipo são expressas em todos os estágios de desenvolvimento de *T. cruzi* e estão presentes em membros de famílias multigênicas notoriamente descritas como essenciais para a patogenicidade do parasito como as trans-sialidases, mucinas, MASP e metaloproteases gp63 (ATWOOD 3RD *et al.*, 2005; BUSCAGLIA *et al.*, 2006; FREITAS-JUNIOR; BRIONES; SCHENKMAN, 1998; MORTARA *et al.*, 2001; NAKAYASU *et al.*, 2009; PEREIRA, 1983; QUEIROZ *et al.*, 2014; RUIZ *et al.*, 1998).

Tabela 1 – Comparação de famílias multigênicas entre *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi*.

Determinação do número de cópias multigênicas de *T. rangeli* com base nas sequências peptídicas de MASP, GP63, Trans-sialidase, Amastina, DGF, KMP-11, Tuzina e RHS provenientes do genoma de *T. cruzi* (CL Brener Esmeraldo - V. 7.0) disponível em TriTrypDB. Valores apresentados na tabela indicam número de cópias genicas em genoma diploide como indicado pelo método de validação pela identificação dos genes cópia única msh2, msh6 e gpi8. Determinação de número de cópias de mucinas realizado através de busca da sequência que codifica o peptídeo sinal do gene AUPL00006796 de *T. rangeli*.

Família Gênica	<i>T. rangeli</i>	<i>T. cruzi</i>
	SC-58	CL Brener
MAASP	50	1465
GP63	444	449
Trans-sialidases	120	1481
Amastins	72	27
DGF	422	569
KMP-11	148	40
Tuzin	34	83
RHS	689	777
Mucin	15	992
<i>msh6</i>	2	2
<i>msh2</i>	2	2
<i>gpi8</i>	2	2

Fonte: Stoco *et al.* (2014).

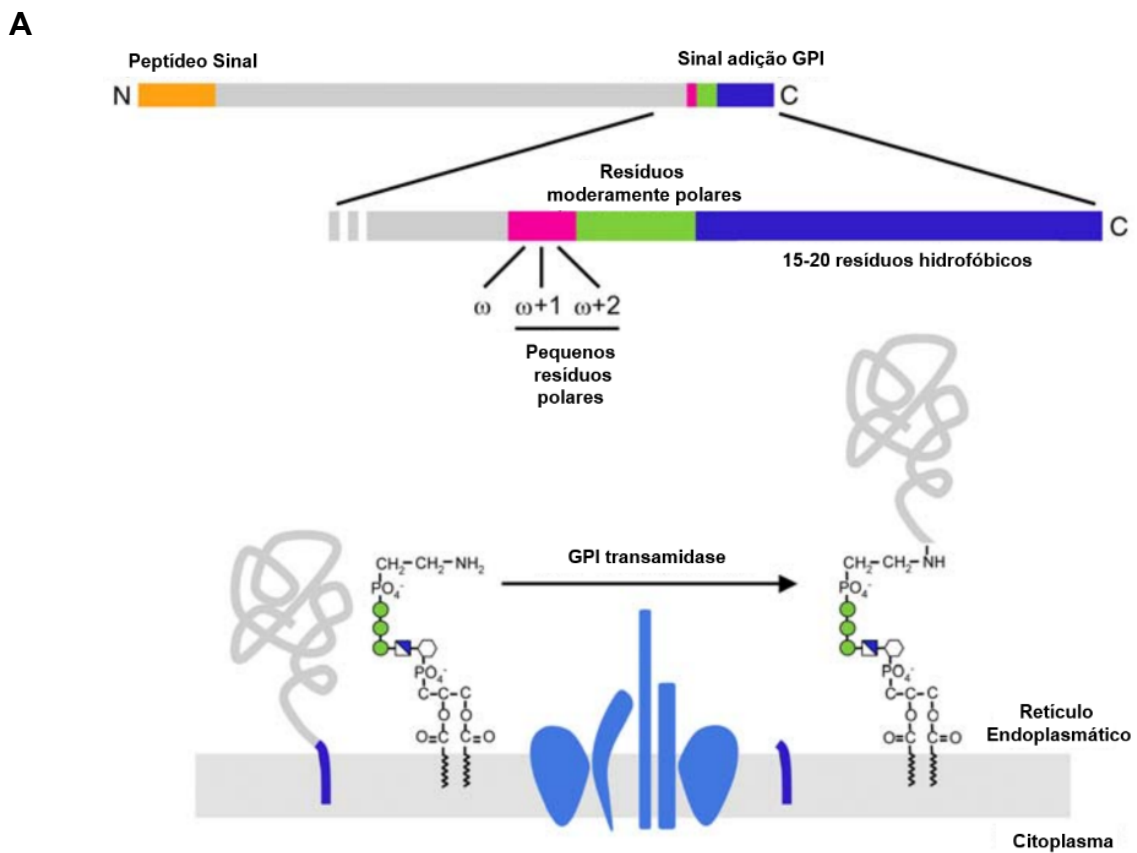
A estrutura geral de uma âncora GPI compreende uma cauda lipídica contendo um fosfatidilinositol ou inositolfosfoceramida ligada a um resíduo de glicosamina (GlcN) seguido de três resíduos de manose (Man). A terceira Man, oposta ao resíduo GlcN, geralmente é ligada à proteína por uma etanolaminafosfato entre a hidroxila C6 da Man a um grupo α -carboxil da extremidade carboxi-terminal (C-terminal) do aminoácido (KINOSHITA, 2016; MICHAEL A.J. FERGUSON, 2017). As proteínas destinadas a receber uma âncora GPI são sintetizadas com duas sequências sinal: um peptídeo sinal amino-terminal (N-terminal) de endereçamento da proteína para o retículo endoplasmático (RE) e, uma sequência sinal C-terminal que sinaliza para clivagem e transferência à uma âncora GPI pré-montada. A ligação da âncora GPI à extremidade C-terminal da proteína ocorre através de uma reação de transamidação catalisada pela enzima GPI transamidase (AMTHAUER *et al.*, 1993; EISENHABER *et al.*, 2014; GERBER; KODUKULA; UDENFRIEND, 1992; SIGNORELL; MENON, 2009) (Figura 5A). Há uma infinidade de adições e modificações de carboidratos que podem ser encontradas em âncoras GPI, indicando que essa estrutura atua em outros processos biológicos e não só como um elemento de fixação de proteínas à membrana celular (Figura 5B) (MCCONVILLE; FERGUSON, 1993).

De forma geral, as proteínas ancoradas à GPI participam de importantes processos biológicos, tais como: sinais de transdução, endocitose, regulação do

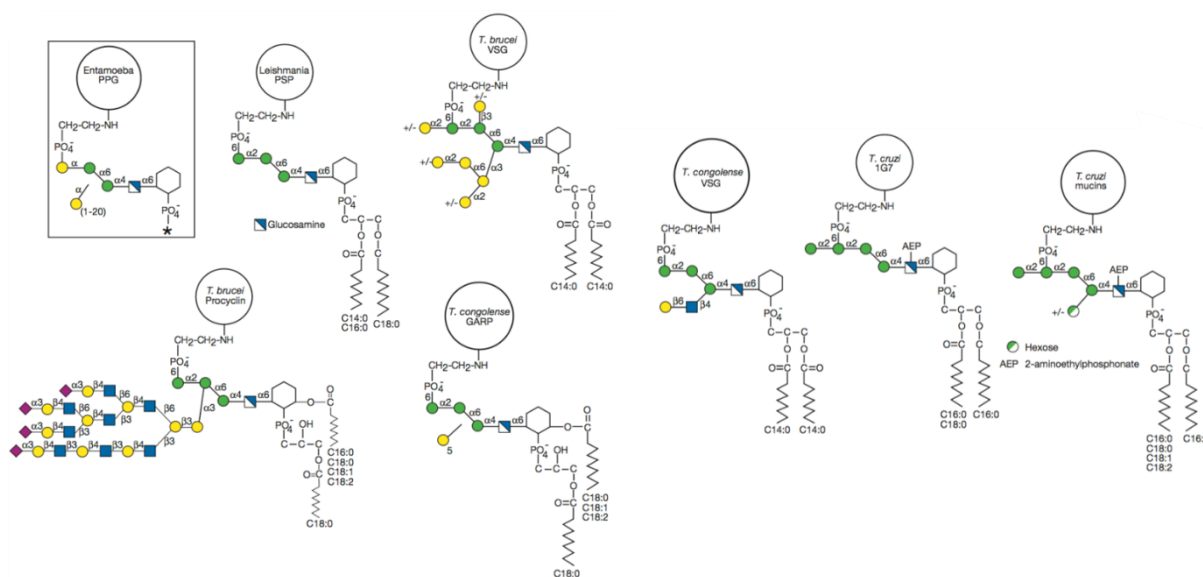
complemento, apresentação de antígenos e interações patógeno-hospedeiro (ZHOU *et al.*, 2018). Essas glicoproteínas podem revestir extensivamente a membrana plasmática e atuar nos eventos de adesão e invasão de células hospedeiras, modulação e evasão da resposta imune (DUBOIS; DEMICK; MANSFIELD, 2005; LEGUIZAMON *et al.*, 1994; MUCCI *et al.*, 2002). Em diversos desses eventos descritos em *T. cruzi*, o conjunto de glicoproteínas mucinas e trans-sialidases ativas (aTS) operam de forma concatenada para execução de suas funções, como descrito nos tópicos a seguir.

Figura 5 – Ancoramento de proteínas por GPI.

A) Representação dos elementos necessários para sinalização de ancoramento por GPI, com detalhe da característica físico-química da porção C-terminal de sinalização para ancoramento e montagem de proteínas à GPI pela enzima transamidase na membrana interna do RE. **B)** Exemplos de estruturas de âncora GPI presentes em diferentes protozoários. (Representação dos monossacarídeos: ● manose; ● galactose; ◻ glicosamina; ◻ N-acetilglicosamina; ◆ ácido siálico; AEP: 2-aminoetilfosfonato).



B



Fonte: Adaptado de Signorell e Menon (2009) e Ferguson, Hart e Kinoshita (2017).

1.4.1 Trans-sialidasas e mucinas-like de *Trypanosoma cruzi*

Em *T. cruzi* são descritos mais de 1.400 genes codificantes para trans-sialidasas, sendo a maior família multigênica dessa espécie (CAMPETELLA *et al.*, 1992; EL-SAYED *et al.*, 2005; PEREIRA, 1983). Essa família de enzimas é bastante heterogênea, não apenas em estrutura, como também em relação ao papel que exercem como fatores de virulência. Todas trans-sialidasas possuem um peptídeo sinal, âncora GPI e o motivo VTV (VTVxNVxLYNR) conservado ou degenerado na porção C-terminal, que compõe o domínio lectina-like (AMAYA *et al.*, 2003; BUSCHIAZZO *et al.*, 2002). Enquanto que, somente alguns grupos possuem o domínio catalítico neuraminidase N-terminal; o motivo Asp box (SxDxGxTW), que pode ser encontrado em repetições, ausente ou degenerado (FREITAS *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 1980; SCHENKMAN *et al.*, 1994) e as repetições antigênicas SAPA (do inglês *Shed Acute Phase Antigen*) na porção C-terminal (BUSCAGLIA *et al.*, 1999; POLLEVICK *et al.*, 1991). Devido a presença de diferentes combinações dessas regiões e distintas funções, a superfamília das trans-sialidasas foi categorizada em classes por Schenkman *et al.* (1994) e Freitas *et al.* (2011), a saber:

- **TcS I:** Codifica para enzimas com atividade catalítica de hidrólise e trans-glicosidase de ácido siálico (Sia – do inglês *Sialic acid*) ou que possuem mutações pontuais e atuam como lectinas (receptores de Sia)

(CREMONA *et al.*, 1995, 1999; SCHENKMAN; PONTES DE CARVALHO; NUSSENZWEIG, 1992; UEMURA *et al.*, 1992). Devido à íntima relação dessas trans-sialidases com as mucinas-*like*, essa classe é descrita com detalhes ao longo esta seção.

- **TcS II:** Inclui glicoproteínas como gp85, gp90, gp82 e SA85, ASP-2, que são descritas como extremamente importantes para os processos de adesão e invasão celular. Apesar de pertencerem ao mesmo grupo por semelhanças estruturais, sabe-se que essas glicoproteínas atuam de formas distintas para a promoção da entrada nas células do hospedeiro mamífero (ALVES; COLLI, 2008; KAHN *et al.*, 1991; MAEDA; CORTEZ; YOSHIDA, 2012; MAEDA *et al.*, 2016; RAMIREZ *et al.*, 1993; RUIZ *et al.*, 1998; TAKLE; CROSS, 1991);
- **TcS III:** Abrange proteínas com funções regulatórias às vias clássica e alternativa do sistema complemento do hospedeiro mamífero. Esse grupo é classicamente representado pela proteína FL-160, CRP (do inglês *Complement Regulatory Protein*), entre outras (BEUCHER; NORRIS, 2008; VAN VOORHIS; EISEN, 1989).
- **TcS IV:** Essa é uma classe de função desconhecida, contudo, possui os mesmos motivos presentes no grupo TcS I, com algumas alterações que impedem a atividade catalítica e repetições altamente antigênicas, mas diferentes das repetições SAPA do grupo TcS I (BURNS *et al.*, 1992).
- **TcS V – VIII:** Ainda sem função determinada, Freitas *et al.* (2011) descreveram a estrutura, padrão de expressão e classificação dos membros desses grupos. Porém, pouco se sabe sobre essas proteínas. Esses autores relatam a capacidade de variação antigênica de TcS V, mas ainda são considerados grupos pouco estudados (HERREROS-CABELLO *et al.*, 2020).

A descrição das trans-sialidases em *T. cruzi* teve início a partir da observação da atividade neuraminidase de extratos proteicos do parasito (PEREIRA, 1983). Schenkman *et al.* (1991) demonstram que essas enzimas não só hidrolisam o Sia das células do hospedeiro, como também, o transferem para a superfície do parasito. Assim, houve a concatenação os dados reportados por Previato *et al.* (1985) e Pereira *et al.* (1983), descrevendo o mecanismo como o Sia é incorporado à membrana por

T. cruzi pela dupla atividade – hidrolise e trans-glicosidase – de uma mesma enzima (SCHENKMAN; PONTES DE CARVALHO; NUSSENZWEIG, 1992; SCHENKMAN et al., 1991; UEMURA et al., 1992). Ao ser sequenciado o gene TCNA, compreende-se que *T. cruzi* possui o domínio catalítico neuraminidase (também chamado sialidase) com identidade de 30% ao encontrado em bactérias (PEREIRA et al., 1991; UEMURA et al., 1992).

T. cruzi, assim como diversos outros eucariotos inferiores, não é capaz de sintetizar Sia (PREVIATO et al., 1985). Dessa forma, o parasito possui uma maquinaria capaz de roubar esse carboidrato (DA FONSECA et al., 2019; SCHENKMAN et al., 1993a). O Sia é comumente encontrado nas extremidades de *N*-glicanas, *O*-glicanas e glicosfingolípídeos, e são um grupo de carboidratos de nove carbonos de cadeia principal com um grupo ácido carboxílico na posição C1. Mais de 50 moléculas são classificadas com Sia, sendo o membro mais conhecido o ácido *N*-acetilneuramínico – Neu5Ac (GHOSH, 2018; VARKI; SCHAUER, 2009). Essa diversidade química contribui para a enorme variedade de estruturas de Sia nas superfícies celulares, pois, a síntese de certos tipos de Sia ocorre de forma espécie/tecido específica. Essa regulação pode ser associada às preferências de interação de certos patógenos a tipos celulares específicos (HADLEY, 1986; VARKI; SCHAUER, 2009).

O Sia é extremamente abundante na superfície de células animais; por exemplo, são encontrados mais de 10 milhões de moléculas de Sia por hemácia humana, sendo parte do padrões de reconhecimento eritrocitário como os sistemas ABO, Duffy e Lewis (WARD; O'SULLIVAN; O'DONNELL, 2019; WU, 2019). O Sia pode ser mantido na superfície celular ou secretado por vesículas e proteínas livres. Devido a carga eletronegativa relativamente forte, o Sia atua no transporte de íons e drogas, estabilização conformacional de proteínas, regulação da afinidade de receptores, aumento de viscosidade de secreções, repulsão eletrostática entre células e proteção de moléculas contra proteases ou glicosidases (VARKI; SCHAUER, 2009). Essa última função, está associada com o fato de que o Sia pode interferir no reconhecimento de receptores enzimáticos, epítomos proteicos e glicoeptomos. Todavia, o próprio Sia serve como ligante para lectinas, como por exemplo as Siglecs que são receptores específicos de Sia (ZHOU et al., 2018). Como o Sia regula diversos processos, vários patógenos podem utilizá-lo para influenciar na sinalização celular do hospedeiro, como as toxinas colérica, tetânica e pertussis, enzimas

sialidases do vírus influenza e trans-sialidases de *T. cruzi* (CHANG; NIZET, 2020; VARKI; SCHAUER, 2009).

A trans-sialidase do grupo I de *T. cruzi* (*TcTS*) catalisa a hidrólise do Sia presente na extremidade terminal de glicolípídeos, glicoproteínas e oligossacarídeos sialilados via ligação α -2,3. Se na presença de uma molécula aceptora, a enzima executa a transferência do Sia – de forma específica – à resíduos β -galactopiranosil (β Gal p) formando ligações α -2,3 a glicoconjugados, como os presentes nas glicoproteínas as mucinas. Na ausência de aceptor, essa enzima promove a hidrólise liberando o resíduo de Sia no meio aquoso (SCHENKMAN *et al.*, 1993a). A *TcTS* não é capaz de remover Sia de qualquer glicoconjugado. Resíduos de Sia ligados através de ligação α -2,6, α -2,8 e α -2,9 são doadores de Sia muito ruins; bem como, a presença de dissacarídeos adjacentes ou fucose em posições laterais ao resíduo de galactose terminal impedem completamente a clivagem (BUSCHIAZZO *et al.*, 2002; SCHENKMAN *et al.*, 1994; SCHENKMAN; PONTES DE CARVALHO; NUSSENZWEIG, 1992; SCHENKMAN; DIAZ; NUSSENZWEIG, 1991a).

Sabe-se que o parasito expressa *TcTS* ativas muito semelhantes à *TcTS* inativas (iTS) (UEMURA *et al.*, 1992) e essa alteração ocorre naturalmente devido a substituição do resíduo Tyr³⁴² por His no sítio catalítico, modificando a capacidade enzimática da *TcTS* (CREMONA *et al.*, 1995; FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2015). Contudo, apesar de enzimaticamente inativas, as iTS atuam como lectinas, ou seja, reconhecem e se ligam ao Sia do hospedeiro. Todeschini *et al.* (2002) demonstram que iTS se ligam à linfócitos T CD4+ através de CD43 (leucosialin) (CREMONA *et al.*, 1999; TODESCHINI *et al.*, 2002, 2004). As *TcTS* estão localizadas na superfície do parasito ligadas à âncora GPI, mas também, podem ser secretadas por vesículas ou estarem livres no meio extracelular por ação da enzima fosfolipase C (AFFRANCHINO *et al.*, 1989; BUSCAGLIA *et al.*, 1999; LANTOS *et al.*, 2016; LEGUIZAMON *et al.*, 1994). Assim, as *TcTS* são capazes de desregular a sinalização celular de forma indiscriminada, desencadeando ações como apoptose em timócitos (MUCCI *et al.*, 2006), modulação de citocinas em células T residentes do braço (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2017), trombocitopenia (TRIBULATTI *et al.*, 2005), e alterações histológicas em diversos órgãos, eventos que auxiliam o parasito a estabelecer a infecção (DA FONSECA *et al.*, 2019; FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2015).

As mucinas para serem aceptoras de Sia, possuem uma vasta quantidade de O-glicosilações. Esse tipo de modificação pós-traducional ocorre em resíduos de Ser

e Thr, de forma muito semelhante às mucinas originalmente descritas nos epitélios pulmonar e digestivo de mamíferos – e por essa razão são denominadas mucinas-*like* (ALVES; COLLI, 1975; RUIZ *et al.*, 1993; SCHENKMAN *et al.*, 1993a). Na prática, as glicosilações compreendem mais de 60% da massa molecular das mucinas, tornando essa proteína extremamente hidrofílica. Dessa forma, aminoácidos como Cys, Phe, Trp e Tyr são pouco comuns ou ausentes na proteína madura (ALLEN; KELLY, 2001; DI NOIA *et al.*, 1996).

Essas glicoproteínas não formam estruturas secundárias ou terciárias complexas, sendo semelhantes a um “algodão doce”. As mucinas possuem um cerne proteico extensivamente recoberto por glicoconjugados. Uma *N*-acetilglicosamina (GlcNAc) é ligada ao grupo hidroxil dos resíduos de Ser e Thr, seguido de até cinco galactoses - que podem ser furanoses (Gal β) ou piranoses (Gal α). Na porção mais distal em relação ao *core* proteico, há um resíduo de β Gal α na maior parte das mucinas-*like*, e ao qual será ligado o Sia via ligação α 2,3 pela TcTS. Assim, as mucinas-*like* de *T. cruzi* diferem de outras glicoproteínas O-glicosiladas de mamíferos, que são constituídas de *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) (ALMEIDA *et al.*, 1994; DE LEDERKREMER; AGUSTI, 2009; MORTARA *et al.*, 1992; SCHENKMAN *et al.*, 1993b).

A atividade biológica das mucinas é estritamente ligada às modificações pós-traducionais que as constituírem; de modo que, diferenças nas moléculas de glicanas ou em suas disposições na glicoproteína, podem possuir significado biológico relevante. Por exemplo, a presença de Gal β em algumas cepas de *T. cruzi* como Tulahuen DTU VI (do inglês *Discrete Typing Units*) e Dm28c DTU I (AGRELLOS *et al.*, 2003; JONES *et al.*, 2004), mas completamente ausente nas cepas Y DTU II e CL Brener DTU VI (DE LEDERKREMER; AGUSTI, 2009). Ainda, Arruda *et al.* (1989) demonstraram que anticorpos anti-Gal β impedem a invasão celular de *T. cruzi*, além do fato de Gal β ser ausente em mamíferos (DE ARRUDA; COLLI; ZINGALES, 1989). Outra descrição importante em relação as glicanas de mucinas é a pré-existência de anticorpos líticos anti- α Gal em humanos e o aumento da titulação desses anticorpos em pacientes chagásicos. Tripomastigotas de cultura celular são lisados por esses anticorpos de forma independente de sistema complemento. Apesar de α Gal não ser um acceptor de Sia, essa glicana está presente em somente parte das mucinas-*like*, que coexistem na membrana plasmática do parasito em microdomínios distintos às

mucinas sialiladas (ALMEIDA *et al.*, 1994; GAZZINELLI *et al.*, 1991; LANTOS *et al.*, 2016).

As mucinas constituem a família gênica mais heterogênea de *T. cruzi*, sendo composta por aproximadamente 850 genes ($\approx 6\%$ dos genes codificantes de *T. cruzi*) (AGÜERO *et al.*, 2000; CAMPO *et al.*, 2004; DI NOIA *et al.*, 1998). Elas são classificadas em três famílias: *TcMUC*, *TcSMUG* e TSSA, sendo as *TcMUC* e *TcSMUG* subdivididas em dois tipos de acordo com sua massa molecular e número de repetições em *tandem*, dentre outras características. Todas as mucinas possuem como elementos básicos uma sequência que codifica para um peptídeo sinal N-terminal, uma sequência C-terminal para ancoramento à GPI, e diversos resíduos de Ser e Thr. Além disso, cada classe de mucina possui características próprias, a saber:

- **Família *TcMUC***: Dispersas por todo genoma do parasito, essas mucinas chamam atenção por estarem em blocos genômicos contendo *TcTS* e *MASP*. A expressão gênica de tripanosomatídeos ocorre de forma policistrônica, o que indica que esses genes são expressos de forma coordenada, o que vai ao encontro da função biológica dessas proteínas. *TcMUC* são encontradas sobretudo durante a infecção no hospedeiro mamífero, sendo *TcMUC I* mais expressa pela forma amastigota e *TcMUC II* pela forma tripomastigota. Estruturalmente *TcMUC I* se diferencia pela presença de repetições em *tandem* compostas por oito Thr, uma Lys e duas Pro (motivo T₈KP₂) e uma curta região hipervariável, enquanto *TcMUC II* é produto de sucessivas mutações ampliando o tamanho da região hipervariável, e diminuindo o número de repetições em *tandem* (CAMPO *et al.*, 2004; DI NOIA *et al.*, 1996). Cada um desses tipos possui assinaturas específicas próprias para sinalização do peptídeo sinal e âncora GPI (DI NOIA *et al.*, 1998).
- **Família *TcSMUG* (do inglês *Small Mucin Gene family*)**: Essa família compreende aproximadamente 80 genes agrupados em repetições no genoma do parasito, e que são mais expressos nas formas epimastigotas. As *TcSMUG* são categorizadas em *TcSMUG-S* e *TcSMUG-L* em relação ao tamanho de seu RNA mensageiro (mRNA) (*L**arge* e *S**mall*). Possuem poucas diferenças entre si, contudo, o

fosfolipídio ao qual *TcSMUG* é ligada a GPI difere em epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos (URBAN *et al.*, 2011).

- **Família TSSA (do inglês *Trypomastigote Small Surface Antigen*):** Essa família é composta por genes cópia única, porém polimórficos entre as linhagens de *T. cruzi*. Por esta razão, a TSSA é descrita como um possível marcador sérico cepa-específico. Apesar da similaridade com as demais mucinas-*like*, essa proteína de ≈ 15 kDa, não possui região rica em Ser e Thr e possui função de adesina (BALOUZ *et al.*, 2015; DI NOIA *et al.*, 2002).

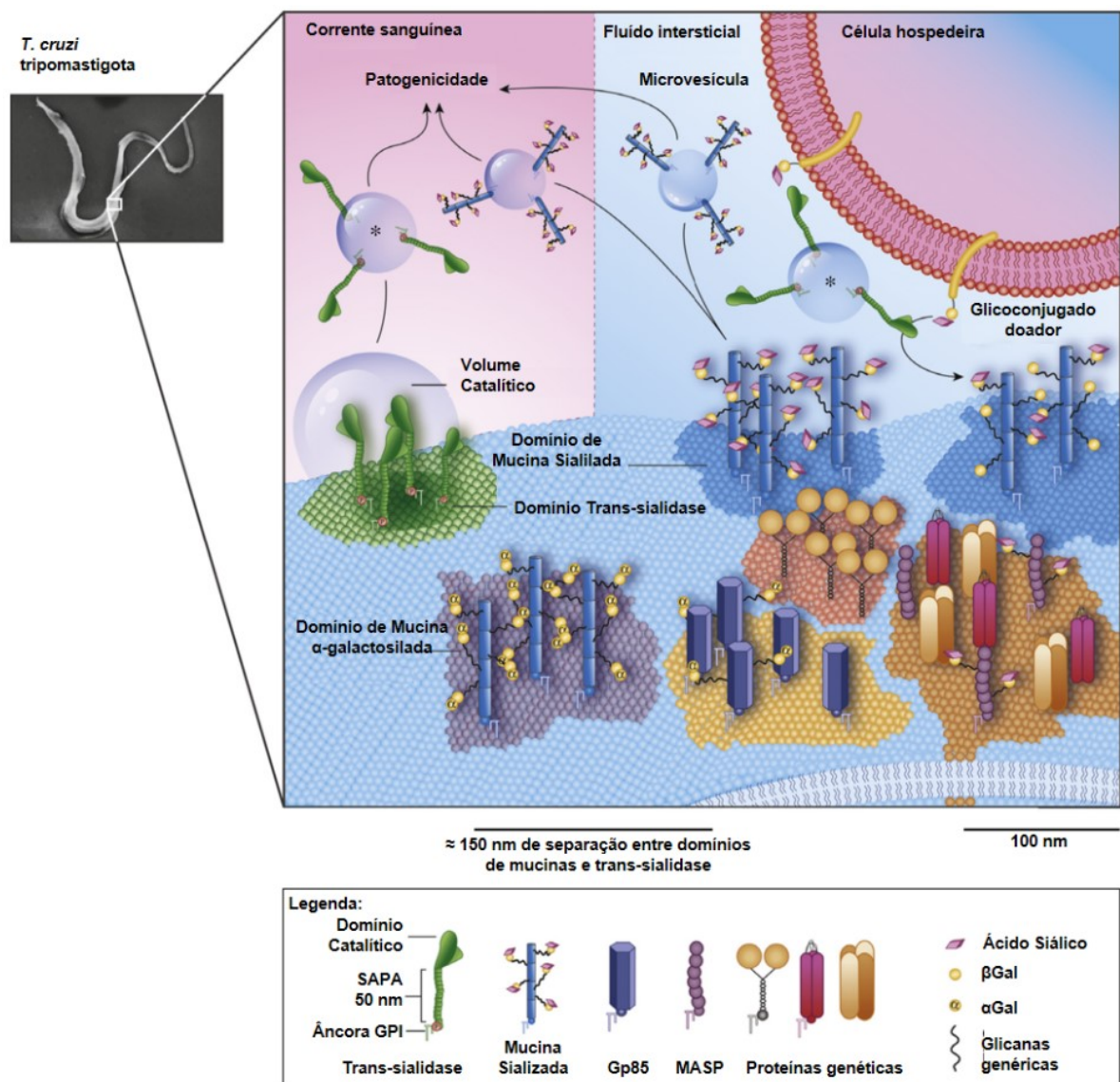
As mucinas *per se* são moléculas altamente heterogêneas devido a fatores como: (i) possuírem genes de diferentes tamanhos, (ii) apresentarem sequência aminoacídica hipervariável, (iii) possuírem padrão de glicosilação distintos (diferentes carboidratos em várias conformações e arranjos e (iv) serem diferencialmente expressas conforme a forma do parasito, tornando a superfície de *T. cruzi* um mosaico complexo.

Além das mucinas, há na superfície de *T. cruzi* as *TcTS*, MASP e diversas outras proteínas ancoradas à GPI e transmembrana. Para operacionalizar tamanha diversidade de moléculas de superfície, as *TcTS* e mucinas não estão dispersas aleatoriamente pela membrana. Recentemente, Lantos *et al.* (2016) verificaram que as glicoproteínas envolvidas na adesão e invasão do parasito estão dispostas em microdomínios formados por balsas lipídicas (LANTOS *et al.*, 2016; NOBLE *et al.*, 2014). As balsas lipídicas são um dos tipos de estruturas utilizadas para a compartimentalização da membrana plasmática. Composta por diferentes quantidades de esteróis, como o ergosterol, as balsas lipídicas são regiões da membrana plasmática onde a bicamada lipídica é mais espessa e rígida. As diferentes espessuras e composições lipídicas determinam quais os tipos de GPI são agrupados (como demonstrado na Figura 5B). Caso não houvesse compartimentalização celular, as reações bioquímicas levariam tanto tempo para ocorrer ao acaso, e praticamente nenhum processo biológico aconteceria (DAVIES; RIEPER; TUSZYNSKI, 2013; MARÍN; MARTÍN; SABATER, 2009). Dessa forma, a compartimentalização em organelas é importante para otimização dos processos citológicos.

Sabe-se também que diversos dos fatores de virulência de *T. cruzi* são dispersos no meio extracelular. As *TcTS* são liberadas na forma de proteínas livres, sendo a porção SAPA importante para estabilização e aumento da meia vida séria da

enzima (BUSCAGLIA *et al.*, 1999). Como a TcTS, outras glicoproteínas como gp90, gp85, MASP e mucinas foram identificadas em vesículas extracelulares. Dessa forma, as glicoproteínas do parasito interagem organizadas em diferentes estruturas (Figura 6) (BAYER-SANTOS *et al.*, 2013; GONÇALVES *et al.*, 1991; LANTOS *et al.*, 2016; NOGUEIRA *et al.*, 2015; TORRECILHAS *et al.*, 2020).

Figura 6 – Organização de mucinas e trans-sialidases na superfície de *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Adaptado de Mucci *et al.* (2017)

Com relação a função mucinas como fatores de virulência, pode-se sumarizar alguns dos papéis biológicos dessas glicoproteínas, associadas ou não ao Sia, como:

- a) Mucinas sialiladas impedem a opsonização por anticorpos anti- α -galactosil. Anticorpos anti- α -galactosil, presentes no soro de pacientes com Doença de Chagas são capazes de desestabilizar a membrana do parasito induzindo a lise em tripomastigotas de *T. cruzi* (independente de sistema complemento). Contudo, a presença de Sia interfere no reconhecimento destes anticorpos devido à carga eletronegativa dessa glicana, conferindo proteção ao parasito (ALMEIDA *et al.*, 1994; MORTARA *et al.*, 1992; PEREIRA-CHIOCCOLA *et al.*, 2000; TOMLINSON *et al.*, 1994a).
- b) Envolvimento de mucinas no processo de adesão e invasão celular. A mucina ao ser recoberta por Sia, não é mais reconhecida por anti- α -galactosil. Todavia, passa a ser reconhecida por outros anticorpos contra o epítipo Ssp-3, que impedem a invasão celular. Dessa forma, observa-se a direta associação do Sia e a entrada na célula do hospedeiro. Além disto, já foi demonstrado que mucinas purificadas de tripomastigotas de *T. cruzi* se ligam espontaneamente à membrana de cultura de células *in vitro*, e Sia é um importante elemento na interação no hospedeiro mamífero (SCHENKMAN; VANDEKERCKHOVE; SCHENKMAN, 1993; SCHENKMAN *et al.*, 1991; SCHENKMAN; DIAZ; NUSSENZWEIG, 1991b; TOMLINSON *et al.*, 1994b; YOSHIDA *et al.*, 1989).
- c) Ação anti-proteases. As mucinas possuem um papel protetor contra as proteases presentes no trato intestinal do inseto vetor, particularmente no estágio de epimastigotas (ACOSTA-SERRANO *et al.*, 2001; MORTARA *et al.*, 1992).
- d) Sinalização de Ca^{2+} intracelular. Mucinas podem desencadear mobilização de Ca^{2+} na célula hospedeira, processo que está associado aos estágios iniciais da invasão do *T. cruzi* (DORTA *et al.*, 1995; MORENO *et al.*, 1994; RUIZ *et al.*, 1998).
- e) Capacidade de indução de resposta pró-inflamatória. Foi descrita a indução da produção de citocinas como interleucina-12 (IL-12) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) a partir da interação de mucinas (em especial a âncora GPI) com receptores do tipo Toll-like 2 (TLR2) de macrófagos (ALMEIDA; GAZZINELLI, 2001; CAMARGO *et al.*, 1997).

1.4.2 Sialidases e mucinas-like de *Trypanosoma rangeli*

As mucinas e sialidases são descritas em outras espécies além de *T. cruzi*. Em *T. brucei* foi detectada a expressão de trans-sialidases ativas e de prociclinas, que são moléculas aceptoras de Sia em formas procíclicas do parasito, a qual possui diversas repetições dos motivos proteicos Gly-Pro e Gly-Pro-Gly-Gly-Thr. As formas tripomastigotas de *T. brucei* apresentam as VSG como principais glicoproteínas de superfície que atuam de forma distinta das mucinas (HICKS *et al.*, 2000; RODITI *et al.*, 1998).

Em *Leishmania major* e *Leishmania mexicana*, a proteofosfoglicana proveniente de formas promastigotas apresenta diversas semelhanças quanto a constituição de aminoácidos e glicanas com TcMUC. Com mais de 70% de sua massa molecular constituída de carboidratos, seu cerne é composto principalmente de resíduos Ser, Pro e Ala e possui diversos resíduos de Ser e Thr fosfoglicosilados (HICKS *et al.*, 2000; ILG *et al.*, 1996).

Em *T. carassii*, parasito de peixes de ciclo inteiramente extracelular e classificado na seção Salivaria, também foram descritas trans-sialidases ativas e mucinas, sendo expressas em formas tripomastigotas. As mucinas de *T. carassii* são caracterizadas pela alta presença de resíduos de Thr, Gly, Ser, Ala, Val e Pro e possuem, assim como as TcMUC a capacidade de receber Sia transferido por trans-sialidases (AGÜERO *et al.*, 2002; LISCHKE *et al.*, 2000).

Em *T. rangeli* foram descritas 120 cópias genes que codificam para uma enzima sialidase (*TrSA*) com 70% de identidade à TcTS. Todavia, constatou-se a completa ausência de atividade trans-glicosidase, mas alta atividade de hidrólise do Sia, superior à apresentada por *T. cruzi* e *T. brucei*, que possuem a dupla capacidade catalítica. Dessa forma, *T. rangeli* é capaz de remover Sia ligado à α 2-3-Gal, e com menor eficiência α 2-6-Gal, diferentemente de TcTS que reconhece apenas α 2-3-Gal (PONTES-DE-CARVALHO; TOMLINSON; NUSSENZWEIG, 1993).

Em relação à estrutura primária, a maior diferença em entre as enzimas dessas espécies é a ausência das repetições SAPA em *TrSA*. Entretanto, sabe-se que não altera a capacidade enzimática de TcTS (POLLEVICK *et al.*, 1991). Entretanto, com relação a estrutura terciária, a partir de análises por cristalografia foi possível identificar que o padrão de interação enzima-ligante é diferente entre TcTS e *TrSA*. Dentre as divergências descritas, em *TrSA* não há a formação de ligação de hidrogênio entre os resíduos Tyr³⁴² - Glu²³⁰ na presença do ligante, como ocorre em

TcTS. Assim, apesar da conservação de importantes resíduos como Tyr³⁴², responsável pela inatividade de TcTS (CREMONA *et al.*, 1995), a alteração em outros resíduos interfere na atividade trans-glicosidase em *T. rangeli*. (AMAYA *et al.*, 2003; BUSCHIAZZO; CAMPETELLA; FRASCH, 1997). Ensaio alterando 5 aminoácidos (Met⁹⁶-Val, Ala⁹⁸-Pro, Ser¹²⁰-Tyr, Gly²⁴⁹-Tyr e Gln²⁸⁴-Pro) em TrSA foram capazes de induzir atividade de transferência de Sia (PARIS *et al.*, 2005).

Essa incapacidade das TrSA em realizar a transferência de Sia para a membrana do parasito, tem sido estudada para a melhor compreensão da atividade das trans-sialidases de outras espécies e também na busca de novos fármacos ou vacinas visando a interrupção da atividade de TcTS (BUEREN-CALABUIG; PIERDOMINICI-SOTTILE; ROITBERG, 2014; PARIS *et al.*, 2005; PIERDOMINICI-SOTTILE; PALMA; ROITBERG, 2014). Estudos da expressão heteróloga de TcTS por *T. rangeli*, observaram o aumento na interação *in vitro*, apesar de ser significativamente inferior em relação a *T. cruzi*. Contudo, não foram observadas modificações na sobrevivência ou aumento de infectividade *in vivo*. Esses resultados indicam que a expressão da TcTS por *T. rangeli* foi capaz de alterar o padrão de interação parasito-célula, levantando a hipótese de que a participação de outras moléculas é requerida nesse processo (GRANUCCI; STOCO, 2013; SCHLINDWEIN; STOCO, 2014).

Com relação às mucinas-like em *T. rangeli*, Abate *et al.* (2005) descreveram a ausência de mucinas nessa espécie utilizando uma sequência completa de mucina de *T. cruzi* na busca por sequências ortólogas. Entretanto, Wagner *et al.* (2013) detectaram no estudo do proteoma de superfície de *T. rangeli*, a expressão de uma glicoproteína de 33 kDa similar à TcMUC em formas tripomastigotas, comprovando a presença e a expressão de mucinas em *T. rangeli*. Apesar da comprovação da existência de mucinas em *T. rangeli* por estudos proteômicos (WAGNER *et al.*, 2013) e genômicos de *T. rangeli* (STOCO *et al.*, 2014b), não há nenhuma informação quando a estrutura e função dessas moléculas no ciclo biológico de *T. rangeli*.

2 PREFÁCIO

A compreensão da biologia de *T. rangeli* é um curioso quebra-cabeças. Diferentes grupos de pesquisa buscaram elucidar o ciclo de vida do parasito ao longo dos mais de 100 anos da descrição da espécie, de acordo com suas expertises, tais como: análise filogenética, genômica, proteômica, interação parasito-hospedeiro mamífero e invertebrado, genômica reversa, dentre outras. E assim, constrói-se o conhecimento acerca desse parasito. Contudo, ainda permanecem em aberto questões importantes como a infectividade para mamíferos.

O fato de *T. rangeli* ser não-patogênico à mamíferos, mas filogeneticamente próximo a diversos tripanosomatídeos causadores de sérias doenças, elenca o *T. rangeli* como uma ferramenta de potencial biotecnológico para produção de antígenos, modelo de modificação de fatores de virulência e até mesmo veículo vacinal (BASSO; MARINI, 2015; BASSO; MORETTI; FRETES, 2014; GUPTA *et al.*, 2019; JERS *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2015; WHEELER; TYLER, 2011). Entretanto, sem a compreensão da infecção de *T. rangeli* em mamíferos, a utilização da espécie permanecerá estagnada por questões de segurança do processo de desenvolvimento e produção de um produto biotecnológico. Dessa forma, esta tese se propôs a contribuir com a elucidação do ciclo de vida de *T. rangeli* em hospedeiros mamíferos através de duas abordagens distintas, porém complementares.

No capítulo I, será descrita a abordagem de bioimagem *in vivo* e *ex vivo* na qual desenvolvemos um plasmídeo específico para a espécie, que expresse um repórter duplo visando estudar o curso de infecção em camundongos e a identificação do protozoário nos tecidos do hospedeiro. Desse modo, indica-se com precisão os sítios de maior concentração do parasito, guiando os estudos subsequentes desta tese e futuras aplicações para elucidação do ciclo de vida do parasito. Parte da execução experimental do capítulo I foi realizada durante o estágio do Programa Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE/CAPES – Edital 47/2017) na instituição *London School of Hygiene & Tropical Medicine* (LSHTM) sob supervisão do Professor John Kelly, com continuidade do trabalho no laboratório de Protozoologia - UFSC.

No capítulo II, aborda-se a função biológica das mucinas de *T. rangeli*. Visto que essas glicoproteínas exercem uma função essencial na promoção da infectividade em *T. cruzi*, sugere-se que as mucinas também exercem um importante papel nas interações do *T. rangeli* com seus hospedeiros, independente da atividade de trans-

sialidases. Assim, foi realizada a caracterização da influência da expressão de mucinas homólogas e heterólogas proveniente de *T. cruzi* por *T. rangeli* na interação parasito-hospedeiro, indicando a influência dessas glicoproteínas com elementos do sistema imune relacionados a eliminação do parasito, com suporte do conhecimento obtido e relatado no capítulo I.

CAPÍTULO I

Avaliação do tropismo tissular de *Trypanosoma rangeli* em mamíferos

3 OBJETIVOS I

Avaliar a infecção por *T. rangeli* através da expressão de sistema *dual-reporter* bioluminescente e fluorescente em modelo murino.

Objetivos específicos:

- I. Selecionar sequências do *loci* rRNA de *T. rangeli* para integração genômica por recombinação homóloga;
- II. Modificar o vetor pTRIX2 Luc::Neon por substituição das sequências de rRNA de *T. rangeli*;
- III. Analisar a eficiência de transfecção, homogeneidade da população transfectada e estabilidade da expressão dos genes luciferase e mNeonGreen;
- IV. Verificar a manutenção das características biológicas de *T. rangeli* expressando Luc::Neon;
- V. Avaliar a dinâmica *in vivo* de infecção de *T. rangeli* em camundongos BALC/c
- VI. Determinar a ocorrência de tropismo tissular de *T. rangeli* em mamíferos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CULTIVO DA FORMA EPIMASTIGOTA

As formas epimastigotas das cepas Choachí (SCHOTTELIUS, 1987) e SC58 (STEINDEL *et al.*, 1991) de *T. rangeli* e da cepa Y de *T. cruzi* foram cultivadas em meio *Liver Infusion Tryptose* (LIT) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Thermo Fisher Scientific) (ou 20% de SFB no caso da cepa SC58) com 10 U/ml de penicilina, 10 µg/ml de estreptomicina (Thermo Fisher Scientific) e mantidas a 27,5°C através de passagens a cada 4 dias.

Devido ao perfil de clonalidade inerente a essas espécies, todas as cepas selvagens e transfectadas utilizadas neste estudo foram constantemente submetidas à passagem cíclica em triatomíneos e camundongos. Para linhagens transfectadas, após a confirmação de integração, os cultivos foram mantidos sem antibiótico de seleção por período não superior a 15 dias, quando elevadas concentrações da droga foram adicionadas ao meio de cultivo, não gerando alterações nas taxas de crescimento.

Todas as linhagens utilizadas e geradas no presente estudo foram criopreservadas no Laboratório de Protozoologia (MIP/CCB/UFSC), que está incluído no Certificado de Qualidade em Biossegurança da UFSC (Nº101/99 CTNBio), sendo o laboratório habilitado para manuseio e geração de organismos geneticamente modificados.

4.2 EXTRAÇÃO DE DNA

Para extração de DNA genômico, formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento foram coletadas, lavadas três vezes com tampão fosfato salino (PBS - do inglês *Phosphate-buffered Saline*) pH 7,4 por centrifugação a 1.270 x g por 10 min a temperatura ambiente (TA). Após, foi adicionado aos parasitos 500 µl de tampão de lise (10 mM Tris-HCl pH 7,4; 10 mM NaCl; 25 mM EDTA pH 8,0; 1% Dodecil Sulfato de Sódio - SDS) e 0,1 µg/µl de proteinase K (Sigma-Aldrich) por 16 horas a 37°C. O DNA foi extraído pelo método de fenol/clorofórmio (GREEN; SAMBROOK, 2012) e tratado com 200 µg/ml RNase A (Sigma-Aldrich) por 1 h à 37°C. A pureza e a integridade do DNA foram avaliadas por espectrometria no equipamento

BioPhotometer (Eppendorf) por absorvância 260/280 nm e por eletroforese em gel de agarose 1% corados por 1 µg/ml brometo de etídeo, sendo o DNA extraído armazenado a - 20°C.

4.3 ADAPTAÇÃO DO VETOR pTRIX2-LUC::NEON-HYG

4.3.1 Busca de sequências do *locus* rRNA de *Trypanosoma rangeli*

As sequências de *T. rangeli* foram obtidas do banco de dados do Laboratório de Protozoologia e do Laboratório de Bioinformática da UFSC, cuja montagem do genoma é baseada na concatenação dos dados da publicação original (Stoco *et al.* 2014) com os dados gerados na plataforma PacBio (Pacific Biosciences), em colaboração com o Laboratório do Dr. Björn Andersson do *Karolinska Institutet*, Suécia.

Para a busca do *locus* de rRNA foi utilizada da sequência KJ742907 depositada no banco de dados Genbank como referência do gene 18S de *T. rangeli* (STOCO *et al.*, 2014b). A sequência completa do plasmídeo pTRIX2 Luc::Neon-Hyg foi gentilmente cedida por Costa *et al.* (2018) e utilizada como referência de sequência do promotor de rRNA de *T. cruzi* para busca e análise por similaridade.

Para o alinhamento local foi utilizado o pacote de ferramentas *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (NCBI) (ALTSCHUL *et al.*, 1990) e para os alinhamentos múltiplos globais, o plataforma *Clustal Omega* do *European Bioinformatics Institute* (EBI) (SIEVERS; HIGGINS, 2014).

4.3.2 Desenhos de iniciadores e clonagens *in silico*

A partir da análise do *locus* rRNA, foram selecionadas três sequências pertencentes a região não traduzida à montante do gene 18S para clonagem no vetor pTRIX2 Luc::Neon-Hyg. As diferentes combinações de clonagem dessas regiões deram origem aos vetores pTRIXrang, pTRIXrang2, pTRIXrang3 e posteriormente pTRIXrang4. Assim, para cada região foram desenhados iniciadores para as Reações em Cadeia da Polimerase (PCR – do inglês *Polymerase Chain Reaction*) visando à amplificação dos fragmentos desejados com a adição de sítios para enzimas de restrição nas extremidades dos *amplicons*. As sequências dos iniciadores estão disponíveis na Tabela 2.

Tabela 2 – Iniciadores utilizados para construção do vetor específico de *Trypanosoma rangeli*.

	Nome do iniciador	Sequência	Enzima de Restrição	Amplicon	Clonado em
insertos	rDNArangeli F	5' – ATTGAGAG GCTAGCG TGTGTCATTATCACCGCTC	<i>NheI</i>	1254 pb	pTRIXrang
	rDNArangeli R	5' – ACGAGAG GGCGCGCC GATGATCTTTTTTGTGGTTTCG	<i>AscI</i>		
	Promoter rangeli F	5' – ACTGTC GAGCTC GCTTTCTCTTGC GGACTG	<i>SacI</i>	837 pb	pTRIXrang2
	Promoter rangeli R	5' – GACATT GGATCCCC GCACCACACCAGCC	<i>BamHI</i>		
	Tr_rDNA F2	5' – ATTGAGAG GCTAGC CTGCTGTTGTTGTTGTTGTTG	<i>SacI</i>	696 pb	pTRIXrang3
	Tr_rDNA R2	5' – GGCGCGCC TGTATGTGCGTGCGCTTGGTG	<i>BamHI</i>		
	Tr_Intergenic II F	5' – ATCCAT GCTAGC GTCAACTACCAACAACCGATAATG	<i>NheI</i>	376 pb	pTRIXrang4
	Tr_Intergenic II R	5' – CTTGCT GGCGCGCC TTCTGAGGCATGCATGGCTAAG	<i>AscI</i>		
	Tr_Prom F_B	5' – TGCAAT GAGCTC CGTGTGTCATTATCACCGCTC	<i>SacI</i>	561 pb*	pTRIXrang4
	Tr_Prom R	5' – ACTTAG GGATCC GCAGTCCTCTCTCTTTTCAC	<i>BamHI</i>		
Tr_Prom F_A	5' – TGCAAT GAGCTC AAAAAATGGCTGGTGTGGTGC	<i>SacI</i>	1017 pb*		
vetor	Hygro F_PROTO	5' – GAATCCATGAAAAAGCCTGAACTCACC		1026 pb	gene Higromicina
	Hygro R_PROTO	5' – ACTAGTCTATTCCTTTGCCCTCGGAC			
	Hygro_500_Fw	5' – ACGACACCGTCAAGTGCCTCC		diferentes combinações	
	M13 R	5' – TCACACAGGAAACAGCTATGAC			
	RE9h F	5' – ATTTAAATATGGAGGACGCCAAGAACATC			
3'gapdh R	5' – AGGTTGTTCTGCAGCGTTG				
auxiliares	Tr_18S probe F	5' – GCATGGCTCATTACATCAGAC		594 pb	pJET
	Tr_18S probe R	5' – ACGAACCCTTTAACAGCAACAG			
	pJET 1.2 Forward	5' – CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC		ID	pJET
	pJET 1.2 Reverse	5' – AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG			
	S35	5' – AAATAATGTACGGGTGGAGATGCATGA		VALLEJO; GUHL; SCHAUB, 2009)	
	S36	5' – GGGTTCGATTGGGGTTGGTGT			
KP1L	5' – ATACAACACTCTCTATATCAGG				

ID: Inseto dependente; * produto formado com o iniciador Tr_Prom R. Sítios de restrição em negrito e itálico na sequência do iniciador.

Fonte: Autora.

Para avaliação de presença e ausência de sítios de restrição, foi utilizada a ferramenta *NEBcutter* V2.0 (VINCZE; POSFAI; ROBERTS, 2003). O desenho dos iniciadores foi realizado com auxílio dos programas *Primer Select* (DNASStar) e *FastPCR* (Primerdigital) (KALENDAR *et al.*, 2017). A síntese dos iniciadores realizada pela empresa *Integrated DNA Technologies (IDT)*. Através da plataforma *online Benchling® (Benchling)* foram realizadas as análises do perfil restrição e clonagens virtuais, bem como a edição dos mapas plasmidiais. Para a confecção final dos mapas foi utilizado o programa *Snappgene Viewer®* (GSL Biotech).

4.3.3 Amplificação das sequências gênicas

A amplificação dos insertos foi realizada por PCR contendo 50 ou 100 ng de DNA genômico da cepa SC58 de *T. rangeli*, 10 pmol de cada iniciador e mix do kit da enzima *Taq* DNA polimerase *Phusion Flash High-Fidelity®* (Thermo Fisher Scientific) conforme especificação do fabricante. As PCR foram realizadas em termociclador *Veriti®* (Applied Biosystems) com a seguinte programação: uma etapa de desnaturação do DNA a 98°C por 30 s; seguida de 35 ciclos de desnaturação (98°C por 10 s), ligação de iniciadores (58-62°C por 20 s) e extensão (72°C por 40 s), e etapa única de extensão à 72°C por 5 min.

Os produtos de PCR foram resolvidos em géis de agarose (1 a 1,5% de concentração), corados por brometo de etídio (1 µg/ml), visualizados sob fonte luz ultravioleta e fotografados digitalmente no equipamento *ChemiDoc* (Bio-Rad). Para as clonagens, os produtos de interesse foram excisados do gel de agarose e purificados utilizando o kit *QIAquick® Purification* (Qiagen) de acordo com as especificações do fabricante.

4.3.4 Clonagens

Foi utilizado o vetor pJET (Thermo Fisher Scientific) para as clonagens dos produtos de PCR, a saber: O volume de 1 µl do produto da PCR foi ligado à 50 ng do plasmídeo pJET na presença da enzima T4 DNA ligase e tampão de ligação (Promega), por 30 min a TA. Os produtos de ligação foram utilizados na transformação da bactéria *Escherichia coli* DH5α cálcio-competente que foram plaqueadas em meio Luria Bertani (LB) contendo 250 µg/ml de ampicilina e mantidas por 18 h a 37°C. As colônias transformantes foram selecionadas de acordo com presença do inserto de massa molecular esperado, verificado por PCR utilizando os iniciadores pJET1.2 F e

pJET1.2 R que se ligam na região flanqueadora do sítio múltiplo de clonagem. Os clones positivos foram selecionados para extração de DNA plasmidial com kit *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen). Os plasmídeos gerados foram sequenciados pelo método de Sanger para confirmação da sequência da DNA. A análise do sequenciamento foi realizada pela ferramenta de alinhamento de sequências da plataforma *Benchling*, utilizando a sequência teórica obtida da clonagem *in silico* contra o eletroferograma obtido do sequenciamento (utilizando o algoritmo MAFFT e configuração padrão da plataforma) (KATOH; STANDLEY, 2013).

Para subclonagem, aproximadamente 15 µg de DNA plasmidial foram clivados com 20 U enzima de restrição correspondente aos sítios de restrição introduzidos nas sequências dos insertos conforme descrito na Tabela 2. Da mesma forma, foram removidas as sequências de rRNA de *T. cruzi* presentes do plasmídeo pTRIX2-Luc::Neon-Hyg. Após a digestão completa dos vetores, os produtos das restrições foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% para excisão e purificação dos fragmentos de interesse utilizando o kit *QIAquick® Purification* (Qiagen). Os fragmentos purificados foram ligados nos vetores de expressão com enzima T4 DNA ligase utilizando a proporção inserto:vetor de 3:1 em 20 µl de reação, por 30 min a TA. As reações de ligação foram integralmente utilizadas na transformação de *E. coli* DH5α cálcio-competentes e as colônias resultantes foram triadas por PCR, diretamente das colônias, utilizando os iniciadores do inserto de interesse (Tabela 2). As colônias que apresentaram plasmídeos recombinantes tiveram seu DNA plasmidial extraído e novamente verificado por sequenciamento.

4.4 DETERMINAÇÃO DE IC₅₀ DO ANTIBIÓTICO DE SELEÇÃO

Em placa de 96 poços, foi realizada diluição seriada (fator de diluição 2) de Higromicina B (Hyg – do inglês *hygromycin*) (Thermo Fisher Scientific), considerando a concentração inicial de 8 mg/ml (15,18 mM) em meio LIT 10% SFB. De cada linhagem testada, foi coletada a quantidade de cultivo de epimastigota referente a $1,5 \times 10^6$ parasitos por poço do ensaio. Os cultivos foram lavados duas vezes por centrifugação em PBS pH 7,4 a $1.270 \times g$ por 10 min, suspensos em meio LIT com 10% SFB e distribuídos na placa contendo antibiótico para (volume final de 200 µl). Controle positivo: parasitos não tratados com Hyg. Controle negativo: poços sem parasito (controle de não contaminação). O ensaio foi incubado a 27,5 °C por 72 h.

Após, foi adicionado 20 µl da solução 250 µg/ml Alamar Blue sob condições estéreis e incubado a 37 °C por 4 h. A leitura de fluorescência foi realizada na multileitora de placas TECAN (excitação 530 nm / emissão 590 nm) (LAMEB/UFSC). Com aquisição dos dados com ganho ótimo e ganho fixo (obtido de experimentos anteriores para comparação de replicata biológica).

A análise dos dados foi realizada no programa *GraphPad Prism* 8.4.0. Utilizando os parâmetros concentração em Log[µM]; normalização dos dados em função de atividade da droga. Na qual, o maior valor de fluorescência obtido do controle positivo corresponde a 0% de atividade de Hyg e menor fluorescência obtida da maior concentração de droga corresponde a 100% de atividade; Regressão não linear (*log(inhibitor) vs. normalized response -- Variable slope*). Para cálculo de IC₉₀, foi utilizada a ferramenta *on line Quick Calcs GraphPad Prism* (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/chemMenu/>) (SEBAUGH, 2011). Os ensaios foram realizados em triplicata técnica e duplicata biológica.

4.5 TRANSFECCÃO

Para o procedimento de inserção do DNA recombinante nos parasitos, 10 µg do plasmídeo pTRIXrang (e suas versões) foram digeridos com 20 a 40 U das enzimas de restrição *SacI* e *Ascl* (NEB – do inglês *New England Biolabs*) para remoção da maquinaria de replicação plasmidial. Após a completa digestão, os produtos das restrições foram submetidos a eletroforese e a banda correspondente às sequências compreendidas entre os braços de homologia de rRNA de *T. rangeli* (5,8 kb) foram excisadas e purificadas com kit *QIAquick® Purification* (Qiagen). O produto purificado foi quantificado no espectrofotômetro *Picodrop* (Picodrop) no comprimento de onda de 260 e 280 nm. O volume e quantidade de DNA foram ajustados para a obtenção 3 a 5 µg de DNA em 20 µl de água ultrapura e incubados à 72°C por 20 min (valores correspondentes para uma transfecção).

Entre 20 a 24 h antes da transfecção, cerca de 1×10^8 epimastigotas de *T. rangeli*, provenientes de cultivo em meio LIT, foram tratadas de 20 mM de hidroxauréia (HU) para sincronização do ciclo celular dos parasitos (OLMO *et al.*, 2018). Após a sincronização, os parasitos foram lavados duas vezes em PBS pH 7,4 por centrifugação a 1.270 x g por 10 min e suspensos brevemente em 190 µl de tampão Tb-BSF (90 mM Na₂HPO₄ pH 7,3; 5 mM KCl; 50 mM Hepes 7,3; 150 µM CaCl₂)

juntamente com o plasmídeo linearizado, e então, transferidos para cubetas de eletroporação de 0,2 cm (Bio-Rad). A mistura foi submetida à eletroporação em pulso único utilizando o programa X-014 do equipamento *Nucleofector® II* (Lonza) (OLMO *et al.*, 2018; PACHECO-LUGO *et al.*, 2017). Após a transfecção, os parasitos foram adicionados em 3 ml de meio NNN (Neal, Novy e Nicolle)+LIT com 20% SBF e incubados a 27,5°C. Após 24 h, foi realizada diluição seriada dos parasitos transfectados em placa de 24 poços, utilizando 500 µl de parasitos por linha da placa ($\approx 1 \times 10^7$) contendo 20% SFB e 50% de meio NNN+LIT condicionado (meio previamente utilizado no cultivo de parasitos) (ARCHER, 2009). Quatro concentrações do antibiótico de seleção Hyg foram escolhidas de acordo com o valor de IC₅₀ da droga para cada cepa. As placas de diluição foram seladas com fita microporosa e incubadas a 27,5°C em estufa úmida. Semanalmente, as placas foram observadas a olho nu quanto à turbidez e ao microscópio para avaliação da morfologia, mobilidade e expressão de Neon pelos parasitos.

Os parasitos transfectados, mas não utilizados na diluição seriada (1 ml remanescente) foram mantidos em meio NNN+LIT com 50 µg/ml por duas semanas. Após, a concentração de Hyg foi abruptamente elevada para 1 mg/ml para cepa Choachí e 2 mg/ml para SC58 (*backup*).

4.6 AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO DE LUC::NEON

4.6.1 Fluorescência direta

Ao longo do período de seleção, os parasitos transfectados foram visualizados semanalmente em microscópio de fluorescência (Olympus Bx40–FL e IX83 – LAMEB/UFSC) quanto a expressão de Neon (excitação 506 nm / emissão 517 nm) (SHANER *et al.*, 2013). As fotomicrografias foram registradas com câmera digital através do programa *CellSens Dimension 1.12* (Olympus) e as análises realizadas no programa *ImageJ* (NIH).

4.6.2 Citometria de fluxo

Para a determinação da porcentagem da população de parasitos expressando a proteína fluorescente, foram realizados ensaios de citometria de fluxo utilizando o equipamento *FACS Canto II* (BD Bioscience) (LAMEB/UFSC). Para esta análise, 100 µl do cultivo de epimastigotas foram adicionados a 1 ml de PBS pH 7,4 filtrado e

aconicionados em tubos acrílicos próprios para utilização no equipamento descrito. Para cada amostra, foram adquiridos no mínimo 20.000 eventos com laser de argônio (488 nm) e filtros de emissão FITC (515-545 nm) e PerCP (670-735 nm).

A análise dos dados foi realizada no programa *FlowJo X 10.0.7r2* (Tree Star). E os dados gráficos estão demonstrados na forma de histograma de número de células (normalizado pelo eixo Y) pela intensidade de fluorescência FITC-A. O valor de intensidade de fluorescência foi obtido da mediana de FITC-A.

4.6.3 Avaliação de atividade de luciferase *in vitro*

4.6.3.1 Ensaio com formas epimastigotas

Para ensaios *in vitro* de atividade de luciferase, foi utilizado o kit *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega), gentilmente cedido por Prof. Dr. Daniel Mansur, com modificações, a saber: A quantidade equivalente a 2×10^6 parasitos de cada linhagem foram coletadas e centrifugadas a $1.270 \times g$ por 10 min. Os epimastigotas foram lavados em PBS pH 7,4 e após a centrifugação, o PBS foi retirado por pipetagem para completa remoção do tampão. Os parasitos foram homogeneizados em 20 μ l do reagente diluído *Passive Lysis Buffer* e incubados por 15 min a TA. Durante a incubação, 50 μ l o reagente *Luciferase Assay Reagent II* (LAR II) foram distribuídos nos poços de ensaio, executado em triplicata, em placa branca de 96 cavidades. Após a incubação, 10 μ l do lisado foram adicionados aos poços do ensaio e imediatamente a luminescência foi quantificada na multileitora de placas TECAN (LAMEB/UFSC). Os dados de luminescência total foram registrados, assim como os dados de fluorescência obtidos com os filtros Green1 (510 a 580 nm) e Magenta (400 a 450 e 600 a 650 nm) para certificação do comprimento de onda esperado para *Red-Shifted Photinus pyralis luciferase* (*PpyRE9h*) que possui pico de emissão em 617 nm (MCLATCHIE *et al.*, 2013).

4.6.3.2 Ensaio com formas tripomastigotas sanguíneas

Para quantificação dos parasitos circulantes na corrente sanguínea de camundongos experimentalmente infectados, foram coletados diariamente 5 μ l de sangue proveniente de corte da ponta da cauda, e homogeneizados em 20 μ l de *Passive Lysis Buffer*. A mistura foi incubada por 15 min a TA e armazenada a -20°C até último dia do experimento. Ao final, todas as amostras coletadas foram analisadas em duplicata técnica de quatro camundongos infectados, seguindo o protocolo

descrito no tópico anterior. Como controle, foi utilizada amostra de sangue de camundongo não infectado.

4.7 AVALIAÇÃO DE INTEGRAÇÃO GENÔMICA

4.7.1 PCR

Para verificação da inserção do cassete de expressão pTRIXrang no genoma dos parasitos, foi realizada PCR com a *Taq* DNA polimerase *GoTaq Master Mix* (Promega). Foram adicionados à reação 100 ng de DNA genômico e 10 pmol dos iniciadores Hygro F_PROTO e 18S *probe* R. A reação da PCR foi realizada no termociclador *Veriti*[®] (Applied Biosystems) com programa: desnaturação do DNA a 95°C por 5 min; seguido de 35 ciclos para desnaturação (94°C por 60 s), ligação dos iniciadores (58°C por 30 s) e extensão (72°C por 3 min), e extensão final a 72°C por 10 min. A análise dos produtos amplificados foi realizada por eletroforese em gel de agarose, conforme descrito no tópico 4.3.3.

4.7.2 Southern Blot

A conferência da inserção do cassete no genoma de *T. rangeli*, foi também realizada através de hibridização de DNA marcado com peroxidase, conforme descrito por Southern (1975), com modificações. Para tal, foi extraído 80 µg de DNA genômico de cada linhagem transfectada e suas respectivas cepas parentais, como descrito no item 4.2. O DNA foi digerido com 60 U de enzima de restrição *Bam*HI a 37°C por 18 h. O produto de digestão foi submetido a separação eletroforética em gel de agarose 0,8% em tampão TBE (890 mM Tris, 890 mM Ácido Bórico, 20 mM EDTA) e submetido à corrente de 20 V por aproximadamente 6 h, juntamente com marcador de massa molecular 1 kb *Ladder* (NEB). Após, o gel foi corado com brometo de etídio e fotografado ao lado de régua fluorescente como padrão de escala. Na sequência, o gel foi imerso em uma solução de 250 mM HCl (solução de depurinação) por 12 min; lavado em água ultrapura por ≈2 min e em seguida adicionada a solução contendo 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH (solução de desnaturação) por 25 min. Após, o gel foi lavado em água ultrapura e adicionada solução com 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris pH 7,5 (solução de neutralização) por 30 min. Todas as etapas de incubação do gel foram realizadas sob agitação leve. O DNA clivado foi transferido para membrana de Nylon (Sigma-Aldrich)

por capilaridade promovida por diferença de concentração da solução SSC 20x (3M NaCl, 300mM Na₃C₆H₅O₇ pH 7) por 18 h (SOUTHERN, 1975).

Para obtenção das sondas, foi utilizado o produto da amplificação gerado pelos iniciadores 18S *probe* F e 18S *probe* R com o plasmídeo 18Sprobe_pJET como DNA molde, gerando a sonda “18S”. Para produção da sonda “Hyg”, os iniciadores Hyg 500 Fw e Hyg_PROTO R e o plasmídeo pTRIXrang4 foram empregados como iniciadores e DNA molde, respectivamente. Após a amplificação dos produtos, foi executado o protocolo preconizado pelo fabricante do kit *ECL Gold Hybridization Buffer* (GE Healthcare) para a marcação das sondas com enzima peroxidase.

Após a transferência, o DNA foi fixado à membrana no equipamento *UV Cross Linker* (GE Healthcare) com configuração de luz ultravioleta de 1200 J. A seguir, a membrana foi hibridizada com 250 ng de cada sonda marcada. Para detecção do sinal luminescente foi utilizado filme radiográfico exposto à membrana por 2 h e revelado no processador de filme radiográfico SRX-101A (*Konica Minolta Medical & Graphic, INC* – China).

4.8 CURVA DE CRESCIMENTO

Para avaliação das taxas de replicação, formas epimastigotas das linhagens transfectadas e parentais foram cultivadas por meio NNN+LIT por no mínimo 7 dias. Desse cultivo, foram coletados 2x10⁶ parasitos/ml e transferidos a tubos cônicos de centrifugação de 15 ml contendo meio LIT com 10% SFB (ou 20% de SFB no caso da cepa SC58), ajustando o volume final para 4 ml. Diariamente, foram coletadas alíquotas de até 20 µl de cada cultivo e realizada diluições (1:20, 1:50 ou 1:100). Através de contagem em câmara de Neubauer foi determinada a concentração dos parasitos cultivados. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados foram analisados no programa *GraphPad Prism* 8.4.0. para análise estatística e confecção dos gráficos.

4.9 INFECÇÃO INTRACELÔMICA

Foram utilizados os triatomíneos provenientes do insetário do Laboratório de Protozoologia/UFSC, mantidos a temperatura de 26°C, umidade relativa de 65% e alimentados quinzenalmente com camundongos Swiss (Biotério Central/UFSC)

sedados com cetamina e xilazina (15 mg/kg + 150 mg/kg), acordo com protocolos aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC) (Protocolo 9923170516).

A infecção intracelômica foi realizada com epimastigotas das cepas Choachí pTRIXrang e Choachí selvagem cultivadas em meio LIT, lavadas três vezes em PBS e homogeneizadas em meio LIT com 10% SFB. O volume de cultivo foi ajustado para obtenção de 15×10^6 parasitos/ml. Essa solução foi inoculada em 30 ninfas de 4º a 5º estágio de *R. prolixus*, por grupo experimental, através injeções de aproximadamente 10 µl com seringa *BD ultra fine II* (calibre G31) entre a divisão dos esternitos, junto ao conexivo mais próximo da coxa posterior (JURBERG *et al.*, 2014). Após 8 semanas da infecção, a hemolinfa e glândulas salivares foram observadas quanto a morfologia, motilidade e fluorescência dos parasitos. Para aquisição de imagens, a hemolinfa e glândulas salivares foram dispostas em placa de 24 poços, mantidas úmidas com PBS e fotografadas no microscópio investido Olympus IX83 através do programa *CellSens Dimension 1.12* (Olympus).

4.10 DIFERENCIAÇÃO *IN VITRO* DE *Trypanosoma rangeli*

Para obtenção *in vitro* de formas tripomastigotas de *T. rangeli*, foi seguido o protocolo de Koerich *et al.* (2002), com modificações. Um total de $1,2 \times 10^8$ formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento foram lavados duas vezes em PBS pH 7,4 por centrifugação a $1.270 \times g$ por 10 min a TA. Posteriormente, os parasitos foram cultivados em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) pH 8,0; 5% SFB e 6 mM de L-glutamina (Thermo Fisher Scientific) por 8 dias a 27,5°C em garrafas de cultura de 25 cm². Transcorrido o período de incubação, os parasitos foram corados com Giemsa (Merck) e visualizados em microscópio óptico para determinação da porcentagem de parasitos diferenciados em tripomastigotas (KOERICH *et al.*, 2002). Dessa forma, foram considerados aptos para os experimentos taxas de diferenciação superiores a 85% para cepa Choachí e 70% para cepa SC58.

Para registro da fluorescência direta, os parasitos foram lavados em PBS e colocados sobre lamínulas circulares de 13 mm, dispostas em placas de 24 poços. Após 20 min, os parasitos foram fixados com 2% de paraformaldeído em PBS, sendo os poços lavados após 20 min com 500 µl de PBS. Na sequência, os parasitos foram corados com 50 µl de DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol) a 1 µg/ml por 5 min, sendo as

lamínulas lavadas brevemente em PBS e água ultrapura e dispostas sobre lâminas com meio de montagem *Hydromount* (National Diagnostics).

4.11 INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGO

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c, entre 4 a 9 semanas de idade, provenientes do Biotério Setorial do MIP, onde os animais foram mantidos em caixas de contenção ventiladas, com acesso à água e alimento *ad libitum*. Os experimentos seguiram os protocolos aprovadas pela CEUA-UFSC (Protocolo de autorização 9923170516).

Para as infecções em camundongo, foram utilizados tripomastigotas diferenciados *in vitro*, como descrito no tópico anterior. A quantidade referente a 1×10^7 tripomastigotas/animal foi centrifugada e homogeneizada em PBS. A infecção foi realizada por injeção intraperitoneal (i.p.) de 200 μ l da suspensão de parasitos no quadrante inferior esquerdo.

4.11.1 Observação direta de parasitos no sangue (Método Pizzi-Brener)

A parasitemia dos camundongos infectados foi avaliada diariamente por exame à fresco do sangue a partir das 6 h da infecção. Para isso, os camundongos foram alocados em caixa de contenção com a cauda exposta para o manipulador. Por secção da ponta da cauda, foi coletado 5 μ l de sangue e aplicado em lâmina. Imediatamente, foi disposta uma lamínula 22 x 22 mm sobre o sangue, deixando espalhar naturalmente a amostra.

Em microscópio, sob objetiva de 40x, foram contatos os parasitos presentes em 50 campos uniformemente distribuídos pela lamínula. As contagens foram realizadas em todos os animais de cada grupo diariamente até que a parasitemia não fosse mais detectável por três dias seguidos.

Para o cálculo do número de parasitos por mililitro, foi utilizada a fórmula descrita por Castro *et al.* (2000), sendo utilizado o fator de correção $51,33 \times 10^4$ para todas as contagens deste trabalho, com base nos parâmetros: área do campo 40x = 0,18857 mm; área da lamínula = 484 mm, fator de correção volume por ml = 200 e n' = média de parasitos em 50 campos.

$$n'' = n' \cdot \left(\frac{\text{Área da lamínula}}{\text{Área do campo}} \right) \cdot 200 = n' \cdot 51,33 \times 10^4 = n \text{ parasitos/ml}$$

A análise dos dados foi realizada no programa *GraphPad Prism* 8.4.0 e os resultados expressos na forma de média e erro padrão.

4.11.2 Bioimagem *in vivo* e *ex vivo*

Nos pontos experimentais determinados para a análise *in vivo*, foi administrado 150 mg/kg d-luciferina (Thermo Fisher Scientific) por via i.p. Após 2 min, os animais foram anestesiados com Cetamina (100 mg/kg) e Xilasina (10 mg/kg) por via i.p. Após aproximadamente 10 min, os animais foram posicionados no interior no equipamento *IVIS Lumina II* (Perkin Elmer) e as imagens capturadas e analisadas pelo programa *Living Image* 3.1 (CBiot/UFRGS). Configurações de aquisição: Controles não tratados F/Stop 1, *Binning Large*, *Exposure time* 5 min. Camundongos infectados: F/Stop 1, *Binning Medium*, *Exposure time* 2 min, seguido de uma segunda aquisição, F/Stop 1, *Binning Large*, *Exposure time* 5 min. Para cada animal foram adquiridas imagens de luminescência e fotografia na posição ventral e dorsal.

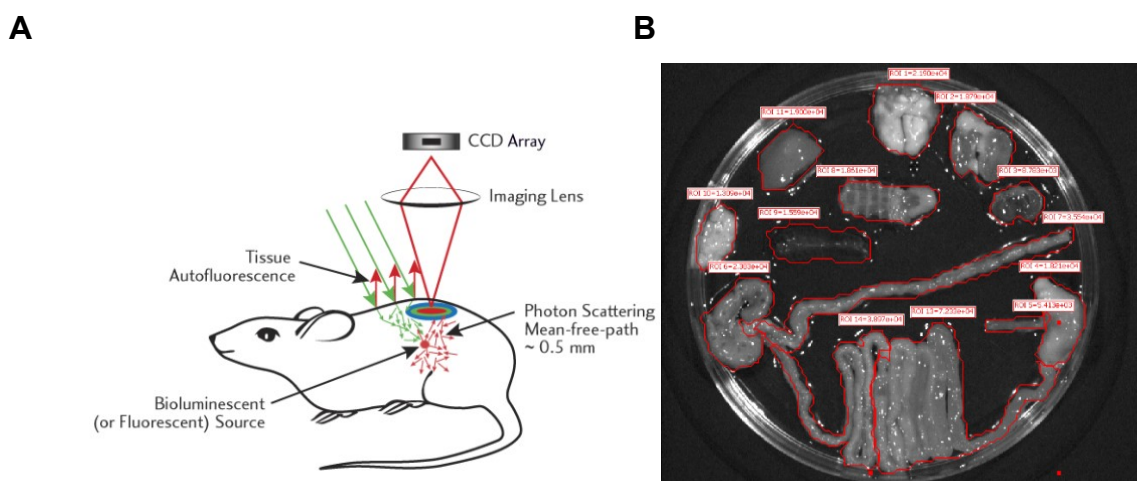
De acordo com experimentos de curva de parasitemia, foram estabelecidos quatro momentos para avaliação *ex vivo*, nos quais o reagente análogo de timidina 5-etinil-20 deoxiuridina (EdU), foi administrado para análise de parasitos em replicação (WARD *et al.*, 2020). Nesses pontos experimentais, após 1 h da aquisição *in vivo*, o substrato d-luciferina foi novamente injetado i.p. (150 mg/kg), aguardado 2 min para circulação do substrato e então os animais foram anestesiados. A eutanásia dos animais foi realizada por punção cardíaca, seguida de perfusão com 10 ml de 0,3 mg/ml de d-luciferina em PBS. Os órgãos, tecidos e carcaças foram dispostos em placa de Petri embebidos em solução de perfusão. A luminescência foi registrada pelo equipamento *IVIS Lumina II*, seguindo a configuração: F/Stop 1, *Binning Large*, *Exposure time* 5 min (protocolo detalhado cedido por Dr^a. Amanda Francisco em comunicação pessoal) (COSTA *et al.*, 2018).

A luminescência *in vivo* foi quantificada estabelecendo iguais regiões de interesse (ROI – do inglês *regions of interest*). O valor de luminescência total foi obtido a partir da soma da quantificação ventral e dorsal e expresso em flux total (p/s). A luminescência *ex vivo* foi mensurada a partir de ROI definido pela imagem de cada órgão (*free draw ROI*) e analisada através de medida de intensidade de luminescência em radiância (p/s/cm²/sr) dos animais infectados em razão da mesma medida dos animais controles. Para a quantificação da luminescência o programa de *Living Image*

3.1 foi utilizado e análise estatística e os gráficos obtidos com o programa *GraphPad Prism* 8.4.9 (LEWIS *et al.*, 2014; TAYLOR *et al.*, 2019).

Figura 7 – Método de bioluminescência *in vivo* e *ex vivo*.

A) Ilustração do método de detecção de bioluminescência *in vivo*. B) Imagem representativa da determinação de ROI dos órgãos no programa *Living image* 3.1. Na imagem as regiões analisadas são demonstradas pela área compreendida no interior da delimitação em vermelho, com identificação “ROI#” e valor de luminescência (p/s).



Fonte: Manual IVIS Lumina II e Autora.

4.12 HISTOLOGIA FLUORESCENTE

Para analisar a presença de parasitos, amostras histológicas fluorescentes foram obtidas de dois experimentos independentes, sendo um deles aliado à bioimagem *ex vivo*. No experimento independente de bioimagem, no 1º e 14º dia de infecção, dois camundongos dos grupos infectados com pTRIXrang foram eutanasiados por anestesia profunda e exsanguinados por punção cardíaca e os seguintes órgãos ou tecidos coletados: esterno, timo, coração, esôfago, pulmão direito, faringe/traqueia, fígado, rim direito, mesentério (incluindo os linfonodos), estômago, duodeno, íleo, ceco, cólon, pele (ponto de inoculação), baço (porção central), membrana peritoneal, tecido adiposo gonadal (gordura branca), tecido adiposo inguinal (gordura bege), tecido adiposo interescapular (gordura marrom), músculo esquelético e cérebro. No experimento guiado por luminescência, os órgãos foram selecionados de acordo com o sinal detectado, podendo variar entre indivíduos

e pontos experimentais. Independente de sinal, pulmão e baço foram coletados em todos os tempos.

Para o processamento das amostras histológicas, foi seguido o protocolo descrito por Costa *et al.* (2018), a saber: os tecidos foram dispostos em cassetes sob plástico fosco e imersos em etanol 95% por 24 h a 4°C. Após, os tecidos foram desidratados com etanol 100% por 1 h, sendo realizadas quatro trocas da solução nesse período. Após, os cassetes foram submersos em dois banhos de xileno por 12 min para clarificação. Todos os procedimentos descritos foram realizados a 4°C, ao abrigo de luz e com soluções previamente resfriadas a 4°C. Para emblocamento, os cassetes foram embebidos em parafina por 12 min a 65°C, duas vezes. Então, transferidos para recipiente de ambientação no equipamento emblocador Leica EG1150H (LAMEB/UFSC). Os cortes foram realizados em micrótomo Leica, com espessura de 5 a 7 µm e dispostos em lâmina de vidro. Os cortes histológicos foram secos em temperatura ambiente por 18 h e, então, armazenados a 4°C.

Anterior a análise por microscopia, as lâminas foram desparafinadas em xileno por 1 min (duas trocas de solução), seguida de três banhos de etanol 95% e três banhos de TBS (50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl pH 7,5) por 1 min cada em soluções previamente resfriadas. Após, as lâminas foram incubadas em solução 1 µg/ml DAPI por 5 min, montadas com meio *Hydromount* (National Diagnostics) e cobertas com lamínula 24x50 mm (Olen-KASVI) (COSTA *et al.*, 2018; NAKAGAWA *et al.*, 2015; TAYLOR *et al.*, 2019).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DESENVOLVIMENTO DO VETOR ESPECÍFICO DE *Trypanosoma rangeli*

Os tripanosomatídeos, assim como os demais eucariotos, expressam seus genes através de três diferentes tipos de RNA polimerases (RNA pol), a saber: RNA pol I, que promove a expressão do RNA ribossomal (rRNA); RNA pol II, que transcreve todos os genes codificantes e RNA pol III que expressa pequenos RNA como o RNA transportador (tRNA) e outros RNA de função específica (BEVERLEY, 2003; MARTÍNEZ-CALVILLO *et al.*, 2010). Dessa forma, as sequências que compõem um plasmídeo determinam por qual RNA pol o cassete será transcrito; seja através da sequência de promotor que o próprio vetor possui, seja pelas regiões intergênicas que serão utilizadas para a recombinação homóloga, e que levam à inserção do cassete em um *locus* sob o controle de uma dessas RNA pol.

Devido a importância da função do rRNA de constituir as subunidades ribossomo e, portanto, toda a expressão proteica depende da disponibilidade desse rRNA na célula, os promotores reconhecidos por RNA pol I são extremamente fortes e de expressão constitutiva (LEE; VAN DER PLOEG, 1997). Assim, desenvolver um plasmídeo que seja expresso por RNA pol I é a melhor opção para os estudos que requerem a expressão de proteínas em qualquer condição e em grande quantidade. Por essa razão, a maior parte dos plasmídeos para *T. cruzi* possuem sequências oriundas de regiões intergênicas do *locus* rRNA, levando à integração do cassete para esse *locus* e/ou o recrutamento da RNA polimerase I. A forte expressão do gene de interesse, é requisito primordial para estudos que utilizam genes repórteres para detecção de organismos ou identificação de suas funções. Desse modo, para a finalidade a que se propõe o desenvolvimento deste plasmídeo – detectar a presença de *T. rangeli* no hospedeiro mamífero com elevada sensibilidade –, é necessário a máxima expressão sem comprometer a biologia do parasito. Logo, possuir as sequências que levem a integração no *locus* rRNA do próprio parasito é a melhor opção para essa ferramenta.

A sequência do *locus* rRNA de *T. rangeli* já havia sido descrita na publicação do genoma desse parasito (STOCO *et al.*, 2014b). Contudo, agora está disponível uma versão do genoma com melhor cobertura, especialmente em relação a sequências como as de rRNA que são flanqueadas por regiões repetitivas. Assim foi

possível definir que *T. rangeli* possui 13 *loci* rRNA (com base no genoma da cepa SC58), e cuja organização se mantém sintênica com dos demais tripanosomatídeos (STOCO *et al.*, 2014a). Apesar da montagem da nova versão do genoma não estar finalizada, alguns *loci* foram identificados em diferentes *scaffolds*. Assim, é possível que os *loci* rRNA estejam distribuídos em mais de um cromossomo, ampliando as possibilidades de integração do cassete.

Apesar das RNA polimerases de *Trypanosoma* spp. possuírem características em comum com as de outros organismos, ainda não foi possível determinar as sequências consenso dos promotores em tripanosomatídeos de forma automática e confiável, uma vez que, o reconhecimento do promotor de RNA pol I é realizado pela estrutura secundária que o DNA assume (SMIRCICH; DUHAGON; GARAT, 2015). Tendo em vista essas dificuldades – delimitar com precisão uma sequência primária como o promotor –, foram selecionadas três sequências em um fragmento de 2,6 kb compreendido entre a região repetitiva e o início do gene 18S de *T. rangeli* como demonstrado na Figura 8. Essas regiões obtidas do DNA da cepa SC58 foram clonadas no vetor pTRIX2-Luc::Neon-Hyg em diferentes combinações entre si ou com elementos já presentes no plasmídeo, formando os plasmídeos pTRIXrang, pTRIXrang2 e pTRIXrang3.

Após a confirmação das sequências corretamente clonadas, transfecções piloto foram executadas nas cepas Choachí e SC58 de *T. rangeli*. A combinação das sequências que deu origem ao plasmídeo pTRIXrang3, induziu a expressão de Luc::Neon. Entretanto de forma instável, pois após duas semanas os parasitos não possuíam mais fluorescência. Contudo, ainda possuíam os genes Luc::Neon fusionados e o gene de resistência à Hyg íntegros (dados não mostrados). Dessa forma, compreende-se que a RNA pol I reconhece a sequência denominada Intergênica I, clonada a montante do gene Luc::Neon. Contudo, o processo de recombinação ocorreu de forma errônea, causando a alteração da sequência e interrupção do reconhecimento do promotor, e conseqüentemente, cessando a expressão. Com base nesses dados, uma quarta versão do vetor foi gerada, alterando a região Intergênica II (a jusante ao gene Hyg no vetor), por outra região com 456 pb de distância da intergênica I. Essa nova região intergênica sobrepõe 43 pb do gene 18S rRNA, gerando o plasmídeo pTRIXrang4 (Figura 8). Novamente, uma transfecção piloto foi realizada com esse plasmídeo, resultando em modificação genética estável por semanas, avaliada pela expressão de fluorescência. Dessa forma, o plasmídeo

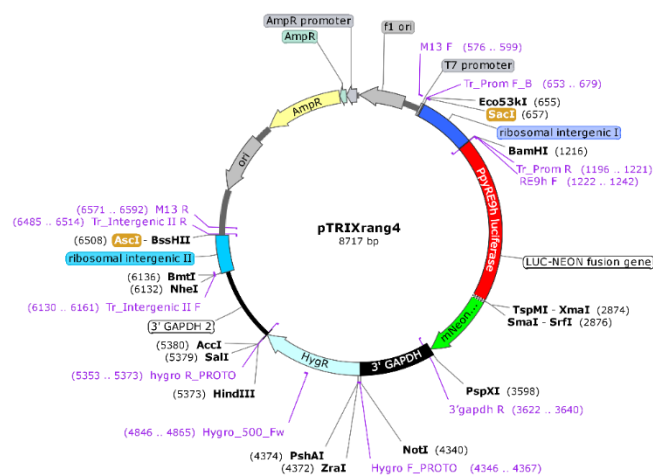
pTRIXrang4 foi selecionado para dar seguimento a caracterização de avaliação de estabilidade de transfecção e integração ao genoma.

Visto que ainda não foi realizada a análise de estrutura secundária da região denominada Intergênica I, para confirmação dessa sequência como promotora, será mantida a nomenclatura genérica “intergênica”.

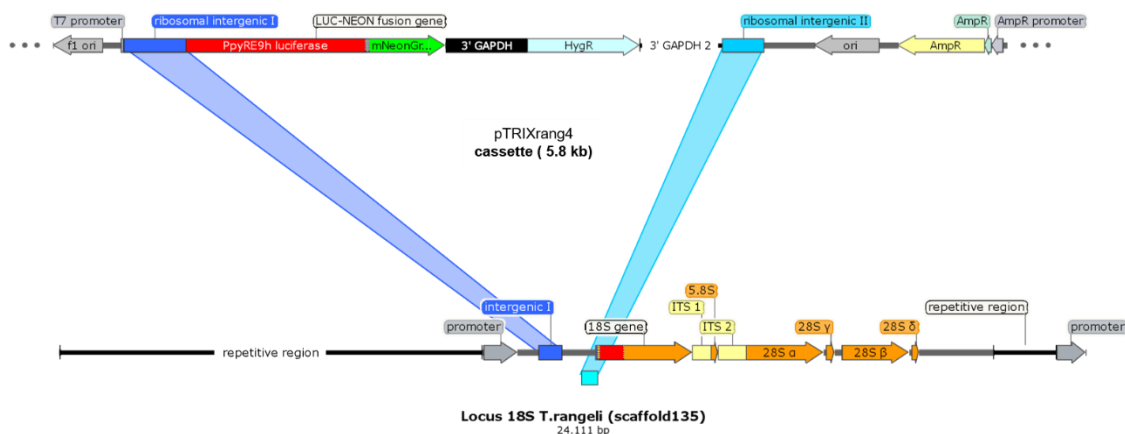
Figura 8 – Mapa do plasmídeo pTRIXrang4 e representação de integração genômica desse cassete no *locus* rRNA.

A) Mapa do vetor pTRIXrang4. Regiões em azul provenientes de *T. rangeli* em substituição às regiões de rRNA de *T. cruzi* presente no vetor pTRIX2 Luc::Neon. Regiões de ligação dos iniciadores descritos na Tabela 2, indicadas em lilás. Localização dos sítios únicos de restrição em negrito, com destaque em amarelo para os sítios de restrição das enzimas utilizadas para preparo do plasmídeo para transfecção. Entre parênteses posições em pares de base no plasmídeo, em referência à origem de replicação do vetor. **B)** Representação esquemática da inserção do cassete de integração no genoma de *T. rangeli* por recombinação homóloga. Destaque para regiões cinza e azul utilizadas para a construção dos plasmídeos que levaram a elaboração de pTRIXrang4.

A



B



Fonte: Autora

Uma vez que nenhum resultado das versões dos plasmídeos anteriores fará parte desta tese, doravante o plasmídeo pTRIXrang4 será denominado apenas pTRIXrang.

5.2 APRIMORAMENTO DE EFICIÊNCIA DE TRANSFEÇÃO

O processo de transfeção em tripanosomatídeos está em constante aprimoramento, tal qual os plasmídeos que são utilizados para as modificações genéticas. Uma transfeção ideal visa (i) uma baixa mortalidade das células, já que o processo de eletroporação é agressivo por desestabilizar a membrana plasmática; (ii) uma alta eficiência, para que grande parte da população de células contenha a modificação genética desejada; (iii) que o processo de seleção seja rápido, para que os experimentos de interesse possam ser conduzidos no menor tempo possível e (iv) que seja estável, possibilitando avaliações a longo prazo e reprodutibilidade dos experimentos, mesmo na ausência de pressão seletiva. Dessa forma, as sequências dos plasmídeos influenciam na eficiência da transfeção e também no processo de eletroporação em si (voltagem e duração da corrente), além dos tampões utilizados, dos meios de cultivo pós-transfeção e a resposta do parasito à droga de seleção. Para cada espécie de tripanosomatídeo há protocolos próprios de transfeção, sendo algumas características espécie- ou cepa-dependente. Logo, a implementação de etapas de diferentes protocolos, pode resultar no aumento da eficiência da transfeção.

Olmo *et al.* (2018), descreveram aumento de eficiência de transfeção através do tratamento prévio de epimastigotas de *T. cruzi* com o composto hidroxirúria, que impede a progressão do ciclo celular. Pacheco-Lugo *et al.* (2017), aprimoraram o processo de transfeção de *T. cruzi* pela mudança do programa selecionado no equipamento *Nucleofactor II*. Por isso, neste trabalho, foram testados alguns parâmetros que levaram ao aprimoramento do protocolo de transfeção para *T. rangeli*, descrito no item 4.5.

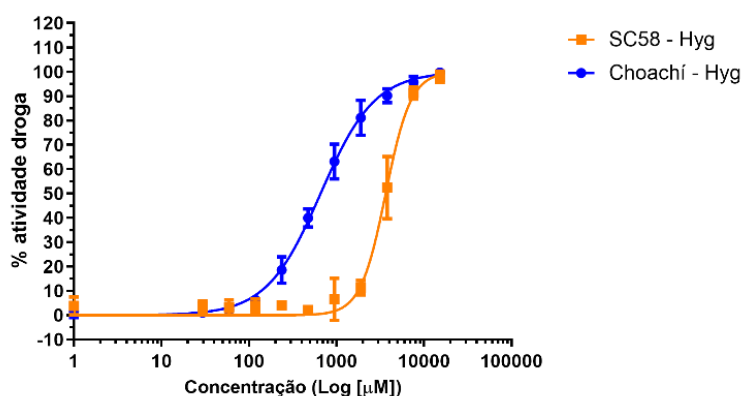
5.2.1 Susceptibilidade de *Trypanosoma rangeli* à higromicina

Considerando que, a susceptibilidade à diversas moléculas entre *T. cruzi* e *T. rangeli* pode ser consideravelmente diferente - a exemplo da resposta à H₂O₂ -

(ROMERO *et al.*, 2014; STOCO *et al.*, 2014b), foi determinada a concentração de Hyg que inibe o crescimento *in vitro* das cepas Choachí e SC58 selvagens (Figura 9).

Figura 9 – Curva dose-resposta de *Trypanosoma rangeli* à higromicina.

Regressão não linear da dose-resposta de *T. rangeli* na presença de até 8 mg/ml (15,18 mM). Avaliação de atividade metabólica avaliada por Alamar Blue (excitação 530 nm / emissão 590 nm) para definição do dado normalizado em atividade de droga. Gráfico expresso em média e desvio padrão (símbolos) e regressão não linear (linha) ($R^2 > 0,97$ em todas as análises realizadas). Experimento realizado em triplicata técnica e duplicata biológica. IC_{50} = Choachí 0,34 mg/ml \pm 0,01. IC_{50} = SC58 2,22 mg/ml \pm 0,41.



Fonte: Autora.

Para Choachí, foi determinada uma IC_{50} de 0,34 mg/ml \pm 0,01, enquanto para a cepa SC58 o valor é de IC_{50} 2,22 mg/ml \pm 0,41. De acordo com o preconizado para a determinação efetiva de dose-resposta, o ensaio com a cepa SC58 não atende a alguns requisitos como o mínimo de dois pontos no platô da curva (SEBAUGH, 2011). Dessa forma, é possível que o valor encontrado não corresponda a real concentração que iniba o crescimento de 50% da população de parasitos. Entretanto, tendo em vista que o objetivo desse ensaio foi a padronização do protocolo de transfecção, não foram testadas concentrações maiores que 8 mg/ml (15,18 mM), ponderando aplicação na rotina de cultivo. Mesmo com essa ressalva, algumas comparações podem ser feitas, como: Para *T. cruzi* é relatada a utilização de 100 µg/ml de Hyg para a seleção de transfectados (BATISTA *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2018; TAYLOR; KELLY, 2006), e é descrita a IC_{50} de 277,5 µg/ml para a cepa Y (BOUVIER *et al.*, 2013). Assim, as cepas de *T. rangeli* testadas apresentam maior resistência à Hyg que as cepas *T. cruzi* utilizadas nos trabalhos citados, sendo a cepa SC58 mais resistente que a cepa Choachí. Com base nesses resultados, foram estabelecidas as concentrações para diluição seriada pós-transfecção de 2, 1, 0,5 e 0,25 mg/ml para a cepa Choachí e de 4, 2, 1, 0,5 mg/ml para a cepa SC58.

5.2.2 pTRIXrang: Maior estabilidade e expressão

Para transfecção foram utilizados 2,5 µg do vetor pTRIXrang purificado para cada transfecção. Essa quantidade de DNA é quatro vezes menor que a utilizada nos protocolos de transfecção anteriores. Foram transfectadas as cepas SC58 e Choachí com e sem tratamento prévio por HU. Após 24 h da transfecção, as células foram contadas em câmara de Neubauer para estimativa de sobrevivência. Aproximadamente 60% dos parasitos sobreviveram ao processo de transfecção nas duas condições, não havendo influência do tratamento de HU nesse fator (dados não mostrados).

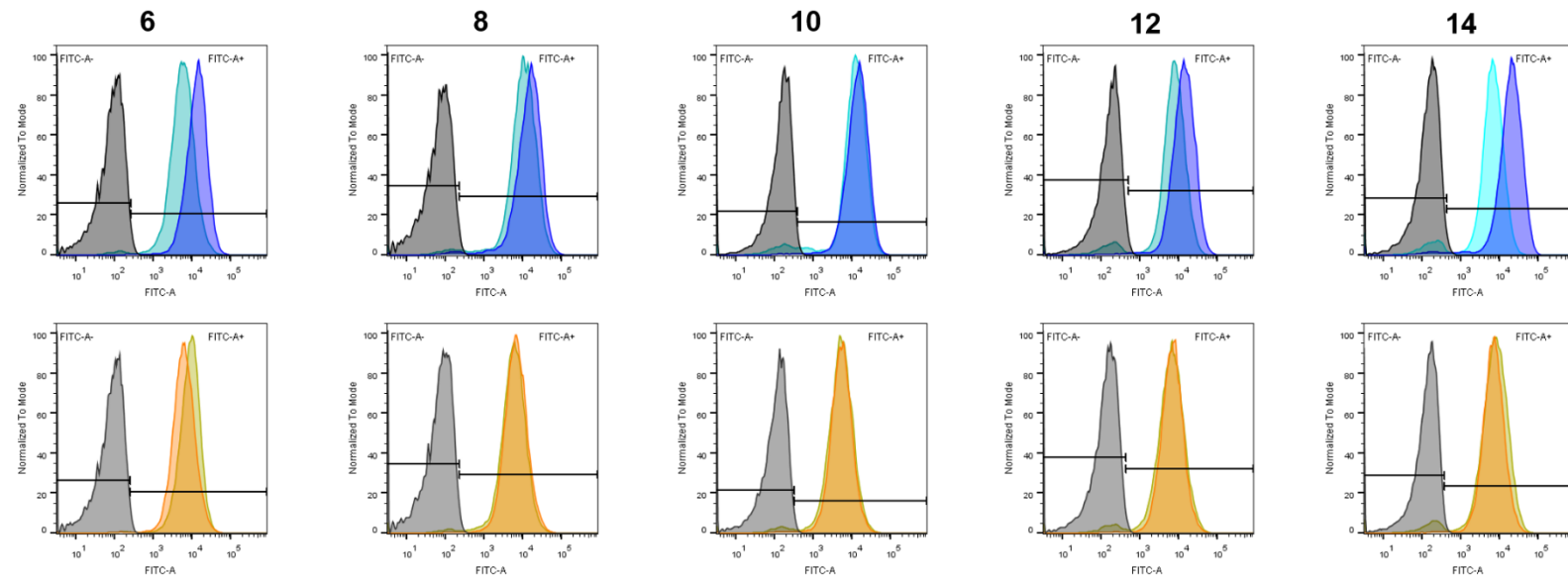
Após duas semanas da diluição seriada foi possível coletar e expandir o cultivo. As placas provenientes de parasitos tratados com HU, continham maior número de poços (quatro ou mais) em que os parasitos se apresentavam com maior mobilidade e aparentemente com maior intensidade de fluorescência. De forma distinta, nas placas não tratadas com HU somente um ou dois poços continham parasitos com morfologia e motilidade típicas. Os demais poços continham parasitos vivos, porém nitidamente em menor quantidade e morfologia semelhante a apresentada em fase estacionária do cultivo (parasitos em estresse). Contudo, a análise de intensidade de fluorescência por citometria de fluxo demonstra que não há influência da sincronização induzida por HU na expressão de Luc::Neon (Figura 47 do APÊNDICE A). Assim, por ter maior quantidade de poços com parasitos qualitativamente melhores, foram escolhidas as populações tratadas com HU, especificamente as populações B3 HU de Choachí e B2 HU de SC58 para a análises de estabilidade. Após duas semanas de cultivo em tubo, foram geradas culturas paralelas sem adição de Hyg. Desse modo, as avaliações de estabilidade ocorreram seis semanas após a transfecção (tempo que corresponde a quatro semanas da expansão da placa para tubo e duas semanas na ausência de droga para as linhagens indicadas como Hyg⁻) (Figura 10).

Figura 10 – Análise de estabilidade da expressão do *dual-reporter*.

A) Análise de população fluorescente por citometria de fluxo. Histograma normalizado (eixo Y) da quantidade de células em função da intensidade de fluorescência verde (FITC-A). Legenda interna da imagem indica linhagem analisada, mediana de fluorescência, porcentagem da população fluorescente em cada análise. Linhas horizontais em preto indicam *gate* configurado pela cepa parental
B) Avaliação da atividade de luciferase *in vitro* a partir de lisado de epimastigota. Gráficos expressos em média e desvio padrão de quintuplicata técnica. Ausência de higromicina (Hyg⁻). Análise estatística: ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni. (ns) Não significativa; (**) p<0,01, (***); p<0,001; (****) p<0,0001.

A

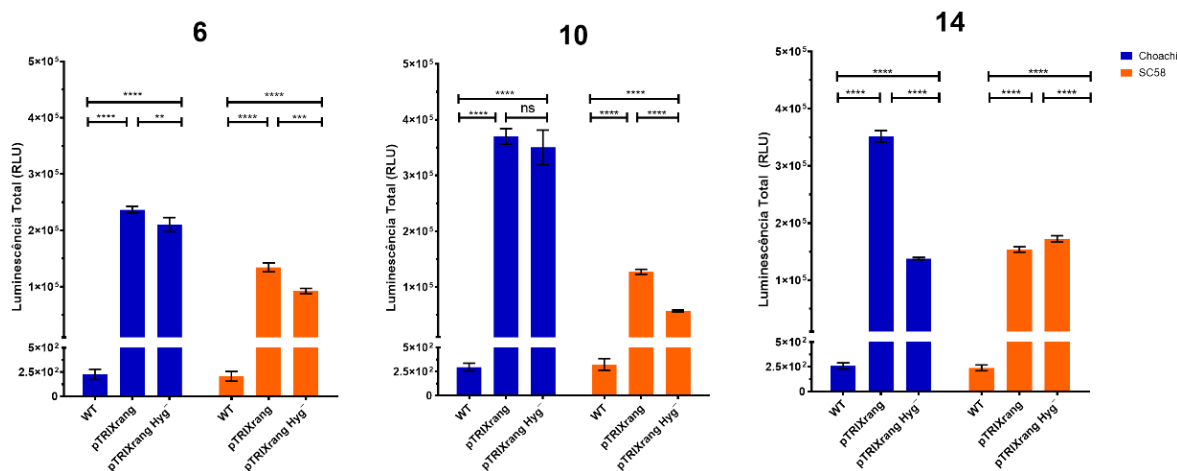
Semanas pós-transfecção



semanas pós transfecção	6		8		10		12		14	
	Mediana	% população	Mediana	% população	Mediana	% população	Mediana	% população	Mediana	% população
Choachí WT	79,8	1	56,3	1,02	154	0,96	168	1,04	149	1,06
Choachí B3 1 mg/ml Hyg	13367	99,6	14691	98,3	13697	98,8	13326	98,7	19383	97,3
Choachí B3 Hyg⁻	5560	97,8	10131	96,9	11549	93,5	7269	92,5	6204	91,3
	Mediana	% população	Mediana	% população	Mediana	% população	Mediana	% população	Mediana	% população
SC58 WT	77	0,99	62,2	0,94	106	0,99	134	0,97	140	0,98
SC58 B2 2 mg/ml Hyg	5981	99	6415	99,3	5199	98,8	6654	98,9	6777	98,9
SC58 B2 Hyg⁻	8780	98,9	5662	97,6	5013	96,7	6204	95,5	7291	94,7

Fonte: Autora.

B



Fonte: Autora.

Os parasitos apresentam altos níveis de expressão desde a primeira avaliação. Ainda, nota-se que a expressão atinge seu máximo a partir de 8 semanas pós-transfecção e que se mantem na presença da droga. Assim, os parasitos não apresentam diminuição na intensidade de fluorescência ou expressão de luciferase, como também mantêm a homogeneidade população transfectada em torno de 98%.

Interessantemente, a remoção da droga de seleção do meio de cultivo exerceu menor efeito na linhagem SC58, que expressou o *dual-reporter* menos intensamente que Choachí. Essa observação, corrobora com o dado de IC₅₀, em que a cepa SC58 é seis vezes mais resistente à Hyg que a cepa Choachí. Dessa forma, infere-se que os níveis de expressão apresentados por Choachí na ausência da droga seletiva e por SC58 nas condições avaliadas, referem-se à expressão basal do *dual-reporter* pelos parasitos. Logo, a presença da droga promove *feedback* positivo, induzindo o aumento da expressão pela cepa mais responsiva à Hyg. Observa-se que mesmo na ausência prolongada da droga de seleção, há a manutenção da homogeneidade da população, uma vez que são mantidos índices acima de 90% de parasitos transfectados em todas as análises.

Quanto a intensidade da fluorescência de Neon, observa-se que a fluorescência é bastante intensa. Isso pode ser observado pelo deslocamento do pico do histograma em relação eixo FITC, do controle parental para a população transfectada – numericamente registrado pela mediana da fluorescência. A nítida distinção dos picos, com mínima sobreposição dos gráficos selvagem/transfectado, evidencia que essa forte fluorescência é homogênea dentre os parasitos. Quanto a

atividade de luciferase, essa é nula no parasito selvagem (numericamente igual ao controle branco) e três ordens de grandeza maior nos transfectados de ambas as cepas.

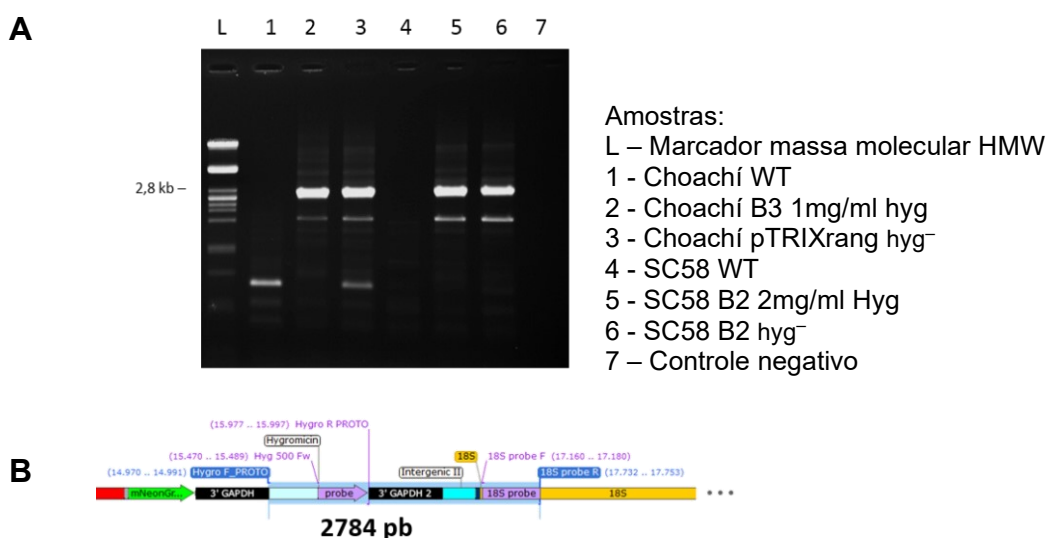
Assim, conclui-se que o cassete confere uma transfecção estável, revelada pela expressão constitutiva de Luc::Neon por, no mínimo 3 meses, mesmo na ausência da droga seletiva. Embora, a expressão seja influenciada pela presença do antibiótico, essa ação ocorre na forma de reforço da expressão.

5.3 INTEGRAÇÃO DE pTRIXrang AO GENOMA

A recombinação do cassete pTRIXrang no genoma de *T. rangeli* foi verificada por PCR utilizando abordagem de um iniciador que se ligue a uma região exclusiva do cassete (Hygro F_PROTO) e outro iniciador para a região genômica esperada para a integração (18S probe R). Dessa forma, o produto de amplificação de 2,78 kb somente é gerado se houver a integração do cassete no *locus* especificado (Figura 11). Para essas análises, o DNA genômico foi extraído após 12 semanas da transfecção.

Figura 11 – O cassete pTRIXrang é integrado no *locus* 18S.

A) Produtos de amplificação dos iniciadores Hygro F_PROTO e 18S probe R em gel de agarose 1% corado por brometo de etídio. Marcador de massa molecular *in house* HMW (DNA fago λ clivado por *Pst*I). **B)** Representação de estratégia de amplificação utilizada. Destaque em azul na indica o produto de amplificação esperado na integração do cassete ao locus rRNA. Posição de ligação dos iniciadores indicado em lilás. Entre parênteses, posições em pares de base em relação ao início do *contig* obtido do *Scaffold* 135 para realização dessa análise (posição relativa).



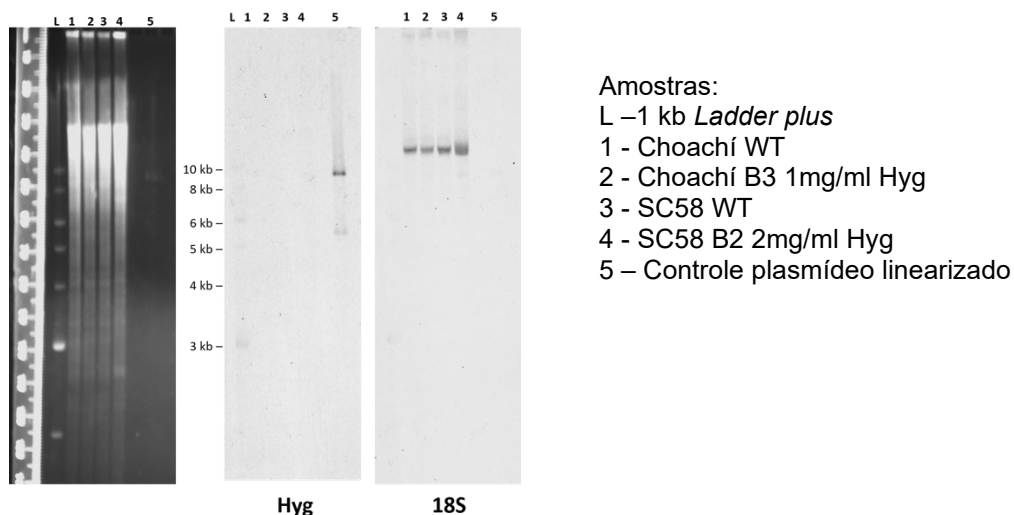
Fonte: Autora.

O produto de amplificação de 2,78 kb foi gerado para todos os parasitos transfectados, independente da ausência de Hyg por mais de três meses, evidenciando a integração do cassete ao genoma. Lembrando, que as sequências clonadas no vetor são oriundas de amplificação de DNA cepa SC58, em função da disponibilidade de seu genoma. Dessa forma, mesmo que as cepas SC58 e Choachí possuam genótipos distintos, KP1- e KP1+, respectivamente, a comprovação da integração de pTRIXrang no genoma da cepa Choachí, permite inferir que a utilização do vetor é possível em diferentes linhagens do parasito, independente do genótipo.

A análise por *Southern Blot* (SB) utilizando DNA genômico dos parasitos selvagens e transfectados, digerido com *Bam*HI e as sondas para os genes de higromicina e 18S não corrobora os resultados da PCR (Figura 12).

Figura 12 – Análise da integração do cassete pTRIXrang por *Southern Blot*.

Separação eletroforética dos produtos de digestão com *Bam*HI de 40 µg de DNA genômico dos parasitos selvagens e transfectados das cepas SC58 e Choachí ou 0,5 µg de controle plasmidial pTRIXrang em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio (esquerda). Detecção em filme radiográfico da hibridização do DNA clivado com as sondas Hyg e 18S (direita). Marcador de peso molecular 1 kb *Ladder plus* (NEB)



Fonte: Autora.

Era esperado o reconhecimento, pelas duas sondas, de um fragmento de DNA de \approx 8 kb correspondente ao produto da clivagem dos sítios de *Bam*HI presentes no início do gene *Luc::Neon* e um sítio presente no gene 28S α . Contudo, visualiza-se apenas o reconhecimento da sonda Hyg pela hibridização do controle vetor linearizado. Ao passo que, a sonda 18S reconhece fragmentos de um mesmo

tamanho em todas as amostras de DNA genômico, não hibridizando com o DNA plasmidial, como esperado.

Neste estudo foram identificados 13 *loci* rRNA em *T. rangeli*, quantidade semelhante à descrita na publicação do genoma (STOCO *et al.*, 2014b). Curiosamente, o SB revela apenas uma banda. É possível - porém pouco provável - que os 13 *loci* contenham o sítio para *BamHI* nas mesmas posições, gerando produtos de clivagem do mesmo tamanho. Essa enzima foi escolhida por possuir um sítio de clivagem em uma região conservada, que codifica uma importante subunidade do ribossomo, e assim garantindo a digestão. Todavia, as análises de restrição do cassete integrado ao *loci* rRNA de diferentes *scaffolds*, indicam produtos de clivagem de diferentes tamanhos (dados não mostrados).

Dessa forma, entende-se que a banda única identificada no SB com a sonda 18S é referente à hibridização de vários *loci* que possuem tamanhos semelhantes ou não distinguíveis pela resolução em gel de agarose. Não sendo identificado os *loci* divergentes entre si. Essa análise foi realizada quatro vezes, com diferentes sistemas de detecção e reagentes de revelação. Entretanto o kit utilizado para gerar as sondas foi o mesmo. Assim, é provável que o insucesso da detecção da integração ao genoma tenha ocorrido por problemas técnicos. De toda forma, o resultado de SB não invalida a conclusão obtida através do PCR de integração. Além disso, a amplificação por PCR aliada à análise de expressão na ausência de droga, são contundentes em afirmar a integração do cassete no genoma e alta estabilidade da transfecção.

5.4 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE *Trypanosoma rangeli* TRANSFECTADO COM pTRIXrang

5.4.1 Avaliação de replicação *in vitro*

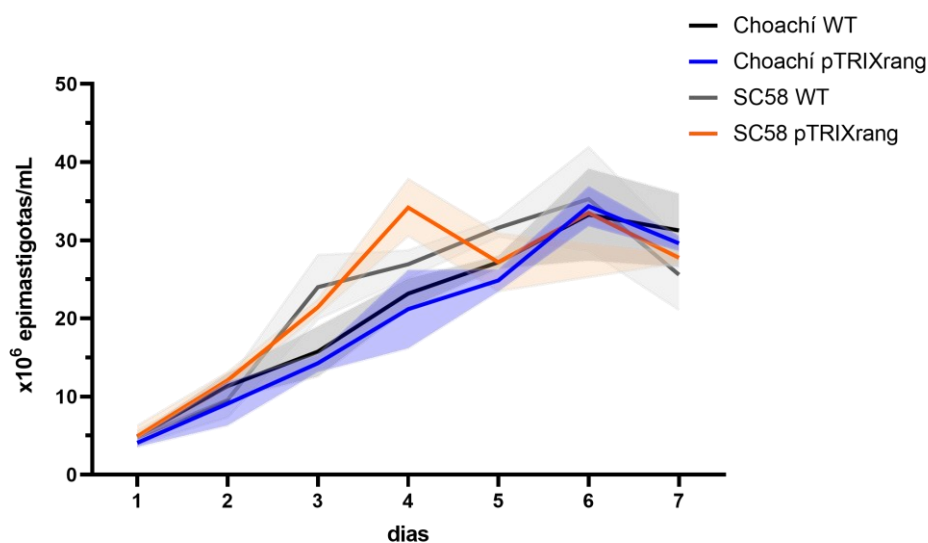
Uma vez que o cassete pTRIXrang foi considerado integrado ao genoma e a expressão constante, estável e intensa, foi avaliado o crescimento dos parasitos em cultura. Aparentemente, os parasitos se recuperam rapidamente da transfecção, pois apresentavam morfologia e mobilidade esperados. Contudo, alterações na taxa de crescimento influenciam diretamente no processo de diferenciação *in vitro* de epimastigotas para tripomastigotas. Conseqüentemente influenciando a infecção de *in vitro* ou *in vivo* em mamíferos e triatomíneos. Dessa forma, a contagem diária dos

cultivos em câmara de Neubauer foi realizada para verificação das taxas de replicação das formas epimastigotas das linhagens selvagens e transfectadas (Figura 13).

Não foram identificadas diferenças na taxa de crescimentos de epimastigotas de Choachí pTRIXrang em relação a cepa parental ($p= 0,799$), bem como não houve diferença entre as linhagens SC58 selvagem e transfectada ($p>0,999$). Dessa forma, compreende-se que a expressão de Luc::Neon não interfere na replicação das formas epimastigotas em cultura.

Figura 13 – O crescimento de epimastigotas transfectadas com pTRIXrang não é alterado.

Curva de crescimento *in vitro* a partir de uma concentração inicial de 2×10^6 epimastigotas/ml. Cultivos realizados de acordo com preconizado para cada cepa (Choachí 10 % SFB e SC58 20% SFB) na ausência de droga de seleção. Gráfico expresso média e desvio padrão (linha contínua e área sombreada, respectivamente). Análises estatísticas: ANOVA de duas vias com pós teste de Bonferroni. Significância $p < 0,05$. Experimento realizado em triplicata biológica.



Fonte: Autora

5.4.2 Diferenciação *in vitro*

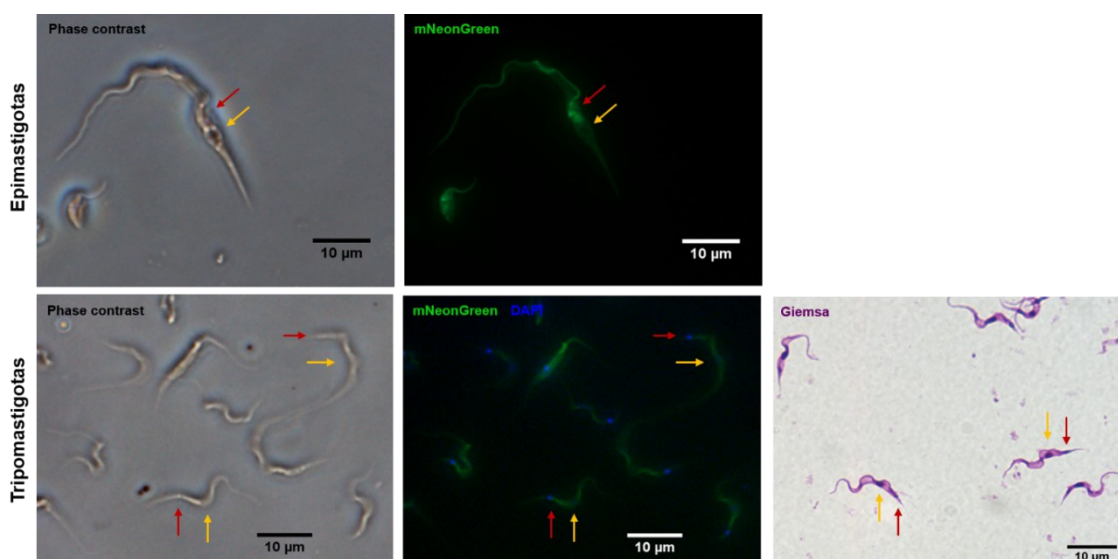
Para garantir que a expressão do *dual-reporter* não afeta as características básicas de *T. rangeli*, foi realizada a diferenciação *in vitro* e formas epimastigotas em tripomastigotas das diferentes linhagens conforme o descrito em 4.10. Após 8 dias de incubação, as células foram avaliadas quanto à alteração da localização do cinetoplasto – da posição anterior para posterior –, como demonstrado na Figura 14.

As taxas de diferenciação da cepa Choachí selvagem *in vitro* são de aproximadamente 80 a 90% (KOERICH *et al.*, 2002). Um dos fatores que influencia

consideravelmente é a utilização de parasitos em fase estacionária de crescimento e o pH do meio de cultura, dentre outros fatores. Assim, para todos os experimentos foram realizados esfregaços para coloração de Giemsa e avaliada a proporção de parasitos diferenciados. Não foram observadas diferenças nas taxas de diferenciação entre parasitos das linhagens selvagem e pTRIXrang da cepa Choachí (dados não mostrados), tendo os parasitos transfectados preservado a morfologia e a motilidade características da espécie (qualitativamente avaliado).

Figura 14 – A diferenciação *in vitro* de *T. rangeli* não é alterada pela transfecção com pTRIXrang ou expressão do *dual-reporter*.

Fotomicrografias em contraste de fase de formas epimastigotas e tripomastigotas diferenciadas *in vitro* da cepa Choachí pTRIXrang. Fluorescência direta de mNeonGreen e DAPI, conforme indicação interna das imagens. Canto inferior direito, coloração de Giemsa de tripomastigotas de Choachí pTRIXrang. Setas amarelas: núcleo. setas vermelhas: cinetoplasto. Barras de escala: 10 μ m.



Fonte: Autora.

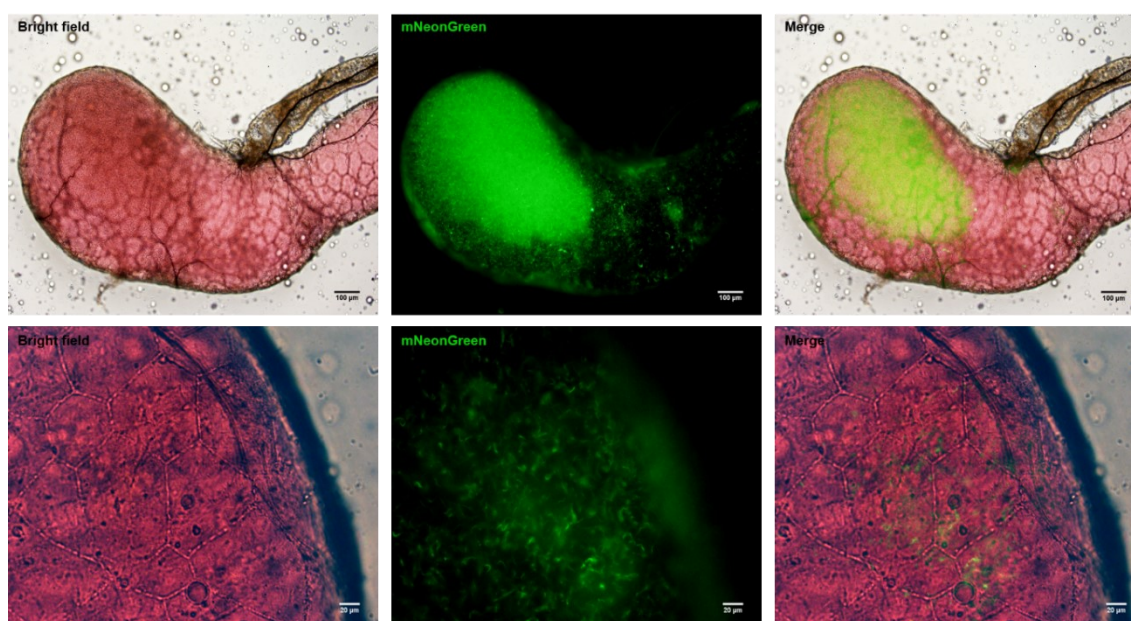
5.4.3 A expressão de Luc::Neon não altera a invasão da glândula salivar em triatomíneos

In vivo, a metaciclogênese ocorre no interior das glândulas salivares de triatomíneos, especialmente do gênero *Rhodnius*. Após penetrarem o epitélio intestinal, os epimastigotas proliferam intensamente e colonizam a hemolinfa. Esses parasitos (ainda como epimastigotas) invadem o interior das glândulas salivares, diferenciam-se e acabam sendo inoculados no hospedeiro mamífero (CUBA CUBA, 1998; GUARNERI; ATELLA; PRETO, 2012). Sabendo disso, foi analisada a capacidade de penetração e metaciclogênese dos parasitos da linhagem Choachí

pTRIXrang em relação à cepa selvagem através da inoculação intracelômica dos parasitos em *R. prolixus* conforme o descrito no item 4.9. Após dois meses da infecção, foram identificados parasitos selvagens e transfectados no interior das glândulas salivares. Esse foi o ponto único de coleta do experimento, não sendo avaliada a presença dos parasitos na glândula em tempos inferiores ao momento mencionado. As formas encontradas são correspondentes a tripomastigotas pelas características morfológicas – células filiformes, diminutas e de intensa movimentação –, e contidas unicamente no interior da glândula salivar (Figura 15).

Figura 15 – Choachí pTRIXrang infecta glândulas salivares de *Rhodnius prolixus*.

Fotomicrografia de campo claro, fluorescência direta e sobreposição das imagens (*Merge*) da glândula salivar de *R. prolixus* experimentalmente infectado com a linhagem Choachí pTRIXrang após 2 meses de infecção intracelômica. Painel superior: observação geral da glândula salivar, contendo parasitos no interior. Painel inferior: Vista em maior magnificação dos parasitos contidos através da fina camada epitelial glandular. Barras de escala: 100 μ m (painel superior) e 20 μ m (painel inferior).



Fonte: Autora.

Na infecção intracelômica, os epimastigotas são injetados diretamente na hemolinfa. Portanto, não é avaliada a capacidade dos parasitos transfectados de transpor o epitélio intestinal. Essa etapa é considerada muito importante na infecção, mas também é a mais difícil e mais demorada do processo (AÑEZ; NIEVES; CAZORLA, 1987; HECKER; SCHWARZENBACH; RUDIN, 1990). Todavia, a infecção intracelômica é um método rápido para a avaliação a virulência de *T. rangeli* ao hospedeiro invertebrado (FERREIRA *et al.*, 2010). Dessa forma, verificou-se que o

parasito transfectado manteve as capacidades de evadir o sistema imune do inseto como a fagocitose por hemócitos, a exposição às espécies reativas presente na hemolinfa como as fenoloxidasas e às moléculas tripanolíticas, não diferindo da cepa selvagem.

Além da metaciclogênese *in vivo*, também foi avaliada a capacidade infectiva para camundongos BALB/c pela transmissão via picada de *R. prolixus* experimentalmente infectados. Após três dias do repasto infectivo, a parasitemia das cepas Choachí selvagem e transfectada foram detectáveis (dados não mostrados).

Com base nos resultados expostos, conclui-se que em nenhum dos parâmetros avaliados, as linhagens transfectadas com pTRIXrang diferiram das linhagens parentais. Isso indica que as linhagens Luc::Neon de *T. rangeli* podem ser utilizadas em substituição às cepas selvagens, sendo uma ferramenta útil para as avaliações referentes as interações parasito-hospedeiro, como o observado para outros tripanosomatídeos. Entretanto, é importante delimitar experimentalmente as vantagens e desvantagens do uso de cepas geneticamente modificadas, a fim de minimizar a introdução de possíveis vieses nos estudos.

5.5 INFEÇÃO EM MAMÍFEROS

5.5.1 Parasitos pTRIXrang exibem o mesmo padrão de infecção que as cepas parentais

Para a validação e uso sem ressalvas das cepas transfectadas, é necessário verificar o comportamento no hospedeiro mamífero, visto que esse é o principal objetivo de aplicação da ferramenta. Até o momento, o parâmetro mais utilizado em relação às infecções de *T. rangeli* em mamíferos é a curva de parasitemia. A infecção de camundongos é descrita como curta (1-14 dias), de baixa parasitemia e com a maior concentração de parasitos na corrente sanguínea entre o 2º ao 7º dia de infecção, onde formas tripomastigotas alongadas e de intenso movimento são observadas na corrente sanguínea.

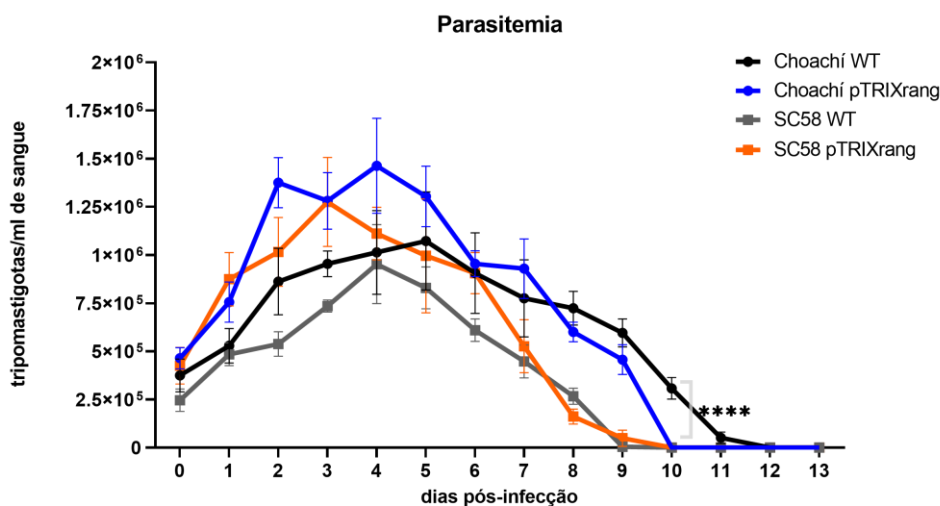
Para a análise de cinética da parasitemia, as linhagens Choachí pTRIXrang, SC58 pTRIXrang e suas respectivas cepas parentais, foram utilizadas para infecção de camundongos BALB/c por injeção i.p. com 1×10^7 tripomastigotas e realizada a contagem diária pelo Método Pizzi-Brener (item 4.11.1 de materiais e métodos). Simultaneamente, foram coletadas amostras de sangue para quantificação da

atividade de luciferase nos tripomastigotas sanguíneos das linhagens transfectadas, cujos resultados estão demonstrados na Figura 16.

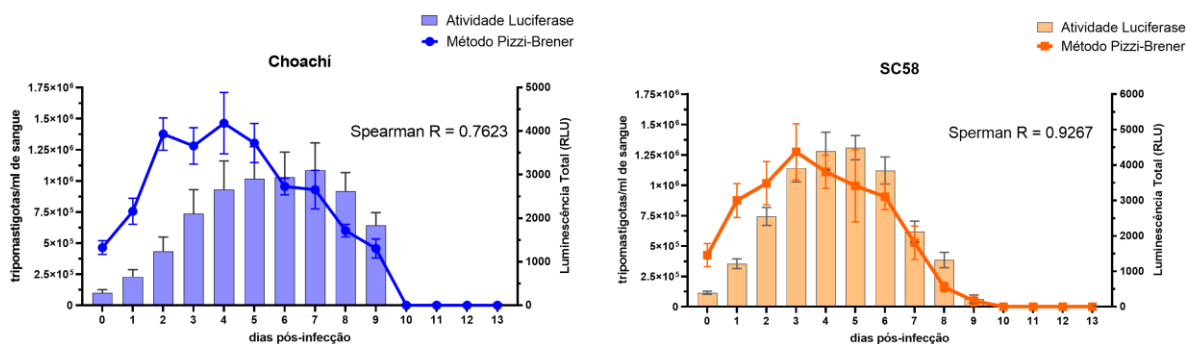
Figura 16 – Cinética de parasitemia das linhagens pTRIXrang em camundongo.

A) Mensuração da concentração de parasitos no sangue por observação direta pelo método de Pizzi-Brener. Gráfico expresso em média e erro padrão (n =4/ grupo). Avaliação do dia 0 refere-se a 6 horas pós infecção. Análise estatística: ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni. Significância $p < 0,05$: Choachí WT vs Choachí pTRIXrang $p = 0,3254$; SC58 WT vs SC58 pTRIXrang $p = 0,1873$. Na comparação múltipla (por dia de análise): (****) $p < 0,0001$. **B)** Análise comparativa entre os métodos de quantificação de *T. rangeli* no sangue. Observação direta ao microscópio (eixo Y expresso em tripomastigotas/ml de sangue) e atividade de luciferase em sangue periférico (eixo Y luminescência total). Ensaio de luciferase realizado em duplicata técnica de cada camundongo (n=4/grupo). Correlação dos métodos avaliada por teste de Spearman (R) demonstrada no interior do gráfico. Significância da análise de correlação: Choachí $p = 0,0023$; SC58 $p < 0,0001$). Dados em média e erro padrão.

A



B



Fonte: Autora.

Não foram observadas diferenças na dinâmica de infecção entre as cepas parentais e as cepas transfectadas quanto ao padrão da curva parasitêmica (Choachí ($p = 0,3254$) ou SC58 ($p = 0,1873$)). Na análise múltipla por dia de coleta, foram encontradas diferenças somente entre os parasitos pTRIXrang e selvagem da cepa

Choachí no 10^o d.p.i. Dessa forma, conclui-se que os parasitos transfectados de ambas as linhagens não diferem de suas cepas parentais quanto à infectividade em camundongos BALB/c.

Até o momento, a observação direta dos parasitos é o melhor método de avaliação da parasitemia nos estudos de *T. rangeli*, sendo imprescindível para os estudos de avaliação no hospedeiro mamífero. Entretanto esse método é trabalhoso, demorado, exige considerável familiaridade do pesquisador com a técnica e é biologicamente muito variável. São encontradas na literatura diversas considerações sobre o método em si e sobre o tratamento dos dados (ARAÚJO-JORGE; CASTRO, 2000; SOGAYAR; KIPNIS; CURI, 1993).

Com base nessas observações, o método Pizzi-Brener e a atividade de luciferase foram comparados a fim de avaliar a correlação dos métodos. Observa-se que os métodos são correlatos (Choachí: R = 0,76 / SC58 R = 0.92). Contudo é possível observar uma maior estimacão na quantidade de parasitos nos primeiros dois dias de infecção, pelo método de Pizzi-Brener. Esse resultado pode estar relacionado à visualização de parasitos na corrente sanguínea, que apesar de apresentarem movimentos sutis já estão em processo de morte celular, e assim metabolicamente comprometidos. Em todos os experimentos desta tese, assim como os experimentos na literatura que utilizaram linhagens certificadas como *T. rangeli*, é observado que a quantidade de parasitos encontrados na corrente sanguínea sempre é inferior ao inóculo inicial – mesmo considerando o pico de parasitemia. Logo, muitos parasitos são eliminados nos primeiros dias da infecção por mecanismos ainda não especificados para *T. rangeli* (EGER-MANGRICH *et al.*, 2001).

Com base na atividade de luciferase, observou-se o gradual aumento de parasitos na corrente sanguínea até atingir a parasitemia máxima entre 4^o e 5^o d.p.i. Após, há o declínio gradual (um pouco mais acentuado para Choachí) até o 9^o dia. A partir desse momento, não são encontrados parasitos por nenhuma das duas técnicas, devido à ausência de parasitos ou quantidade abaixo do limite de detecção ($\approx 1 \times 10^4$ parasitos/ml pelo método Pizzi-Brener e não determinado para atividade de luciferase *ex vivo* de parasitos na corrente sanguínea). A partir dessa análise foram estabelecidas quatro fases da infecção por *T. rangeli*: início da infecção (primeiras 24 h), ascendente (até o pico no 4 d.p.i.), declínio (até 09 d.p.i.) e subpatente (a partir do desaparecimento dos parasitos da corrente sanguínea). Essa distinção foi utilizada

como parâmetro para a determinação dos pontos de coleta *ex vivo* no experimento em associação à bioluminescência.

Considerando em conjunto os resultados obtidos, tem-se que as linhagens *dual-reporter* mantiveram as mesmas características biológicas das linhagens selvagens em todos os parâmetros avaliados, sendo eles: (i) comportamento em cultura pela curva de crescimento; (ii) as taxas e parâmetros morfológicos de diferenciação *in vitro* e (iii) padrões de infectividade para triatomíneos e para o hospedeiro mamífero. Dessa forma, valida-se a utilização das linhagens Choachí pTRIXrang e SC58 pTRIXrang como ferramentas para estudo das relações parasito-hospedeiro de *T. rangeli* com seus hospedeiros. Assim, o plasmídeo pTRIXrang é o primeiro plasmídeo integrativo, de expressão intensa e constitutiva específico para *T. rangeli*, permitindo também outros estudos de genética reversa neste parasito.

5.6 APLICAÇÃO DE pTRIXrang NA BUSCA DE *Trypanosoma rangeli* EM MAMÍFERO

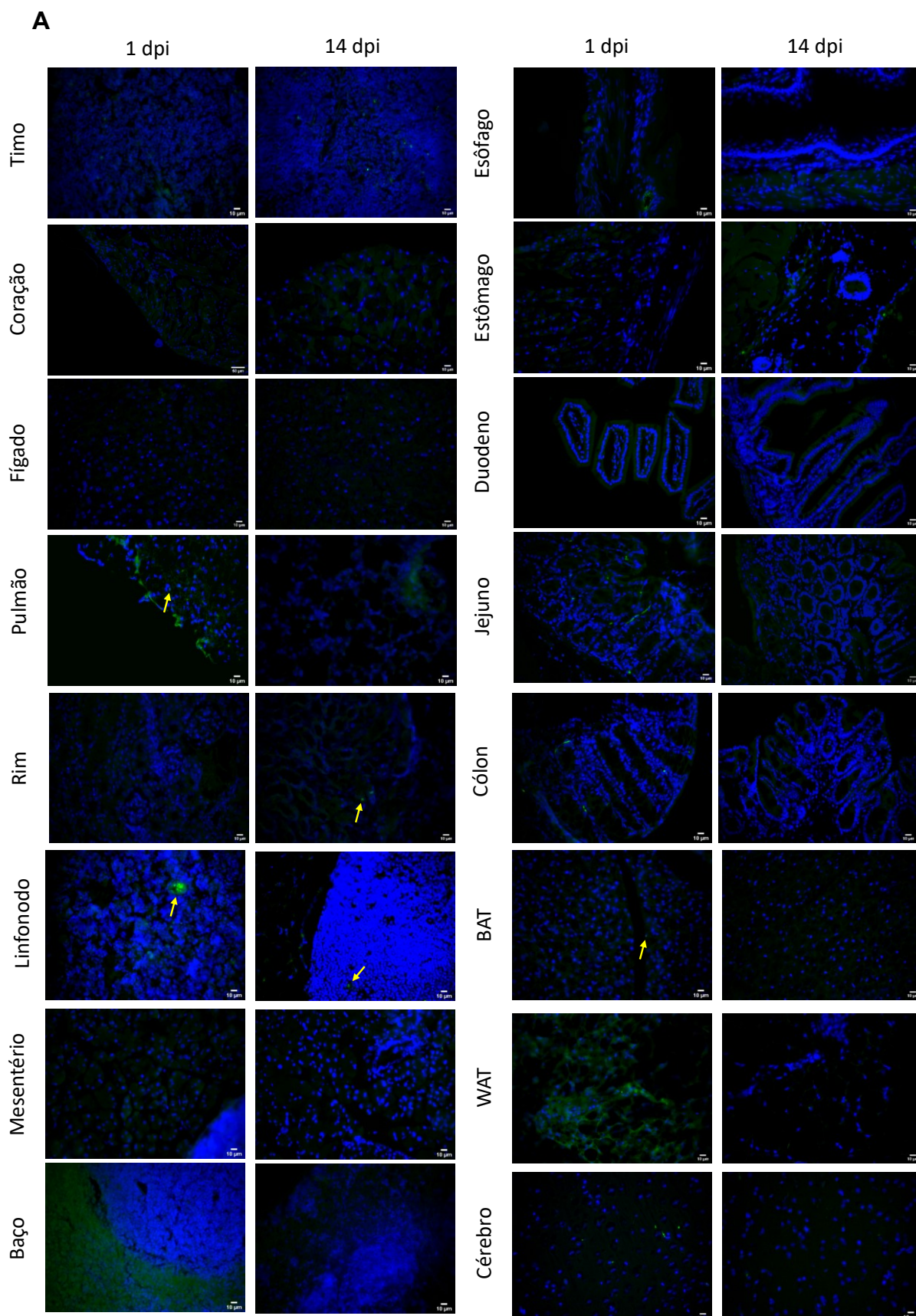
Com base nos órgãos e tecidos descritos como sítios de infecção de *T. cruzi* e *T. brucei* (MIAO; NDAO, 2014; TAVARES *et al.* ., 2017; TRINDADE *et al.* ., 2016b), e ainda, em experimentos prévios do grupo de pesquisa em colaboração com LSHTM com *T. rangeli* (Jayawardhana e Lewis, dados não publicados) (GRANUCCI; STOCO, 2013; SCHLINDWEIN; STOCO, 2014), foram coletadas amostras no 1 e 14 d.p.i. para a busca de *T. rangeli* por histologia fluorescente. Essa análise foi realizada em associação ao experimento descrito para cinética de parasitemia, descrito no tópico anterior.

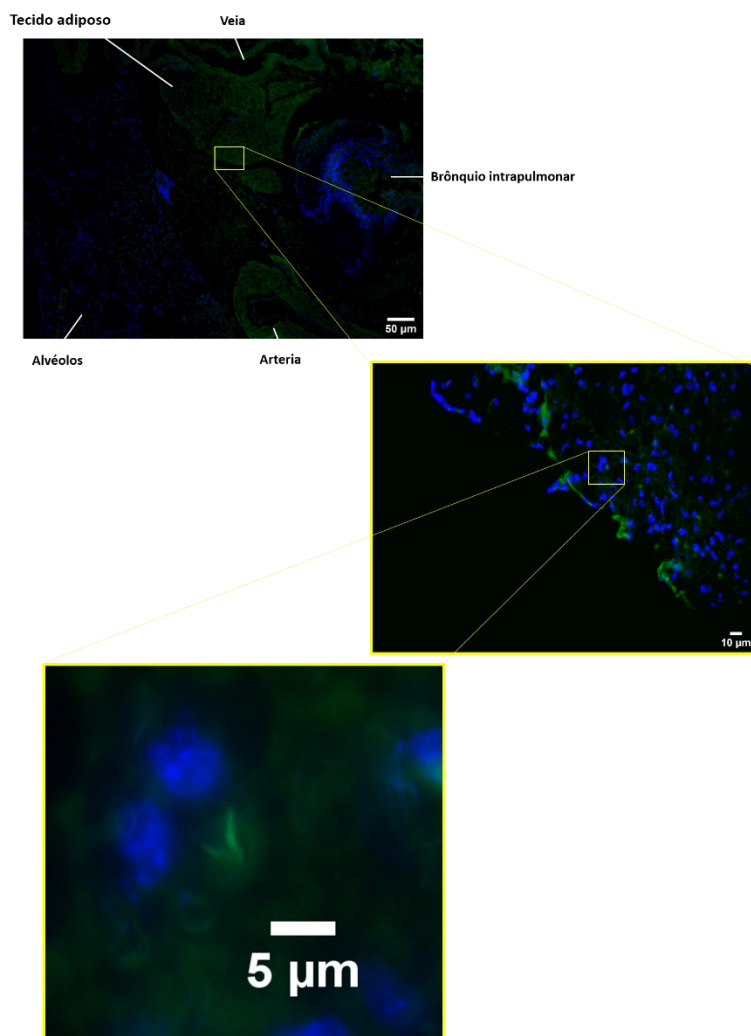
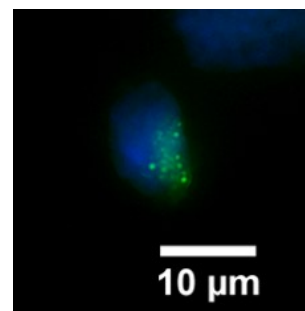
O processamento histológico foi realizado de acordo com o descrito por Costa *et al.* (2018), sendo coletado os órgãos/tecidos descritos no item 4.12. A análise dos cortes histológicos por microscopia de fluorescência está representada na Figura 17.

Figura 17 – Busca por *Trypanosoma rangeli* em tecido do hospedeiro mamífero.

A) Microscopia de fluorescência direta convencional de cortes histológicos provenientes de 1 e 14 d.p.i. de camundongos BALB/c infectados com a linhagem Choachí pTRIXrang. Fluorescência proveniente de mNeonGreen (parasitos), corante DAPI e autofluorescência do tecido histológico (BAT: tecido adiposo marrom; WAT: tecido adiposo branco). Barras de escala: 10 µm. **B)** Identificação de tripomastigota em tecido adiposo associado ao pulmão. Setas amarelas indicam pontos de fluorescência possivelmente associados à presença do parasito no tecido. Áreas detalhadas em amarelo indicam a posição dos campos de maior magnificação. **C)** Macrófago pulmonar com indícios

de fagocitose de parasito fluorescente (14 d.p.i.). Barras de escala com indicação de respectiva referência na imagem.



B**C**

Fonte: Autora.

Alguns pontos fluorescentes consistentes com a morfologia de parasitos podem ser visualizados nos tecidos na fase inicial da infecção. Em menor quantidade, também foram identificados focos fluorescentes no estágio final da infecção, especificamente rim e linfonodo, como demonstrado na Figura 17A.

Nessas imagens é possível observar a emissão de autofluorescência dos tecidos dos camundongos, especialmente pelo baço, músculo esquelético e regiões contendo hemácias, possivelmente devido a autofluorescência de hemoglobina e mioglobina. Contudo, além do procedimento pré-analítico tomado para minimizar tal efeito (perfusão), ao microscópio foi possível visualizar com melhor definição o tecido. Desse modo, são indicados com as setas, apenas os achados que de fato possam remeter a presença do parasito no tecido.

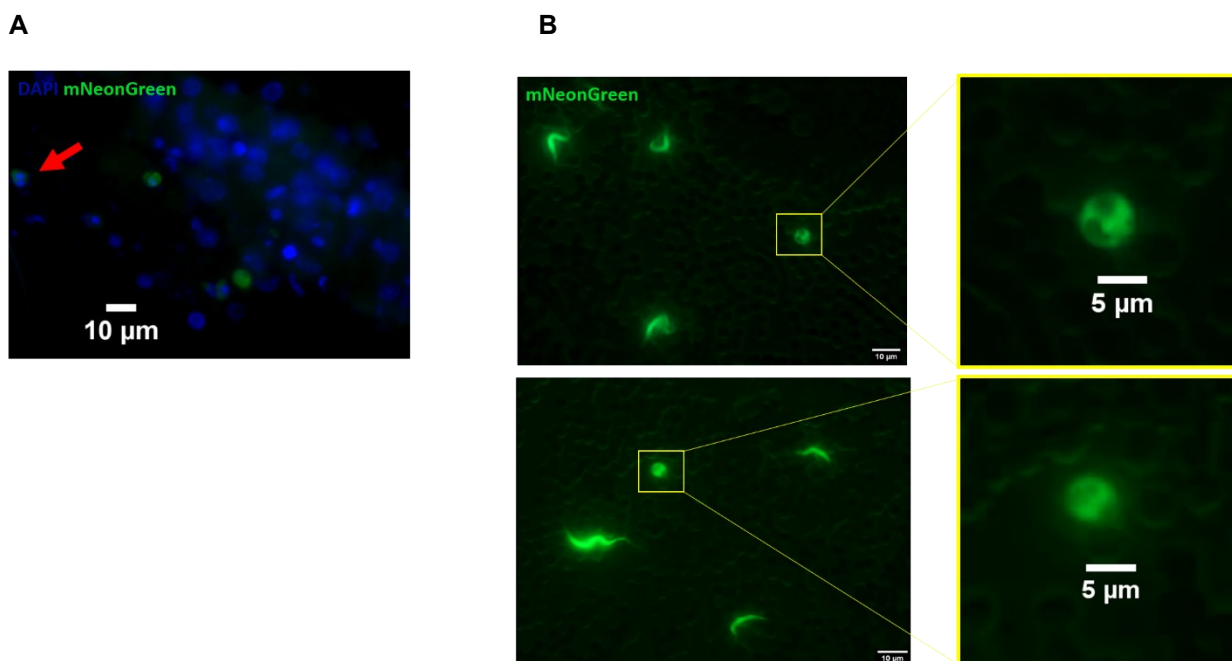
Com análise criteriosa em relação às características morfológicas e intensidade da fluorescência correspondentes a Choachí pTRIXrang, pode ser encontrado a forma tripomastigota em um tecido adiposo associado ao pulmão. Apenas o parasito demonstrado na imagem Figura 17B foi encontrado neste corte. Contudo, essa identificação não ocorreu de forma espúria. Ainda, no pulmão foi encontrada uma célula (possivelmente macrófago) com pontos fluorescentes dispersos, que podem ser alusivos à resto celular de parasito fagocitado (Figura 17C). Entretanto, devido na falta da utilização de marcadores celulares específicos, não é possível afirmar categoricamente esse achado. No próximo tópico, os pulmões serão discutidos novamente, com base nos resultados de bioluminescência.

Outro importante achado obtido através da fluorescência, foi a detecção de formas amastigotas-*like* na medula óssea esternal. Na Figura 18 é possível visualizar parasitos de formato ovoide, com tamanho $5,10 \mu\text{m} \pm 0,7 \times 7,13 \mu\text{m} \pm 0,57$, sendo que um deles aparentemente binucleado (indicado com seta vermelha). Alguns autores comparam diversas características morfológicas entre amastigotas de *T. rangeli* e de *T. cruzi*. Uma delas, é que o tamanho de amastigotas-*like* de *T. rangeli* obtidas *in vitro* são maiores que as amastigotas de *T. cruzi*. Osório *et al.* (1995) descreveram o tamanho de $3,5 \mu\text{m} \pm 0,6$ para amastigotas-*like* de *T. rangeli* da cepa Ub66-5b. Já Herbig-Sandreuter (1957) registra 5 - 8 μm para uma cepa isolada de cão em 1949. Assim, as formas descritas neste estudo, aparentam ser ainda maiores que as descritas por Osório e colaboradores, mas em conformidade as descritas por outros pesquisadores.

Considerando que não foi possível observar o cinetoplasto em nenhum dos parasitos nas imagens obtidas, e sendo essa a principal característica dessa ordem filogenética, buscou-se observar a presença dessa forma amastigota-*like* em lâmina a fresco, tendo em vista que o parasito vivo expressa continuamente a Neon e sem a influência do processamento histológico. Logo, teria intensidade de fluorescência maior, possibilitando diminuir o *background* proveniente dos tecidos. Desse modo, foram encontradas novamente formas amastigota-*like* no sangue periférico de camundongos, como demonstrado na Figura 18B. Valendo-se de que essa análise foi feita com os parasitos vivos, o registro foi feito em vídeo. Disponível no link shorturl.at/mqrH7 (Barra de escala com indicação “50 pixels” é equivalente a 10 μm).

Figura 18 – Observação de formas amastigotas-*like* de *Trypanosoma rangeli* no hospedeiro mamífero.

A) Microscopia de fluorescência direta (mNeonGreen e DAPI) de corte histológico de medula óssea esternal em 1 d.p.i. (Seta vermelha indica célula possivelmente binucleada). **B)** Microscopia de fluorescência direta de mNeonGreen e contraste de fase de lâmina a fresco de amostra de sangue periférico 4 d.p.i. Ao fundo, é possível ver o contorno das hemácias pelo contraste de fase com baixa incidência de luz na amostra (imagens obtidas de registro em vídeo de diferentes campos da lamínula). Barras de escala com indicação da distância na imagem.



Fonte: Autora.

Com esses resultados, registra-se a possível ocorrência de amastigotas-*like* de *T. rangeli* na corrente sanguínea, a observação de um tripomastigota em tecido adiposo associado ao pulmão, além de outras estruturas não identificadas como a encontrada no linfonodo que se assemelha um ninho ou cisto fluorescente.

Até o momento, as buscas por *T. rangeli* tiveram como base os tecidos usualmente infectados por outros tripanosomatídeos patogênicos, especialmente o *T. cruzi*. Contudo, a metodologia para qual o plasmídeo foi originalmente desenvolvido prevê a utilização de fluorescência guiada por bioluminescência, que torna possível a determinação, com precisão, da localização dos parasitos no órgão, para então avaliá-lo por histologia. Dessa forma, realizou-se o experimento com a combinação das duas metodologias.

5.7 AVALIAÇÃO DE INFECÇÃO POR *Trypanosoma rangeli* ATRAVÉS DE BIOLUMINESCÊNCIA

5.7.1 *Trypanosoma rangeli* apresenta padrão de distribuição difuso até a diminuição da carga parasitária

A partir da infecção de camundongos BALB/c com tripomastigotas da cepa Choachí pTRIXrang foi analisado o padrão de distribuição de *T. rangeli in vivo* (Figura 19). Nota-se que a carga parasitária, em todo o animal, diminui drasticamente após o 9 d.p.i., sendo os parasitas indetectáveis a partir do 11º dia de infecção. Esse padrão de infecção é concordante com o observado nos experimentos anteriores de infecção de *T. rangeli* em camundongos, a exemplo do demonstrado no item 5.5.1.

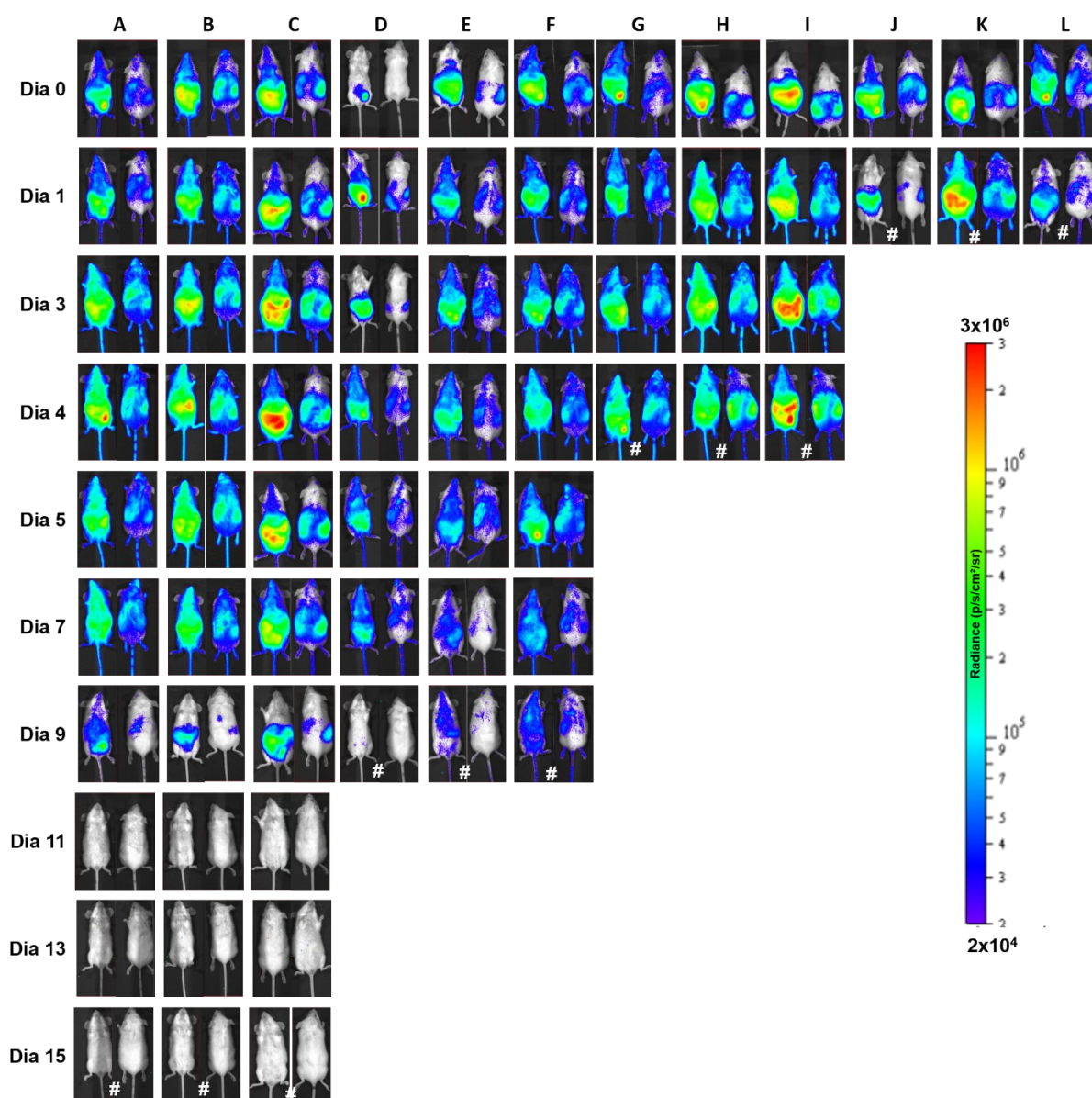
Nos experimentos de avaliação de parasitemia não há como apontar a distribuição ou os sítios preferenciais onde o *T. rangeli* possa se alojar no hospedeiro mamífero. Contudo, através da bioluminescência, verifica-se que os parasitos estão amplamente distribuídos, em conformidade com o padrão de uma alta parasitemia hematogênica até 9 d.p.i., quando a quantidade de parasitos se torna indetectável, possivelmente devido a eliminação pelo sistema imune, como já demonstrado para *T. cruzi* (LEWIS; KELLY, 2016). Deve-se considerar que o limite de detecção da bioluminescência foi experimentalmente definido como sendo de 100 parasitos, apresentando correlação linear da quantidade de parasitos e luminescência a partir de 1000 tanto para *T. brucei*, quanto para *T. cruzi*. Esses dados foram obtidos pela expressão com vetores para *Red-Shifted* Luciferase com pTRIX2 Luc e pTb-AMLuc, precursores de pTRIXrang (LEWIS *et al.*, 2014; MCLATCHIE *et al.*, 2013).

Cabe ressaltar que as configurações utilizadas nesse experimento propiciaram uma análise de alta sensibilidade. Os resultados apresentados na Figura 19A foram obtidos pela aquisição com exposição por 2 min e *binning* médio (de modo simplificado, a configuração de *binning* pode aumentar ou diminuir a sensibilidade da aquisição). Entretanto, todo o experimento também foi adquirido com configuração de maior sensibilidade (*binning Large* e 5 min de exposição). O qual corrobora o dado de menor sensibilidade, de que a partir de 11 d.p.i. não há detecção de parasitos nas fêmeas de BALB/c.

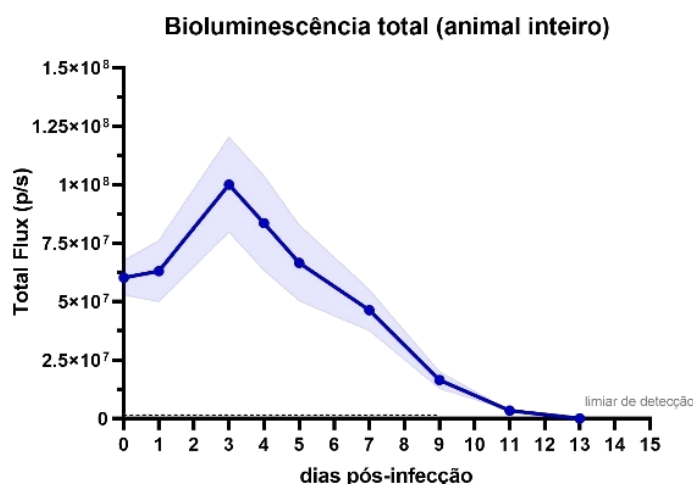
Figura 19 – Dinâmica da infecção e padrão de distribuição de *Trypanosoma rangeli* *in vivo*.

A) Curso da infecção da linhagem Choachí pTRIXrang em camundongos BALB/c avaliado por bioluminescência até 15 d.p.i. Camundongos C, E, F, H, I, K e L tratados com EdU. # indica animais eutanasiados em cada ponto experimental para a análise *ex vivo*. Intensidade de luminescência em log normalizada para todas imagens conforme identificado pela barra *pseudocolor*. **B)** Gráfico da quantificação da luminescência em todo animal (valor ventral e dorsal somados) expresso em média e desvio padrão (linha contínua e área sombreada, respectivamente). Limite de detecção estabelecido pelo *background* de luminescência quantificada dos animais controles (tracejado junto ao eixo X).

A



B



Fonte: Autora.

Com relação ao padrão de distribuição, percebe-se que alguns animais demonstram um forte sinal localizado do ponto de inoculação (quadrante inferior esquerdo no abdômen) nos camundongos A, D, G, H, L e I. Além de regiões viscerais que remetem às posições do fígado e do baço. Entretanto, predomina o sinal difuso por todo o corpo do animal de forma semelhante ao observado durante infecção por *T. brucei* e na fase aguda da infecção por *T. cruzi* (HYLAND *et al.*, 2008), consistente com difusão hematogênica.

5.7.2 Determinação do tropismo tissular de *Trypanosoma rangeli*

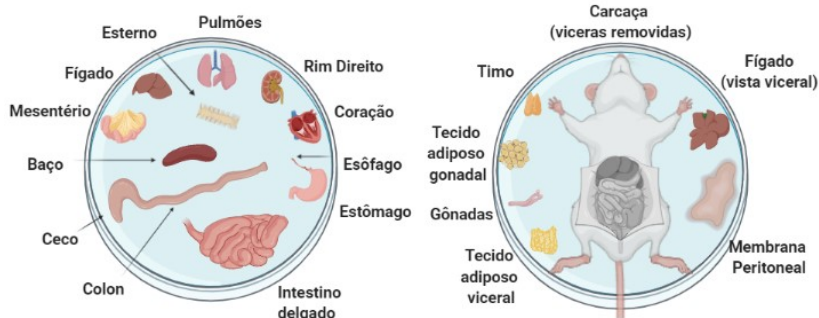
Buscando uma observação detalhada da existência de um tropismo tissular pelo *T. rangeli*, a partir dos resultados apresentados na Figura 19, realizou-se a análise de luminescência *ex vivo*, através da eutanásia e da dissecação dos animais aos 1, 4, 9 e 15 d.p.i., sendo os resultados obtidos apresentados na Figura 20. Além do experimento realizado com o grupo de fêmeas, foi realizado um experimento piloto com machos (Figura 21).

Figura 20 – Pulmões e baço são os maiores focos de infecção por *Trypanosoma rangeli*.

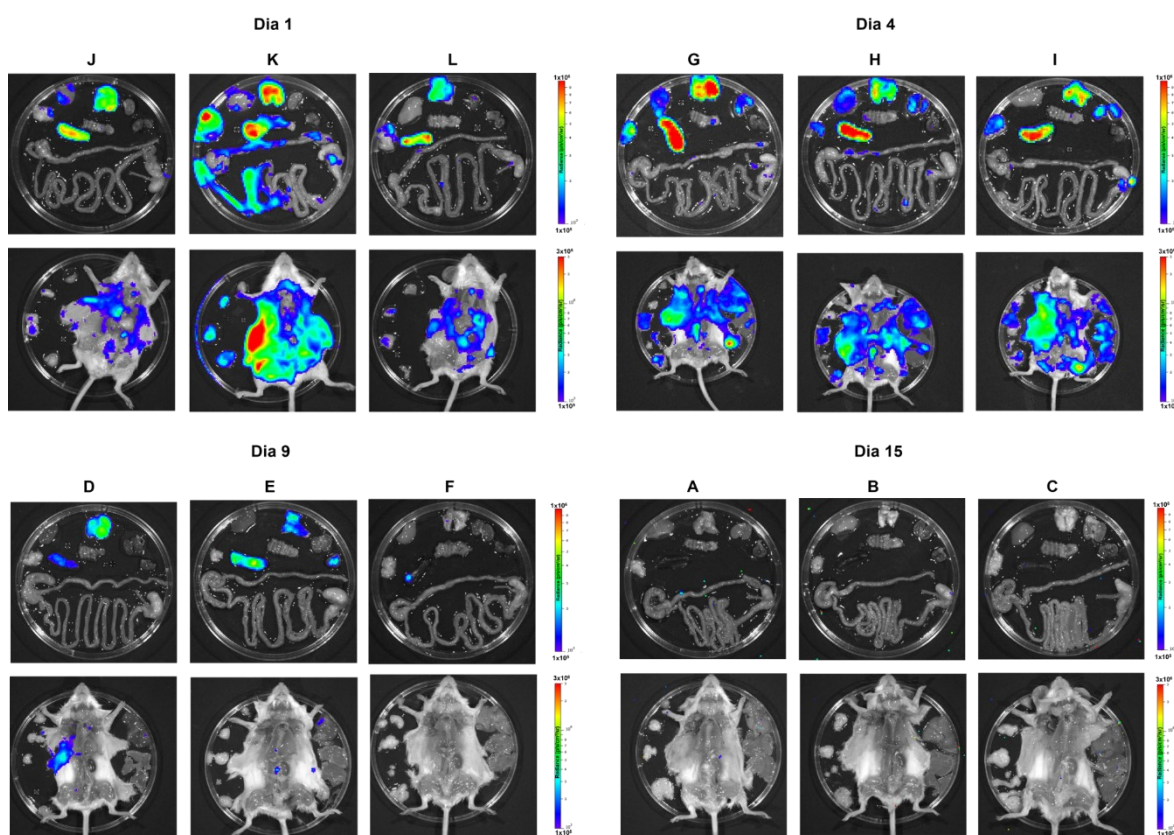
Análise de bioluminescência de órgãos e carcaça de camundongos BALB/c infectados com a linhagem Choachí pTRIXrang. **A)** Desenho esquemático da descrição dos órgãos e respectivos posicionamentos na placa de Petri. **B)** Imagens *ex vivo* da luminescência emitida por Choachí pTRIXrang nos dias 1, 4, 9 e 15 d.p.i. Camundongos C, E, F, H, I, K e L tratados com EdU. Escala normalizada de radiância em log e parâmetros de escala *pseudocolor* para órgãos: 1x10⁵ a 1x10⁶ e

carcaça: 1×10^5 a 3×10^6 . **C)** Gráfico da quantificação de radiância de ROI expressos pela razão infectado/controle, de cada órgão demonstrado na figura B.

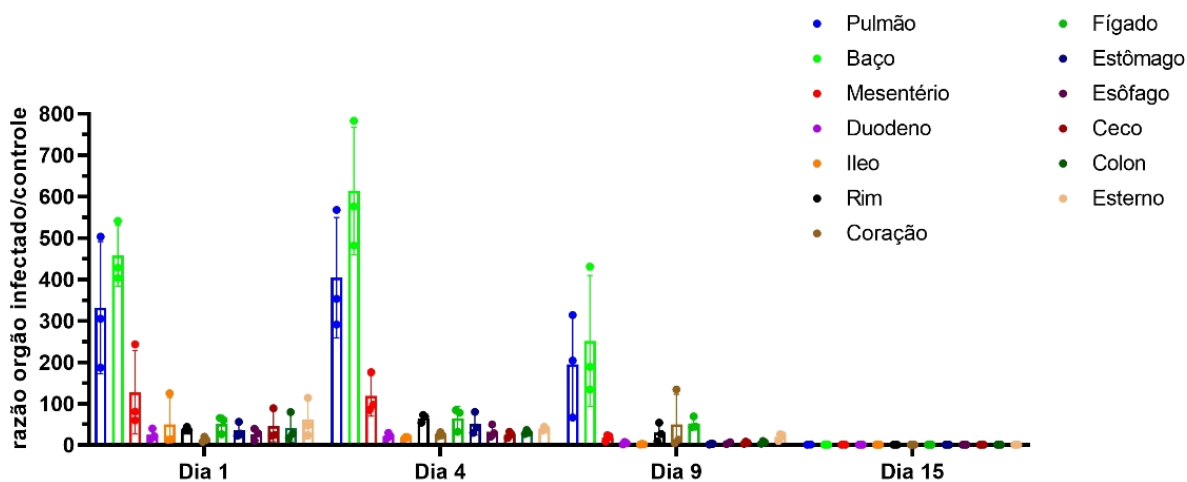
A



B



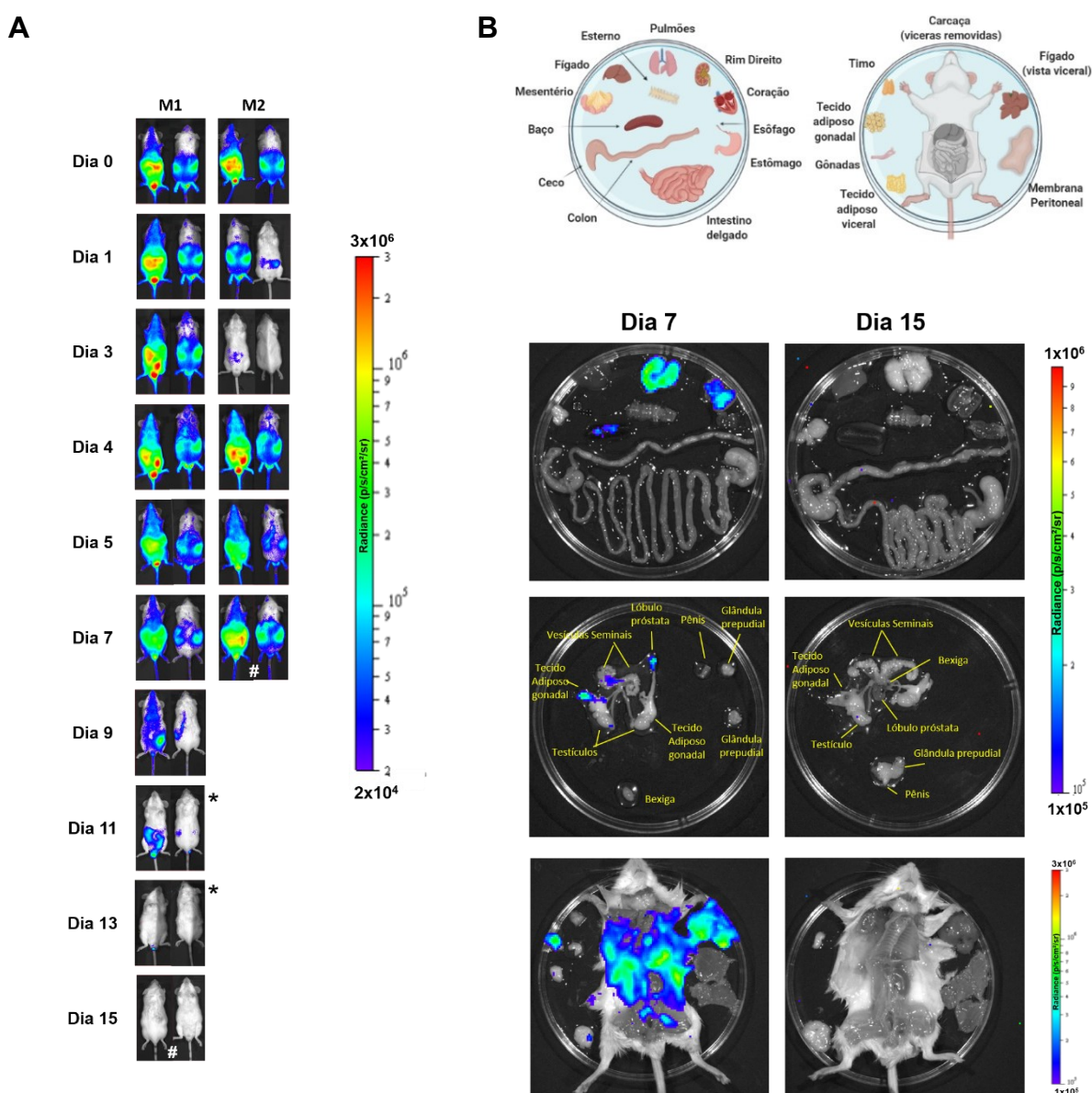
C



Fonte: Autora.

Figura 21 – A infecção por *Trypanosoma rangeli* apresenta um padrão de distribuição distinto conforme o sexo dos animais infectados

A) Bioluminescência *in vivo* de camundongos BALB/c machos. *imagens obtidas de configuração de maior sensibilidade (5 min e *large binning*) nas quais foi aplicada a escala de radiância min: 3×10^3 máx: 3×10^4 Para as demais imagens, escala de radiância indicada pela barra *pseudocolor*. # indica eutanásia em cada ponto experimental para a análise *ex vivo*. **B)** Análise *ex vivo*, com destaque para o sistema reprodutor masculino, com identificações dos tecidos na imagem. Escala normalizada de radiância: órgãos viscerais e reprodutores = 1×10^5 a 1×10^6 ; carcaça 1×10^5 a 3×10^6 . Detalhe superior: Legenda da disposição dos órgãos viscerais.



Fonte: Autora.

Alguns fatores podem ser citados como interferentes na detecção da análise *in vivo* por bioluminescência. Quanto mais profundo ou rígido forem os tecidos no entorno da fonte geradora de luminescência, menor será a detecção. O pelo também é um interferente da análise, mesmo para infecções cutâneas. Assim, a análise *ex vivo* pode revelar focos de infecção, mesmo quando não há sinal aparente nas análises *in vivo*, como é o caso que se observa na fase subpatente da infecção.

A análise dos resultados *ex vivo* nos permitiu observar que o baço e os pulmões são os sítios de maior concentração do *T. rangeli* no hospedeiro mamífero. Através do experimento piloto com machos, foi possível identificar um padrão diferente de dispersão do parasito em camundongos BALB/c machos e fêmeas, havendo persistência de sinal do saco escrotal. Pela análise *ex vivo* identificou-se a próstata e o tecido adiposo gonadal como os sítios de infecção de origem do sinal nessa região anatômica. Entretanto, não houve diferença entre machos e fêmeas quanto à bioluminescência do animal inteiro, que é referente à carga parasitária total (Student *t*-test, $p= 0,0864$). Da mesma forma que as fêmeas, o baço e os pulmões são os órgãos de maior concentração do parasito nos machos, nos permitindo inferir que *T. rangeli* possui tropismo por esses órgãos, independentemente do sexo do hospedeiro.

Ao serem concatenados os resultados de parasitemia e luminescência do sangue periférico (Figura 16) com os dados de luminescência *in vivo* e *ex vivo*, concluiu-se que a eliminação do parasito da corrente sanguínea, coincide com a diminuição da luminescência total e a ausência de detecção *ex vivo*. Assim, a diminuição da quantidade de parasitos na corrente sanguínea, não é devido a concentração do parasito em nenhum sítio anatômico. Mas sim, pela eliminação do parasito pelo sistema imune (*clearance*). Não se pode afirmar que a eliminação do parasito ocorre de forma completa, mas certamente em quantidades inferiores ao limite de detecção da técnica (100 parasitos) (LEWIS *et al.*, 2014). De forma que é possível que, mesmo na ausência de detecção de sinal, ainda haja persistência de infecção. Tampouco, pode-se determinar com certeza por quanto tempo ou em que local esses parasitos remanescentes se alojam, visto que essa hipótese ultrapassa a capacidade de mensuração da técnica.

Durante a dissecação de camundongos infectados, percebe-se a hiperplasia do baço, onde foram detectados os sinais mais fortes da presença do parasito. Em alguns animais, o baço se desloca da posição normal, inteiramente posterior ao

estômago, para assumir a posição látero-anterior (dados mostrados no tópico 9.6.2). Recentemente, Ferreira *et al.* (2020), descreveram o baço e os linfonodos como sendo os principais focos de infecção de *T. rangeli* pela presença de DNA do parasito, relatando alterações como o peso do órgão e reconhecimento do parasito por anticorpos no interior de esplenócitos. Dessa forma, um grupo de pesquisa independente e com métodos distintos corroboram os dados encontrados do envolvimento do baço na infecção por *T. rangeli*.

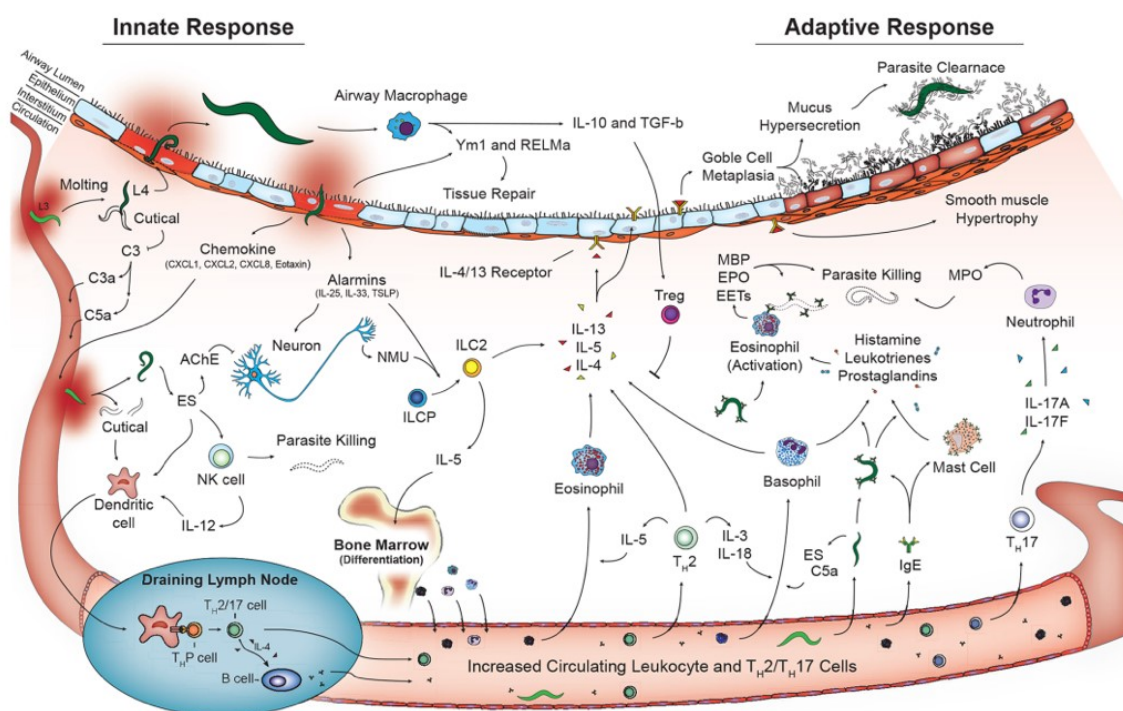
Contudo, os pulmões são uma descoberta ímpar. Em parceria com a LSHTM, Jayawardhana e Lewis encontram sinal luminescente no pulmão e baço de camundongos SCID infectados com Choachí pTRIX2-Luc em um ensaio piloto (comunicação pessoal). Em outro momento, com a cepa TRE pTRIX2-Luc::Neon foram infectados camundongos SCID e BALB/c que apresentaram sinal no tórax, abdômen e no ponto de inoculação, não havendo detalhamento *ex vivo*. Inicialmente, esses resultados não foram considerados válidos pela baixa taxa de diferenciação do parasito e pela instabilidade da transfecção das cepas utilizadas. Entretanto, à luz dos resultados obtidos no presente estudo e considerando a histologia com a identificação de tripomastigota no pulmão e bioluminescência com cepa plenamente diferenciada com expressão de Luc::Neon estável, conclui-se que o pulmão também é um dos sítios preferenciais de infecção por *T. rangeli* (Figura 22A).

Em comparação a outras espécies, podem ser citados os relatos de infecção no pulmão por *T. cruzi*, apenas durante a fase aguda, sem a persistência do parasito nesse sítio por período superior à 30 dias (GUARNER *et al.*, 2001; SILBERSTEIN *et al.*, 2018). Tavares *et al.* (2017), através de infecção intravenosa de amastigotas de *Leishmania infantum* bioluminescente, observaram o acúmulo de sinal nos pulmões, fígado e baço, atribuindo esse resultado à fagocitose por macrófagos resistentes nesses órgãos (TAVARES *et al.*, 2017). Em parasitologia, a descrição da migração de helmintos para os pulmões é bem relatada. Várias espécies necessitam do ambiente pulmonar para diferenciação de estágios larvais, gerando forte resposta imune, não envolvendo apenas o macrófagos, mas um complexo sistema celular, como demonstrado na Figura 22A (GREEN, 1968; WEATHERHEAD *et al.*, 2020).

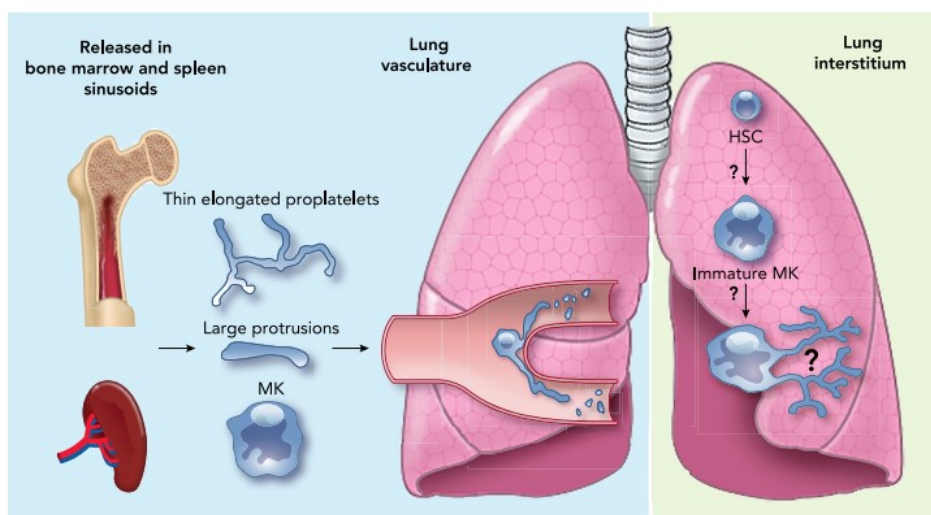
Figura 22 – Hipóteses relativas ao tropismo *Trypanosoma rangeli* pelo baço e pulmão de mamíferos.

A) Esquema representando a ação da resposta imune inata e adaptativa frente às infecções helmínticas no pulmão. **B)** Resumo gráfico da capacidade de biogênese plaquetária pela medula, baço e pulmões, revelando aspectos em comum desses órgãos.

A



B



Fontes: Weatherhead *et al.* (2020) e Lefrançois e Looney, (2019).

O tropismo de *T. rangeli* pelo baço e pulmões nos levaram ao questionamento do que haveria em comum entre órgãos de funções tão diferentes. Remontando a

função de cada um deles, observa-se a recente comprovação da biogênese plaquetária no pulmão. A presença de megacariócitos residentes na medula e no baço, órgãos relacionados à clássica descrição da formação de plaquetas. Através dos prolongamentos emitidos pelos megacariócitos, ocorre o desprendimento das plaquetas pelos ramos chamados pró-plaquetas dentro da corrente sanguínea. Entretanto, Lefrançais *et al.* (2017) descreve a migração dos megacariócitos provenientes da medula óssea, também, para o pulmão e a maturação de megacariócitos a partir de células tronco, mantendo populações residentes no pulmão (Figura 22B) (LEFRANÇAIS *et al.*, 2017; LEFRANÇAIS; LOONEY, 2019). Vale lembrar que o esterno também apresentou luminescência na análise *ex vivo*, ainda que em menor intensidade se comparado aos demais órgãos. A visualização de formas amastigotas-*like* na medula esternal em nossas análises histológicas vem ao encontro dessa hipótese dos mecanismos de tropismo do *T. rangeli* por esses tecidos.

Contudo, com base no modelo experimental de camundongo BALB/c, a infecção por *T. rangeli* parece não ser persistente, ou, mantida com uma quantidade de parasitos abaixo de limite de detecção da bioluminescência (LEWIS *et al.*, 2014; MCLATCHIE *et al.*, 2013). Osorio *et al.* (1995) sugerem que o *T. rangeli* assume um estado encriptado, pois é capaz de sobreviver no interior de macrófagos por sete dias e infectar *R. prolixus* alimentado com essas células. Sanchez-Valdez *et al.* (2018), descrevem a ocorrência de amastigotas não replicativas na infecção por *T. cruzi*, atribuindo à essas formas a falha terapêutica do tratamento da doença de Chagas. E ainda demonstram a capacidade *in vitro* dessas amastigotas dormentes se diferenciarem em tripomastigotas. Dessa forma, seguindo a linha de hipótese de Osório *et al.* (1995) e considerando a clonalidade da população desses parasitos, é possível que ao longo das primeiras semanas de infecção, o *T. rangeli* se adapte ao hospedeiro e uma população muito pequena assume o estado quiescente no pulmão e no baço, enquanto as demais populações são eliminadas pelo sistema imune. Uma vez em estado quiescente, o metabolismo do parasito é reduzido afetando a expressão do *dual-reporter*, que está condicionado à síntese de ribossomo, como foi descrito para *Leishmania mexicana* (KLOEHN *et al.*, 2015). E ainda, durante o estado letárgico há a diminuição da quantidade de adenosina trifosfato (ATP) disponível, o que interfere na atividade catalítica de luciferase, contribuindo para a não detecção do parasito (BRANCHINI *et al.*, 2017).

6 RESUMO DOS RESULTADOS – CAPÍTULO I

- A adaptação do vetor pTRIX2-Luc::Neon – Hyg com as sequências do *locus* rRNA de *T. rangeli* foi bem sucedida, gerando o plasmídeo pTRIXrang, capaz de integrar ao genoma do parasito;
- pTRIXrang promove a expressão constitutiva e intensa dos genes Luciferase e mNeonGreen de forma fusionada, gerando populações homogêneas e estáveis por meses, mesmo na ausência da droga de seleção;
- A transfecção com pTRIXrang não altera nenhuma característica biológica de *T. rangeli*, mantendo os parasitos transfectados o mesmo comportamento *in vivo* e *in vitro* das linhagens selvagens;
- O ensaio *in vitro* de luciferase pode ser utilizado como um método alternativo ou complementar de determinação da parasitemia sanguínea (Método Pizzi-Brener), possuindo sensibilidade compatível e permitindo aferir a viabilidade dos parasitos;
- De acordo com a bioluminescência, as infecções por *T. rangeli* não persistem em hospedeiro murino em grande quantidade de parasitos, após de 13 dias;
- Os pulmões e baço são os órgãos de maior acúmulo de *T. rangeli* em mamíferos durante a fase aguda da infecção;
- Foi observado tropismo de *T. rangeli* por tecidos do sistema reprodutor masculino – próstata e tecido adiposo gonadal, sem afetar a carga parasitária total.

CAPÍTULO II

Caracterização das glicoproteínas mucina-*like* de *Trypanosoma rangeli*

7 OBJETIVOS II

Caracterizar as mucinas de *T. rangeli* a partir da superexpressão de *TrMUCg1*, *TrMUCg3*, *TrMUCp35* em comparação à expressão heteróloga de mucinas do tipo I (*TcMUCI*) e do tipo II (*TcMUCII*) de *T. cruzi*.

Objetivos específicos

- I. Realizar a análise descritiva e comparativa *in silico* de mucinas de *T. rangeli* em relação às mucinas expressas por outros tripanosomatídeos;
- II. Caracterizar fenotipicamente *T. rangeli* superexpressando *TrMUCg1*, *TrMUCg3* e *TrMUCp35* e expressando de forma heteróloga *TcMUC I*, *TcMUC II* e *TcTS* ativa quanto aos sítios e níveis de expressão;
- III. Analisar a interação *in vitro* dos parasitos transfectados com linhagens celulares fagocíticas e não fagocíticas em relação à cepa parental e linhagem transfectada com vetor vazio;
- IV. Avaliar a dinâmica de infecção dos parasitos expressando as mucinas fusionadas à FlagGPI no hospedeiro mamífero e triatomíneo em comparação à cepa parental e linhagem transfectada com vetor vazio.

8 MATERIAIS E MÉTODOS

8.1 CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DE MUCINAS DE *Trypanosoma rangeli*

As sequências nucleotídicas de mucinas de *T. rangeli* foram obtidas do banco de dados interno do grupo de pesquisa (descrito em 4.3.1), a partir do alinhamento por BLASTn com sequências que codificam o peptídeo sinal das mucinas TR06796 (TritrypDB) e AGN32981.1 (GenBank) (BARTHOLOMEU *et al.*, 2009; DI NOIA *et al.*, 1998). Uma vez que, ainda não foi realizada a predição gênica nessa versão do genoma, as sequências nucleotídicas de mucinas foram determinadas com base na localização genômica de cada hit obtido por BLAST em relação às posições das possíveis regiões abertas de leitura (ORF – do inglês *Open Reading Frame*) obtidas através da ferramenta *getorf* (EMBOSS) (RICE; LONGDEN; BLEASBY, 2000), a partir da qual foi possível obter as sequências nucleotídicas e aminoacídicas das mucinas de *T. rangeli* (*TrMUC*).

Para classificação das sequências aminoacídicas preditas *in silico* como mucinas putativas, foram considerados como elementos canônicos a presença de (i) peptídeo sinal *N*-terminal, sendo sua predição obtida com o programa *TargetP* v1.1 (EMANUELSSON *et al.*, 2000), *SignalP* v4.1 e *SignalP* 5.0 (PETERSEN *et al.*, 2011); (ii) presença de âncora GPI, avaliada pelo preditor *PredGPI* (PIERLEONI; MARTELLI; CASADIO, 2008) e (iii) sítios de *O*-glicosilação, preditos através do programa *NetO-glyc* 4.0 (STEENTOFT *et al.*, 2013), aplicando os critérios padrão de cada programa. Para as análises comparativas por alinhamento foram utilizados os programas BLAST (NCBI) e *Clustal Omega* (EMBL-EBI). Com base nos alinhamentos globais foram realizadas as análises de: (i) identidade e similaridade pela ferramenta SIAS (do inglês *Sequence Identity and Similarity*) (<http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html>), sendo valores expressos em média e desvio padrão ponderados pela sequência de menor tamanho; (ii) motivos conservados utilizando o servidor *Gblocks* (CASTRESANA, 2000); (iii) análise filogenética através da ferramenta *FastTree* (PRICE; DEHAL; ARKIN, 2010) com visualização e edição da árvore filogenética através da ferramenta *online Interactive Tree Of Life* (iTOL) v6 (LETUNIC; BORK, 2019) e (iv) representação gráfica dos padrões característicos pela ferramenta *Skyalign* (WHEELER; CLEMENTS; FINN, 2014), gerando logos da medida de conservação do resíduo em função da frequência dos resíduos em uma determinada

posição (ocupação). As representações gráficas das proteínas foram desenhadas no programa *IBS* 1.0 (LIU *et al.*, 2015).

Os dados sumarizados em diagrama de Venn foram gerados pela ferramenta *online* disponibilizada por Van de Peer Lab (Universidade de Ghent, Bélgica) (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

Para execução dos BLAST n , obtenção de ORF, análise de presença de peptídeo sinal (TargetP) e análise filogenética foi utilizado o *System for Integrated Genomic Resources and Analyses* (STINGRAY) através da plataforma *Galaxy* (WAGNER *et al.*, 2014) disponibilizado e administrado pelo laboratório de Bioinformática UFSC.

A determinação da abundância de aminoácidos foi realizada através da ferramenta *ProtParam* (Swiss Institute of Bioinformatics) e *Sequence Manipulation Suite: Protein Stats* (Universidade de Alberta, Canada) (STOTHARD, 2000), obtendo como resultado a porcentagem de cada aminoácido nas proteínas analisadas. As análises estatísticas e geração de gráficos foram realizadas no programa *GraphPad Prism* 8.4.0.

Para análises de sequências similares no genoma de *T. cruzi*, foi utilizada a ferramenta BLAST_{beta} (TritypDB), utilizando como *query* as sequências aminoacídicas de *TmMUC* contra o banco de dados de *T. cruzi* CL Brener Esmeraldo-like (depositado em Dezembro/2015). Foram considerados os resultados com *e-value* < 1×10^{-4} e cobertura > 50%. Para avaliação da distribuição dos genes nos *scaffolds* de *T. rangeli* foram registradas as posições dos genes *TmMUC* e avaliados 30 kb do entorno do conjunto de genes *TmMUC*, considerando fitas senso ou anti-senso que codificam as mucinas encontradas. Ambas as fitas foram analisadas apenas nos *scaffolds* em que foram identificadas *TmMUC* nas duas orientações.

8.2 GERAÇÃO DE PARASITOS GENETICAMENTE MODIFICADOS

8.2.1 Desenvolvimento do vetor FlagGPI

A fim de obter uma ferramenta que possibilitasse (i) o reconhecimento das diferentes mucinas envolvidas neste trabalho, (ii) a purificação de mucinas expressas por *T. rangeli* por cromatografia de afinidade e (iii) que auxiliasse na determinação da citolocalização através de proteína fluorescente fusionada, foi encomendada a síntese do gene sintético “FlagGPI”, o qual foi recebido clonado no vetor pUC57 – Amp⁺

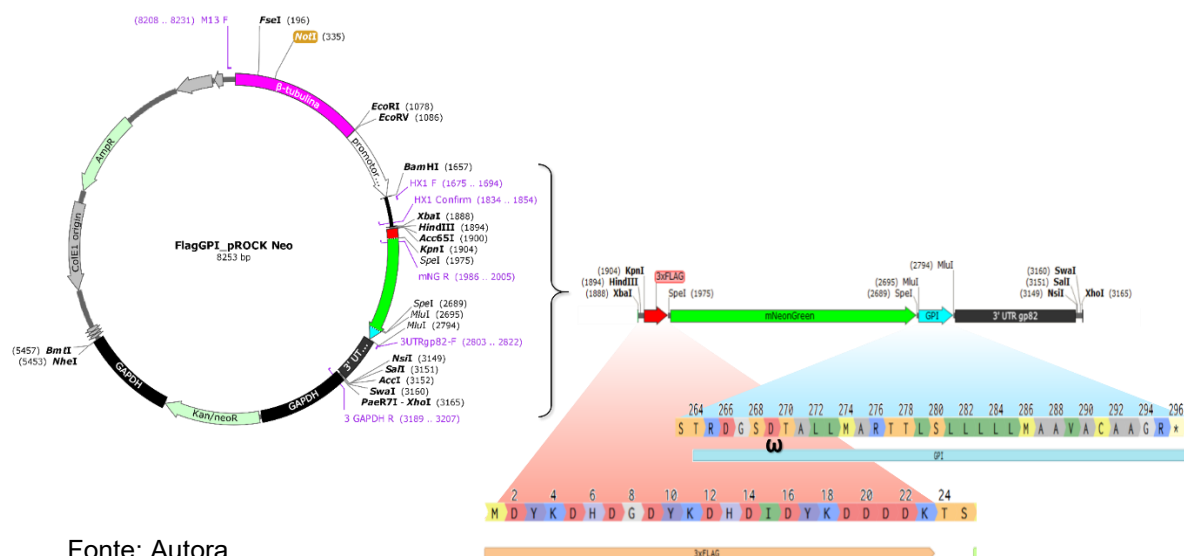
(Biomatik). A exemplo da abordagem adotada por Canepa *et al.* (2012), as mucinas foram expressas de forma fusionada às sequências que codificam para:

- 3xFlagTag® (DYKDHD-G-DYKDHD-I-DYKDDDDK) reconhecida pelo anticorpo monoclonal M2 (Sigma-Aldrich) (EINHAUER; JUNGBAUER, 2001);
- Proteína fluorescente *mNeonGreen* (SHANER *et al.*, 2013);
- Âncora GPI de *T. rangeli* proveniente do gene AGN32981.1 (GenBank) (WAGNER *et al.*, 2013);
- Sequência 3' UTR do gene de gp82 de *T. cruzi* utilizada em estudos prévios do grupo de pesquisa (SCHLINDWEIN; STOCO, 2014).

A sequência sintética foi subclonada no vetor pROCK-Neo (DAROCHA *et al.*, 2004), em substituição ao gene da eGPF do vetor de expressão. Esse vetor foi originalmente construído para *T. cruzi*, e por isso todos os elementos da maquinaria de expressão são oriundos dessa espécie. Contudo, trabalhos anteriores com *T. rangeli*, demonstraram a compatibilidade do vetor, em termos de expressão dos insertos e integração no locus β -tubulina *T. rangeli*. Dessa forma, gerou-se o plasmídeo FlagGPI-pROCK-Neo, representado na Figura 23, com detalhe da representação do gene sintético ao qual às mucinas foram fusionadas.

Figura 23 – Plasmídeo FlagGPI-pROCK-Neo para expressão do gene FlagGPI.

Mapa do vetor FlagGPI-pROCK-Neo. Regiões de ligação dos iniciadores descritos na Tabela 3 em lilás, sítios únicos de clivagem em negrito; Sítio da enzima *NotI* (necessário para linearização para recombinação homóloga) em amarelo. Entre parênteses as distâncias das sequências em pares de base em relação ao início da sequência β -tubulina. No detalhe: Sítios múltiplos de clonagem contendo as enzimas *XbaI-HindIII-KpnI* à montante da sequência 3xFlagTag e jusante de 3' UTR_gp82 os sítios *NsiI-SalI-SawI-XhoI* estrategicamente desenhados para as clonagens deste trabalho e sequências aminoacídicas do peptídeo 3xFlagTag e âncora GPI gerados pela expressão de FlagGPI.



Fonte: Autora.

8.2.2 Planejamento e execução das clonagens

Semelhante ao descrito no tópico 4.3.2, foram sintetizados os iniciadores descritos na Tabela 3 para amplificação dos insertos, visando a clonagem no vetor pGEM e posterior subclonagem no vetor de expressão FlagGPI-pROCK (doravante denominado apenas FlagGPI). A análise dos produtos de amplificação, purificação, clonagem em vetor pGEM e subclonagem foram realizados conforme descrito nos itens 4.3.4., com menores alterações, descritas abaixo: A amplificação dos insertos foi realizada por PCR, utilizando a enzima DNA polimerase *GoTaq* (Promega), com adição manual dos componentes da reação (tampão contendo magnésio, 200 µM de dNTP, 10 pmol de cada iniciador e 1 U *Taq* DNA polimerase e 50 ng DNA molde). As PCR foram submetidas ao programa base (95°C – 5 min, 35 x: [94°C – 60 s / 58°C – 30s / 72°C – 0,5 a 3 min] # 72°C – 10 min).

Para a amplificação das mucinas e trans-sialidases de *T. cruzi* foi utilizado de 50 a 100 µg de DNA genômico das cepas Y e CL Brener, enquanto para as mucinas de *T. rangeli*, foi utilizada a mesma quantidade de DNA da cepa Choachí. Para as clonagens, foram utilizados 7 µl dos insertos purificados e 50 ng do plasmídeo *pGEM-T Easy Vector*[®] (Promega), ligados com enzima T4 DNA ligase (Promega) por 18 h a 16°C, seguida da transformação em *E. coli* DH5α cálcio-competentes. Os clones contendo plasmídeo foram escolhidos por seleção azul e branco em placa de meio LB 250 µg/ml ampicilina, 20 µg/ml IPTG e 20 µg/ml X-Gal) e PCR de colônia com iniciadores M13 F e M13 R.

Todos os insertos clonados foram sequenciados e tiveram suas sequências analisadas para montagem de *contig* considerando a qualidade do sequenciamento pelo pacote *Phred/Phrap* (com apoio do Laboratório de Bioinformática UFSC), seguido de avaliação de identidade conforme descrito em 4.3.2.

Tabela 3 – Iniciadores para PCR convencional utilizados para clonagem de mucinas e trans-sialidases.

	Nome do iniciador	Sequência	Enzima de Restrição	Amplicon	Clonado em
insertos	<i>Tc</i> MUC I - s/GPI F	5' – TCTAGAT GATGATGACTTGCCGTCTGCTG	<i>Xba</i> I	314 pb	FlagGPI_pROCK
	<i>Tc</i> MUC I - s/GPI R	5' – GGTACC TTTGCGAAGAAGTGGCGGTG	<i>Kpn</i> I		
	<i>Tc</i> MUCII s/GPI F	5' – TCTAGAT GATGATGACATGCCGTCTGCTG	<i>Xba</i> I	596 pb	FlagGPI_pROCK
	<i>Tc</i> MUCII s/GPI R	5' – AAGCTT CATTTTCGCGAAGACGGGACG	<i>Hind</i> III		
	<i>Tr</i> MUCp35 - s/GPI F	5' – TCTAGAT GGCGATGGCGATGGCGATG	<i>Xba</i> I	897 pb	FlagGPI_pROCK
	<i>Tr</i> MUCp35 - s/GPI R	5' – TCTAGAC GCCTTGCTTTTTGTGTGTTTC	<i>Xba</i> I		
	<i>Tr</i> MUCg1 - s/GPI F	5' – TCTAGAT GATTTTCGCTTTTTTGCCTTTTG	<i>Xba</i> I	920 pb*	FlagGPI_pROCK
	<i>Tr</i> MUCg3 - s/GPI F	5' – TCTAGAT GAAAGCTGAGGAGGTGCC	<i>Xba</i> I	353 pb*	FlagGPI_pROCK
	<i>Tr</i> MUCg1/3 - s/GPI R	5' – GGTACC TTCTCTCAGCCCTCTTCG	<i>Kpn</i> I		
	<i>Tc</i> TS F	5' – TCACTC ATGC ATATGGGAAAACAGTCGTTGG	<i>Nsi</i> I		
<i>Tc</i> TS19 R	5' – GCATCT GTCGACT CAGAAAAAACTGCCGTAAG	<i>Sal</i> I	2,6 kb **	FlagGPI_pROCK	
<i>Tc</i> TS154 R	5' – GCATCT GTCGACT CAGAAAAAACTGCCATAACG	<i>Sal</i> I			
vetor	3UTRgp82-F	5' – GAAATTGCCGTGAGGACTTC		diferentes combinações descritas no texto	
	3UTRgp82-R	5' – GCTCCGCCATCGTCGTGG			
	NeoR F	5' – GATGGATTGCACGCAGGTTC			
	NeoR R	5' – TCAGAAGAAGCTCGTCAAGAAG			
	HX1 F	5' – GGCGGTTAACGAGTTTCTTC			
	HX1 R	5' – AAGACATCATAAAAGAAGTTG			
	M13 R	5' – TCACACAGGAAACAGCTATGAC			
	mNG R	5' – TATCCTCCTCGCCCTTGCTC			
3utr gapdh	5' – AGGTTGTTCTGCAGCGTTG				
auxiliar	Tub_probe F	5' – TCAAGAGCAGTAAGAACAGATG		338 pb	pGEM
	Tub_probe R	5' – AGGAGTACTAGGGGGTGAGC			
	TubulinF	5' – TCAAGAGCAGTAAGAACAGATG		1,7 kb	Integração genoma

*Produto de amplificação gerado com o iniciador *Tr*MUCg1/3 - s/GPI R; ** Produto de amplificação gerado com o iniciador *Tc*TS F
Sítios de restrição em negrito e itálico na sequência do iniciador.

8.3 TRANSFECCÃO

O processo de preparação do plasmídeo para as transfecções foi realizado através da completa linearização de 10 µg de plasmídeo obtido com kit *Wizard Miniprep* (Promega) e enzima de restrição *NotI* (destacada em amarelo na Figura 23).

Para a transfecção, foram utilizadas 5×10^7 epimastigotas da cepa Choachí recém isoladas de passagem cíclica, 10 µg de plasmídeo linearizado e o programa U-33 do equipamento *Nucleofactor® II* (Lonza). Após a transfecção, os parasitos foram adicionados à 2 ml de meio LIT+NNN com 20% SBF a 27,5°C. Após 24 h, foram acrescentados 50 µg/ml do antibiótico de seleção Geneticin (G418), sendo os parasitos repicados semanalmente com a adição de concentrações crescentes do antibiótico até atingir a concentração de 500 µg/ml.

Após o período de seleção, parasitos foram cultivados, em paralelo, na presença e na ausência de G418, por período mínimo de um mês para avaliação de estabilização da transfecção e integração genômica. A avaliação das taxas de crescimento das linhagens foi realizada conforme descrito no item 4.8.

Para as análises moleculares e de infecção, foram considerados como controles experimentais a cepa selvagem de Choachí e a cepa Choachí_FlagGPI, referida como *mock*, por conter o plasmídeo base sem inserção do gene de mucinas.

Os genes de mucinas de *T. rangeli*, bem como de *T. cruzi* utilizados como insertos clonados à FlagGPI e expressos pela cepa Choachí, serão referenciados como “mucinas fusionadas à FlagGPI” para melhor compreensão da metodologia e resultados.

8.4 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DAS MUCINAS FUSIONADAS À FlagGPI

8.4.1 Western Blot

Além das análises de fluorescência direta e citometria de fluxo (tópicos 4.6.1 e 4.6.2, respectivamente) foram utilizadas as técnicas de SDS-Page, Western Blot (WB) e imunofluorescência para avaliação da expressão das mucinas fusionadas à FlagGPI.

Para obtenção dos extratos proteicos totais, aproximadamente 5 ml de cultivo foram centrifugados a $1.270 \times g$ por 10 min à TA, lavados duas vezes em PBS pH 7,4 e solubilizados em tampão de lise (50 mM NaCl, 200 mM Tris-HCl pH 8,0, 1% de Triton

X-100) previamente aquecido à 95°C e acrescido de 1 µl de coquetel de inibidores de proteases (Merck), homogeneizados vigorosamente e mantidos em banho de gelo durante o uso.

A concentração de proteína de todas as amostras foi mensurada pelo método de Bradford (Bio-Rad), com curva padrão de 0 a 4 µg/µl de albumina bovina sérica (BSA) e leitura de absorbância a 595 nm na multileitora TECAN (LAMEB/UFSC). Aproximadamente 50 µg de cada extrato proteico foi misturado à tampão de amostra (20% glicerol, 0,5% azul de bromofenol, 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 4,4% SDS e 2% β-mercaptoetanol) e incubado a 95°C por 5 min. As proteínas foram separadas de acordo com sua massa molecular por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). As concentrações do gel variaram de 8% a 12% (de acordo com a massa molecular da proteína de interesse), sob diferença de potencial de 40 mA por ≈3 h.

Para o Western Blot, as proteínas resolvidas em *SDS_Page* foram transferidas para membranas de PVDF (do inglês *Polyvinylidene fluoride*) (Hybond® – Amersham) por 16 h a 25 V em tampão de transferência (25 mM Tris; 192 mM Glicina e 20% Metanol). Em seguida, as membranas foram coradas com *solução Ponceau* (Ponceau-S 0,1% em ácido acético 10%), descoradas em tampão de *Blotting* (TB) (25 mM Tris HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20) e incubadas em solução de bloqueio (5% leite desnatado em TB) por uma hora à TA e agitação constante. Posteriormente, as membranas foram lavadas cinco vezes com TB e incubadas em solução contendo o anticorpo primário nas diluições apresentadas na

Tabela 4, por 90 min sob agitação branda, seguida de nova etapa da lavagem. As membranas foram incubadas com solução contendo anticorpos secundários conjugados à peroxidase (Sigma-Aldrich) durante 60 min e agitação branda, e novamente lavadas com TB. Após a incubação com reagente *Pierce® ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Fischer Scientific) e a exposição a filmes radiográficos, os mesmos foram revelados utilizando o processador SRX-101A (Konica Minolta Medical & Graphic)

Tabela 4 – Anticorpos e diluições utilizados em ensaios de Western Blot.

Anticorpos primários	Origem	Diluição	Fabricante / Origem
anti- <i>FlagTag</i> M2	camundongo	1:1.000	Sigma-Aldrich
anti-eGFP	camundongo	1:500	Santa Cruz Biotechnology
anti- β -tubulina	coelho	1:1.000	Sigma-Aldrich
Anti-Sia (PAS099Ge01)	camundongo	1:1.500	USCN (Wuhan USCN Business)
Anti-SAPA	camundongo	1:500	Dr. Sérgio Schenkman (UNIFESP)
Anti- <i>iTcTS</i>	camundongo	1:250	Granucci, 2013
Anti- <i>TcTS</i> (sítio catalítico)	coelho	1:500	Dr. Sérgio Schenkman (UNIFESP)
anti-C3b	humano	1:64.000	Complement Technologies

Anticorpos secundários	Conjugado à	Diluição	Fabricante
anti-IgG <i>mouse</i>	peroxidase	1: 5.000	Sigma-Aldrich
anti-IgG <i>human</i>	peroxidase	1: 5.000	Complement Technologies
anti-IgG <i>rabbit</i>	peroxidase	1: 20.000	Sigma-Aldrich

Fonte: Autora.

8.4.2 Imunofluorescência indireta

Formas epimastigotas e tripomastigotas da cepa Choachí selvagem e transfectados para expressão de mucinas fusionadas à FlagGPI foram coletadas, lavadas duas vezes com PBS e, dispostas em lamínulas circulares de 13 mm em placas de 24 poços. Após 20 min, os parasitos foram fixados com 2% de paraformaldeído e os poços lavados com 500 μ l de PBS. Nas linhagens especificadas como permeabilizadas, foi realizada a incubação com 0,5% Triton x-100 por 5 minutos à TA. Após, foram realizadas cinco séries de lavagem com PBS (procedimento aplicado entre todas as etapas do protocolo). Para bloqueio, as células foram incubadas na solução de 2% BSA em PBS, lavadas, e incubadas por 90 minutos com anticorpos primários em 0,5% BSA em PBS (Tabela 5). Após nova lavagem, procedeu-se a incubação com anticorpos secundários por 15 min, seguida de lavagem, coloração do DNA com 1 μ g/ml de DAPI, etapa final de lavagem em PBS e água ultrapura. Por fim, as lamínulas foram aplicadas sobre lâmina com meio de montagem *Hydromount* (National Diagnostics). Para aquisição das imagens foi

utilizado o microscópio confocal Leica TCS SP5 (Laboratório Central de Microscopia Eletrônica - LCME/UFSC).

Tabela 5 – Anticorpos e diluições utilizados nos ensaios de imunofluorescência

Anticorpos primários	Origem	Diluição	Fabricante / Origem
anti-FlagTag M2	camundongo	1:1.00	Sigma-Aldrich
Anti-Proteína ligante de Cálcio flagelar	camundongo	1:100	Dr. Sérgio Schenkman (UNIFESP)
Anti-Dihidrolipoamida desidrogenase	coelho	1:300	Dr. Kevin Tyler (UEA)

Anticorpos secundários	Conjugado à	Diluição	Fabricante
Goat anti-IgG <i>mouse</i>	Alexa Fluor 488	1: 1.000	Thermo Fischer Scientific
Goat anti-IgG <i>mouse</i>	Alexa Fluor 594	1: 1.000	Thermo Fischer Scientific
Goat anti-IgG <i>rabbit</i>	Alexa Fluor 594	1: 1.000	Thermo Fischer Scientific

Fonte: Autora.

8.5 CELL SORTING

Com o objetivo de enriquecer as populações transfectadas, foi realizada a seleção das linhagens de acordo com a fluorescência emitida por mNG. Para tal, foram processados dois tubos de cada linhagem contendo 200 µl de cultivo de epimastigota em 2 ml de PBS pH 7,4, que foram utilizados como *input* no citômetro FACS ARIA II (Plataforma de Citometria de Fluxo – Instituto Carlos Chagas – Curitiba/PR). Foi estabelecido como parâmetro de separação, os parasitos que apresentavam intensidade de fluorescência superior à mediana da intensidade de fluorescência da linhagem FlagGPI. Para cada linhagem foram coletados aproximadamente 1×10^6 parasitos em dois tubos cônicos contendo 500 µl de meio de cultura. Como controle de eficiência da separação, tubos adicionais foram submetidos ao *sorting* e analisados por citometria, atingindo 98% de eficiência imediatamente após o processo de separação.

Após o *sorting*, os parasitos foram centrifugados à 2.000 x *g* por 10 min e transferidos para tubo com meio NNN + LIT com 10% de SFB, 4% solução de antibióticos (concentração estoque: 3,84 U/ml penicilina; 3,84 µg/ml estreptomicina; 7,69 mg/ml ampicilina; 4,6 mg/ml kanamicina; 5,23 mg/ml cloranfenicol), 300 µg/ml G418 e mantidos à 27°C. Depois de 72 h, os parasitos foram analisados por citometria,

para avaliação da manutenção da homogeneidade populacional com base na porcentagem de parasitos fluorescentes, processo esse repetido ao longo de dois meses.

8.6 PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

Para obtenção das mucinas purificadas, foram cultivados de 40 a 250 ml de formas epimastigotas em tubos cônicos ou em garrafas de 75 cm². Ao atingir a fase exponencial de crescimento, os cultivos foram centrifugados a 1.200 x *g* por 10 min e lavados duas vezes em PBS pH 7,4. Ao *pellet* de parasitos foi adicionado 1 a 2 ml de tampão de lise (150 mM NaCl, 0,1% NP40, 1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH 7,6), 10 µl/ml de coquetel de inibidor de protease (Merck) e 50 µM Tosyl-L-lysine Chloromethyl ketone hydrochloride (TLCK). O lisado foi mantido sob leve agitação por 15 min à 4°C e centrifugado a 20.800 x *g* por 15 min a 4°C. O sobrenadante do lisado foi incubado com 150 µl de resina ANTI-FLAG M2 *Affinity Gel* (previamente lavada com 1 ml TBS por duas vezes através de centrifugação a 500 x *g* por 1 min, para remoção do glicerol) por 18 h à 4°C sob leve agitação. Após, a mistura foi aplicada em colunas de purificação *Protino* de 1 ml (Macherey-Nagel). O eluido (*Flow Through*) foi armazenado à - 20°C para nova rodada de purificação e avaliação por WB. A coluna foi lavada por gravidade quadro vezes com 1 ml de TBS, com avaliação da saída progressiva de proteínas inespecíficas por espectrofotometria (absorbância 280 nm). A eluição das proteínas fusionadas à FlagTag foi realizada por competição com 150 µl da solução contendo 300 µg/ml *FLAG peptide* (Sigma-Aldrich) em TBS com inibidor de protease por 3 h a 4°C. Depois da incubação, o eluato 1 (E1) foi coletado e novamente adicionado 150 µl da solução de competição, incubado por 1 h a 4°C, gerando o eluato 2 (E2). Ao final, a resina foi tratada com três volumes de 0,1 M glicina-HCl, pH 3,5 e equilibrada com 1 ml de TBS por cinco vezes. Para reaproveitamento da coluna, essa foi lavada com 10 volumes de solução de armazenamento (50% glicerol e 0,02% azida de sódio) e mantida a 4°C seguindo as recomendações do fabricante de reutilização máxima de três vezes (CARLEVARO *et al.*, 2019; TOMOMORI-SATO *et al.*, 2013). Para avaliação de pureza e rendimento, alíquotas das frações do sobrenadante lisado (SL), *Flow Through* (FT), 1^a e 4^a lavagem (L1 e L4), Eluatos 1 e 2 (E1 e E2) foram quantificadas por Bradford e analisadas por WB.

8.7 ENSAIO DE ATIVIDADE DE TRANS-SIALIDASE

A avaliação da atividade de trans-sialidase foi realizada conforme descrito por Granucci (2013). Para tal, foram coletados $1,2 \times 10^8$ epimastigotas, lavados em PBS pH 7,4 e homogeneizados em 20 μ l de tampão de lise (50 mM NaCl, 200 mM Tris HCl pH 8,0 e 1% de NP-40) com 1 μ l de um coquetel de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich). Desse homogenato, 7,5 μ l foram aplicados na reação contendo 100 mM PIPES /NaOH (pH 7,0); 0,55 mM 3'-Sialilactose (3'-SL) (Sigma-Aldrich); 0,5 mM MUGal (Sigma-Aldrich) e incubada por 45 min à TA. A reação foi parada pela adição de 1 ml de água ultrapura gelada e aplicada sobre coluna contendo 600 μ l de resina Q-Sepharose *Fast Flow* (GE Healthcare) previamente equilibrada com água ultrapura. Nessa reação, o reagente 3'-SL e MUGal atuam como doador e receptor de ácido siálico, respectivamente. Assim, o excesso de MUGal foi removido por três lavagens com 1 ml de água ultrapura e uma lavagem contendo 75 μ l de 1 M HCl. O produto sialilado foi eluído com 450 μ l de 1 M HCl e incubado por 45 min a 95°C. Após, as amostras foram transferidas para gelo, neutralizadas pela adição de 150 μ l de 2 M NaOH e 300 μ l 1 M glicina/NaOH pH 10,0 e homogeneizadas vigorosamente. A reação foi transferida para uma placa de 24 poços e a fluorescência mensurada com excitação 365 nm / emissão 450 nm.

8.8 ENSAIOS DE INFECÇÃO *IN VITRO*

8.8.1 Cultivo de linhagens murinas

A linhagem de fibroblasto de tecido conectivo subcutâneo L-929 (ATCC: CCL-1) foi cultivada em meio RPMI 10% SFB, 10 U/ml de penicilina, 10 μ g/ml de estreptomicina. Através repiques a cada 72 h por tripsinização, as células foram mantidas em garrafas de 75 cm² e em confluência máxima de 90% à 37°C e 5% de CO₂.

A linhagem de macrófago murino RAW 264.7 (ATCC TIB-71) foi cultivada em meio DMEM, suplementado com 10% SFB, 10 U/ml de penicilina, 10 μ g/ml de estreptomicina. Com repiques semanais, através descolamento por *cell scraper*, os macrófagos foram mantidos 37°C e 5% de CO₂ em garrafas de 75 cm², sendo o meio de cultura renovado a cada 72 h.

8.8.2 Considerações do desenho experimental *in vitro*

Para a realização dos experimentos, 1×10^5 células/poço foram semeadas em placas de 24 poços. Para os experimentos de cinética, as células foram semeadas sob lamínula circular 13 mm posicionadas no fundo do poço.

Os experimentos com a linhagem RAW 264.7, foram separados em dois grupos, de acordo com a ativação das células por lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS), a saber: antes da infecção, as células foram lavadas duas vezes com PBS e adicionado 100 ng/ml LPS (Sigma-Aldrich) em meio de cultura por 2 h. Então, foi retirado o estímulo ativador das células através três lavagens com PBS e adicionado novo meio de cultura. No grupo não ativado, o mesmo procedimento de lavagem e substituição do meio foi realizado, sem a adição de LPS.

Devido ao emprego de células murinas nos experimentos deste capítulo, os tripomastigotas foram opsonizados com soro de camundongo fresco (não inativado por calor) e filtrado. Para obtenção do soro, camundongos BALB/c foram anestesiados com Cetamina (150 mg/kg) e Xilasina (15 mg/kg) por via i.p. e realizada a punção cardíaca de seis animais. A filtragem do soro de camundongo foi adotada afim de excluir a possibilidade de contaminação por microrganismos que poderia induzir o viés de ativação da resposta imune não intencional. A presença do componente do sistema complemento C3b no soro filtrado foi verificada no por WB.

8.8.3 Cinética de interação com células de mamífero

Formas tripomastigotas de *T. rangeli* foram diferenciadas *in vitro* (método descrito em 4.10) e opsonizadas em meio RPMI com 50% soro de camundongo fresco e filtrado por 30 min à 37°C. Após a incubação, os parasitos foram lavados em PBS pH 7,4 e colocados em contato com as células com MOI (Relação tripomastigota: célula) de 10:1 para RAW 264.7 e 30:1 L929 e incubados à 37°C e 5% CO₂. Após 2 h, os parasitos não aderentes foram removidos por lavagem com PBS pH 7,4, acrescentado meio de cultura com 10% SFB e novamente incubados a 37°C. Nos tempos de 2 h (imediatamente após a remoção dos parasitos), 5, 8 e 24 h, o meio de cultura foi retirado, os poços lavados duas vezes com PBS e realizada a coloração com kit panótico (Laborclin). As lamínulas foram secas ao ar sobre suporte de papel filtro e montadas sobre lâminas de microscopia com meio de montagem DPx (Sigma-Aldrich).

O experimento com a células L929 foi realizado em triplicata técnica, enquanto os experimentos de RAW 264.7 foram realizados em duplicata para cada grupo avaliado (ativado/não ativado). As contagens foram realizadas por pesquisador(a) independente a fim de minimizar o viés dos dados.

8.8.4 Avaliação de incorporação de ácido siálico

Células L929 foram semeadas em confluência próxima à 100% em placa de seis poços (9×10^5 células/poço) e infectadas com tripomastigotas (MOI 30:1) da cepa Choachí selvagem por 2 h à 37°C, 5% CO₂ em meio RPMI condicionado pela linhagem L929 por 4 h sem SFB. Após o período de interação, o meio de cultura contendo os parasitos foi coletado, centrifugado a 1.200 x g por 10 min e lavado duas vezes com PBS pH 7,4. Após a última centrifugação, o tampão foi completamente retirado e o *pellet* de parasitos armazenado a - 20°C. As células L929 aderidas à placa, foram lavadas duas vezes com PBS pH 7,4, tripsinizadas, suspensas em meio sem soro e centrifugadas. Após a última lavagem, o meio foi completamente removido e o *pellet* de células armazenado - 20°C. Como comparativo, tripomastigotas da cepa Choachí selvagem foram incubados por 2 h apenas com meio condicionado simultaneamente à infecção com células.

As amostras foram submetidas à extração proteica e WB com anticorpo policlonal anti-Sia. Para esse experimento, não houve opsonização dos parasitos. Como controle negativo foi utilizado 5 ml de meio de cultura RPMI precipitado por 3 volumes de acetona gelada, centrifugado a 12.000 x g por 30 min a 0°C. O precipitado foi solubilizado em 100 µl de tampão de amostra. Como controle positivo, foi utilizada a proteína ovoalbumina sialilada (Sigma-Aldrich), gentilmente cedida pelo Dr. André Báfica (UTRATNA *et al.*, 2017; YAMASHITA *et al.*, 1984).

8.8.5 Dosagem de citocinas do sobrenadante

8.8.5.1 Cytometric Bead Array - CBA

Com desenho experimental semelhante ao descrito para a cinética de interação com RAW 264.7, foi realizada a dosagem de citocinas presentes no sobrenadante de macrófagos - ativados e não ativados - após 24 h de infecção com tripomastigotas da cepa Choachí selvagem e transfectadas para expressão de mucinas fusionadas. Após a interação, o sobrenadante foi coletado, centrifugado para remoção dos parasitos remanescentes, transferido para novo tubo e armazenado a

- 80°C.

Para a dosagem das citocinas foi utilizado o kit *BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation*, para a quantificação das citocinas IL-6, IL-10, *Monocyte chemoattractant protein – 1* (MCP-1), Interferon- γ (IFN- γ), TNF, e IL-12p70 (gentilmente cedido por Dr. Juliano Bordignon, Fiocruz Paraná), com adaptações, a saber: Para a curva padrão, foram utilizados 10 pontos obtidos pela diluição de fator 2, a partir da solução *top standard* e *assay diluent* (reagente G). Para a mistura de *beads* foi utilizado o volume de 3,33 μ l de cada *bead*/amostra e adicionado *assay diluent* para volume final de 25 μ l/amostra. A essa mistura foi adicionado igual volume (25 μ l/amostra) do reagente de detecção PE (Reagente B). Então, foi somado aos reagentes 25 μ l de cada amostra diluída. A reação foi incubada por 3 h à TA e protegida da luz, com leves agitações periódicas. Após, 500 μ L de *Wash Buffer* (Reagente F) foi adicionado às reações, e então centrifugadas a 200 x g por 5 min. O sobrenadante foi cuidadosamente coletado e descartado, e as *beads* transferidas para tubo de citometria com 150 μ l de *Wash buffer*. No citômetro de fluxo FACS Canto II (BD Bioscience) (LAMEB/UFSC) a configuração para aquisição foi realizada conforme preconizado pelo fabricante, exceto pelo número de eventos salvos no citômetro, no qual apenas os eventos considerados válidos dentro do *gate* de contagem das *beads* foi salvo, facilitando o processo de análise. Foram estabelecidos o mínimo de 300 eventos por grupo de *beads*. A análise dos dados foi realizada no programa FCAP Array e gráficos gerados no programa *GraphPad Prism 8.4.0*. As amostras de sobrenadante foram diluídas com *assay diluent* (reagente G) na proporção de cinco vezes (valor experimentalmente definido).

8.8.5.2 Extração de RNA e preparo de cDNA para RT-qPCR

Da mesma placa que foram obtidos os sobrenadantes para dosagem de citocinas, foi realizada a extração de RNA da linhagem RAW 264.7 para futura quantificação dos níveis de transcrição de *citocinas*, a saber: as células foram lavadas uma vez com PBS pH 7,4 e lisadas diretamente com 400 μ l QIAzol (Qiagen) por pipetagem vigorosa. O lisado foi transferido para tubo de 1,5 ml e acrescido de 200 μ l de 98% clorofórmio e então, homogeneizados vigorosamente por 15 s. Após, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 min a 4°C, gerando uma fase aquosa e outra contendo o solvente fenólico. A fase aquosa foi transferida para novo tubo e adicionado 500 μ l de isopropanol. As amostras foram novamente submetidas

à centrifugação a 12.000 x g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado por inversão e adicionado 1 ml de etanol 75% gelado, seguido de centrifugação a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C. Novamente, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* contendo RNA foi seco ao ar com tubo invertido sobre papel filtro. O RNA total foi solubilizado em 20 µl de água ultrapura livre de nucleases e armazenado a -80°C. A concentração e pureza das amostras for avaliada no espectrofotômetro Picodrop e 2 µl da amostra submetida a eletroforese em gel de agarose 1%, corado por 1 µg/ml brometo de etídio.

De cada amostra, 1 µg de RNA foi coletado para tratamento com 1 U DNase I (Thermo Fischer Scientific) por 30 min à 37°C, inativada por adição de EDTA e tratamento por 10 min a 65°C. A reação de transcrição foi realizada com kit M-MLV *Reverse Transcriptase* (Promega) conforme instruções do fabricante.

Para a realização do PCR quantitativo, foram desenhados os iniciadores descritos por Overbergh *et al.* (2003) com menores ajustes (conforme descrito em 4.3.2). Na Tabela 6 estão apresentadas as sequências dos iniciadores e os tamanhos esperados dos produtos de amplificação.

Tabela 6 – Iniciadores para amplificação de cDNA de citocinas de camundongo para quantificação por RT-qPCR.

Nome do iniciador	Sequência	Amplicon (pb)
mIL-1b F	5' – CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG	152
mIL-1b R	5' – GATCCACACTCTCCAGCTGCA	
mIL-6 F	5' – GAGGATACCACTCCCAACAGACC	141
mIL-6 R	5' – AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA	
mIL-10 F	5' – GGTTGCCAAGCCTTATCGGA	191
mIL-10 R	5' – ACCTGCTCCACTGCCTTGCT	
mIL-12 p40 F	5' – GGAAGCACGGCAGCAGAATA	180
mIL-12 p40 R	5' – AACTTGAGGGAGAAGTAGGAATGG	
mIFN-gama F	5' – TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA	92
mIFN-gama R	5' – TGGCTCTGCAGGATTTTCATG	
mTNF-alfa F	5' – AAAATTCGAGTGACAAGCCTGTAG	181
mTNF-alfa R	5' – TGGGAGTAGACAAGGTACAACC	
miNOS F	5' – GTGGCTACCACATTGAAGAAG	95
miNOS R	5' – CCATAGGAAAAGACTGCACC	

Fonte: Autora.

8.9 INFECÇÃO EM HOSPEDEIRO MAMÍFERO

8.9.1 Cinética de infecção

O procedimento de infecção em camundongos descrito no item 4.11, foi utilizado no experimento desde capítulo, assim como a avaliação de parasitemia pelo método Pizzi-Brener (tópico 4.11.1). As contagens foram realizadas em conjunto com pesquisadores(as) independentes a fim de minimizar o viés das contagens.

8.9.2 Contagem diferencial de leucócitos

Foi realizado esfregaço sanguíneo a partir do sangue obtido da ponta da cauda dos camundongos aos 4 e 14 d.p.i. As lâminas foram secas ao ar, coradas pela coloração panótico (Laborclin) e as porcentagens relativas de leucócitos estabelecidas a partir da contagem de 100 leucócitos por lâmina. A análise foi realizada em todos os animais de cada grupo experimental (n=7) e grupo controle (n= 4). As contagens foram realizadas por pesquisadores(as) independentes a fim de minimizar o viés das contagens.

8.9.3 Histopatologia

Nesse experimento, dois camundongos por grupo foram eutanasiados por anestesia profunda (150 mg/kg de Cetamina e 15 mg/kg Xilasina) e punção cardíaca com seringa contendo 20 µl de 3,8% citrato de sódio. A veia axilar direita foi seccionada para perfusão do animal por injeção de 10 a 15 ml de PBS no ventrículo direito. Para coleta de material, foram escolhidos o pico de parasitemia (4 d.p.i.) e a fase subpatente da infecção (14 d.p.i.).

Foram processados para histologia, os seguintes órgãos: Pulmão direito, mesentério, tecido adiposo gonadal (gordura branca), timo, esterno, tecido adiposo inguinal (gordura bege), baço e tecido adiposo interescapular (gordura marrom). Esses órgãos, foram acondicionados em cassetes histológicos, fixados com 10% formalina tamponada (solução de formol em PBS) e enviados ao laboratório Vertá (Curitibanos/SC) onde as amostras foram processadas para histologia convencional, sendo coradas por hematoxilina e eosina. Para análise, quatro cortes com distância de 15 µm entre si foram feitos. A análise histopatológica foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Álvaro Menin (UFSC Curitibanos) buscando a identificação de focos inflamatórios, os quais foram definidos pela presença de infiltrados com ≥ 15

leucócitos. Para a graduação das lesões foram observados 50 campos na objetiva de 100x, classificando a inflamação tecidual como: Leve ≤ 25 células; Moderado: 26-50 células; Intenso: > 50 células ou ausência de focos inflamatórios.

8.9.4 Dosagem de citocinas de plasma e extrato tecidual de camundongos infectados com *Trypanosoma rangeli*

O plasma foi obtido a partir da coleta de sangue por punção cardíaca realizada nos tempos 4 e 14 d.p.i., descrito no item anterior. Aproximadamente 1 ml de sangue cada camundongo foi coletado e transferido para tubo de 1,5 ml e centrifugado por $1200 \times g$ por 10 min à 4°C . O plasma foi transferido para novo tubo de 1,5 ml e armazenado à -80°C até momento do uso. Para dosagem das citocinas pró-inflamatórias foi utilizado o kit CBA, conforme descrito em 8.8.5.1.

Ao final do experimento (17 d.p.i.) foi realizada a eutanásia de dois animais de cada grupo e excisados os pulmões e baço inteiros. Esses órgãos foram pesados em balança analítica (Katashi) e lisados com macerador de vidro contendo 150 μl de solução de maceração na presença de 1% coquetel de inibidor de protease (Sigma-Aldrich) em PBS estéril pH 7,4. Após a completa disruptura dos órgãos, o homogenato foi transferido para tubo 1,5 ml e adicionados 150 μl de solução de maceração no aparato macerador para completa remoção do conteúdo tecidual, que foi transferido para o mesmo tubo de amostra. As amostras foram centrifugadas a $5.000 \times g$ por 10 min a 4°C , o sobrenadante transferido para novo tubo e armazenado à -80°C .

No dia de execução dos ensaios de citometria, o material foi rapidamente descongelado à 37°C e centrifugado à $500 \times g$ por 10 min à 4°C para remoção adicional de debris celulares. Não foi utilizada diluição das amostras de plasma e extrato tecidual para análise. Foram estabelecidos um mínimo de 300 eventos por citocina. A análise dos dados foi realizada no programa *FCAP Array* e gráficos gerados no programa *GraphPad Prism 8.4.0*. Concentrações iguais ou inferiores a abrangência da curva padrão não foram incluídos na análise, exceto em situações que o controle foi enquadrado nesse parâmetro (0 pg/ml) e amostras testes continham valores válidos.

8.10 INFECÇÃO EM HOSPEDEIRO TRIATOMÍNEO

8.10.1 Inoculação via intracelômica

A infecção do hospedeiro invertebrado por via intracelômica, foi realizada conforme descrito no tópico 4.9, em 50 ninfas de 4º e 5º estágio de *R. prolixus*. Através de avaliações quinzenais, a partir da 3ª semana de infecção, foram observadas a morfologia e motilidade dos parasitos na hemolinfa, migração para glândula salivar e capacidade de transmissão vetorial por alimentação em camundongo. Para cada ponto de coleta foram utilizadas cinco ninfas. Para avaliação da hemolinfa, foi cortada uma das tíbias do vetor com tesoura e aplicada leve pressão no tórax para a coleta da hemolinfa em lâmina ou placa de 24 poços. Quanto a obtenção da glândula salivar, após a coleta da hemolinfa, a cabeça foi gentilmente deslocada em direção oposta ao corpo, removendo o par de glândulas salivares do interior do tórax, que foi disposto sobre a lâmina. As amostras foram mantidas úmidas pela adição de PBS pH 7,4.

Após a observação do material à fresco por microscopia de luz, o material foi distendido para fixação e coloração por Giemsa. Para registro da motilidade e morfologia dos parasitos, foram gravados vídeos no microscópio invertido (Olympus IX83 – LAMEB/UFSC) através do programa *CellSens Dimension 1.12* (Olympus).

Para observação da capacidade de transmissão vetorial, após a identificação dos parasitos na glândula salivar, os insetos foram alimentados por 10 a 15 min com dois camundongos BALB/c anestesiados. Para estimulação de salivação durante a sondagem dos vasos sanguíneos, os camundongos foram periodicamente reposicionados sobre o recipiente de contenção dos insetos. Após 3 dias da alimentação, o sangue dos camundongos foi avaliado a fresco, como descrito em 4.11.1.

8.10.2 Alimentação artificial

Cerca 50 ninfas de 4º e 5º estágio de *R. prolixus* em jejum por 30 dias, foram alimentadas com $1,5 \times 10^8$ tripomastigotas em 4 ml de sangue humano (desfibrinado e inativado) contendo 2 ml de meio DMEM. A ingesta de sangue foi realizada em alimentadores artificiais revestidos com a pele ventral de camundongos e mentidos à 37°C por circulação externa de água aquecida. A alimentação ocorreu por aproximadamente 2 h, sendo o sangue homogeneizado com pipeta Pasteur descartável periodicamente. Foi observada a distensão abdominal das ninfas para

certificação da alimentação de aproximadamente 95% dos insetos. Após a alimentação, as ninfas infectadas foram mantidas à 26°C e umidade relativa do ar de 65%. Para cada linhagem transfectada, diferentes alimentadores artificiais foram utilizados buscando evitar contaminação cruzada.

A partir da 2ª semana pós-infecção, foi iniciada a observação da presença de parasitos nas fezes, hemolinfa e glândula salivar (análise da glândula condicionada a positividade da hemolinfa) de cinco ninfas por ponto de coleta. Para a coleta de amostra de fezes, o abdômen dos triatomíneos foi levemente pressionado sobre a lâmina. Não havendo a defecação espontânea ou sob leve pressão abdominal, a ampola retal foi extraída por tração em direção oposta ao corpo e suavemente macerada sobre a lâmina. Os parasitos foram visualizados a fresco com adição de PBS à amostra. Para avaliação qualitativa foi estabelecido o critério: ausência de parasitos na amostra (\ominus), um ou mais parasitos presentes na amostra (+), um ou mais parasitos esparsamente distribuídos por campo em diversos campos (++) , acúmulo de parasitos em diferentes regiões do campo em diversos campos (+++). O mesmo critério foi aplicado à hemolinfa. Da mesma forma que para infecção intracelômica, houve o registro em vídeo de motilidade e após, distensão em lâmina para coloração por Giemsa. As avaliações das amostras foram realizadas em conjunto com pesquisador(a) independente a fim de minimizar o viés do observador. Os gráficos e análises estatísticas foram realizadas no programa *GraphPad Prism 8.4.0*.

9 RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.1 ANÁLISE DESCRITIVA E COMPARATIVA *IN SILICO* DE MUCINAS DE

Trypanosoma rangeli

9.1.1 Avaliação do grupo *TrMUCg*

Di Noia *et al.* (1998) e Bartholomeu *et al.* (2009), determinaram o número de genes das famílias de glicoproteínas de superfície de *T. cruzi*, através da assinatura presente na sequência que codifica para o peptídeo sinal, que é uma região conservada e de perfil característico para cada família multigênica em *T. cruzi*. Dessa forma, essa abordagem foi aplicada para determinação do número de cópias de mucinas de *T. rangeli*, contra o banco de dados da versão mais recente do genoma.

Desse modo, utilizando como query os primeiros 75 pb da sequência TR06796 (TritrypDB) por BLASTn contra o genoma, foram obtidos cinco hits, sendo todos com *e-value* < 3 x10⁻³¹, cobertura e identidade > 97% em relação a *query*. Visando validar se esses *hits* estão relacionados como mucinas possivelmente funcionais, foi realizada a busca das sequências codificantes completas. A partir das quais, obteve-se as sequências aminoacídicas que foram utilizadas como entrada para as análises de predição dos elementos canônicos, como descrito em 8.1. Essas sequências foram nomeadas *TrMUCg*, por terem sido descritas a partir da sequência utilizada na busca da publicação do Genoma. Todas as cinco sequências, podem codificar mucinas putativas, de quatro tamanhos distintos e possuem 24,43% ± 11,71 de resíduos passíveis de O-glicosilação, como pode ser observado na Tabela 7.

Tabela 7 – Análise de elementos canônicos de mucinas presentes no grupo *TrMUCg*

ID	Posição no Genoma*			Proteína (pb)	Elementos Canônicos		
	<i>Scaffold</i>	Início	Fim		O-glicosilação (%)	Peptídeo Sinal (Sítio)	Âncora GPI (Sítio Ω)
<i>TrMUCg1</i>	41	11508	12197	230	26,09	19-20**/ NV	209
<i>TrMUCg3</i>	41	9165	9587	141	43,26	28-29	117
<i>TrMUCg4</i>	46	153735	153451	95	20,00	26-27	71
<i>TrMUCg6</i>	46	156152	155868	95	21,05	26-27	71
<i>TrMUCg7</i>	46	169886	169326	187	11,76	19-20** / NV	163

* com base na versão do genoma *T. rangeli*-SC58-genome.v2; ** avaliação de sítio de clivagem obtido através SignalP v4.1; NV: Não válido de acordo com SignalP v5.

Fonte: Autora.

As sequências obtidas foram alinhadas em busca da identificação de blocos conservados, a fim de caracterizar motivos específicos (Figura 24).

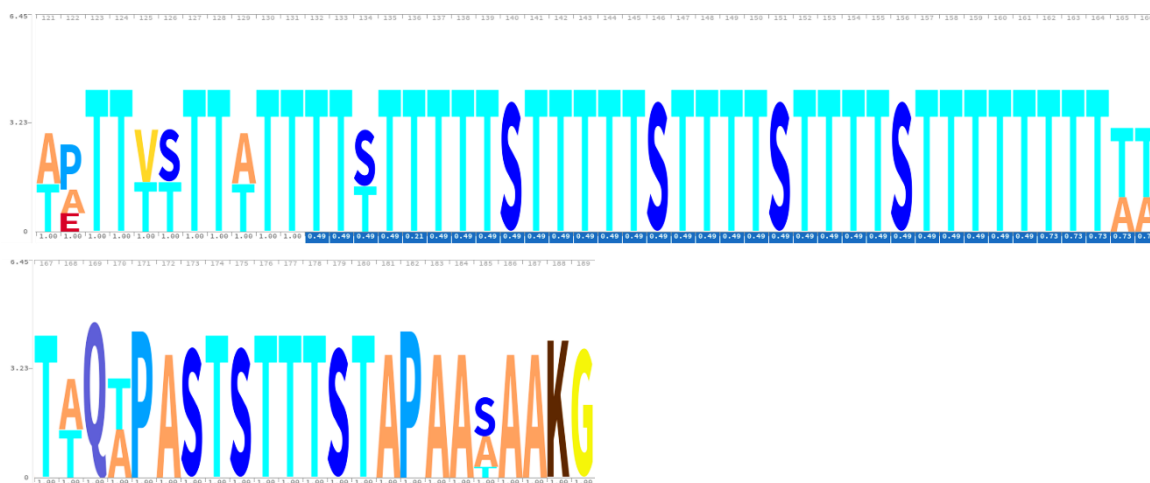
A região entre as posições 90 e 120 do alinhamento é referente a sequência codificada pelos 75 nt utilizados como *query*. Entretanto, para *TrMUCg1* e *TrMUCg7* a predição gênica apontou para um códon de início diferente das demais, predizendo que o início das proteínas ocorreria 90 aa a montante. Além disso, para essas duas sequências foi predito um peptídeo sinal válido nessa porção a montante, com base nos resultados gerados pela ferramenta SignalP v4.1. Isso gerou dúvidas quanto ao que de fato é expresso e processado como peptídeo sinal de endereçamento ao retículo endoplasmático para *TrMUCg1* e *TrMUCg7*. Grande parte dos preditores *in silico* são desenvolvidos baseados em genoma e proteoma de mamíferos. Logo, as análises de sequências de protozoários podem ser erroneamente interpretadas. Isso implica em um viés da extrapolação da análise *in silico* para os processos biológicos, sendo necessárias comprovações experimentais, como será discutido no tópico 9.2.3. Ao longo do andamento deste estudo, uma nova versão da ferramenta SignalP foi disponibilizada (versão 5), em que o algoritmo preditor foi aprimorado (ALMAGRO ARMENTEROS *et al.*, 2019). Ao reanalisar as sequências *TrMUC*, foi observado que para *TrMUCg1* e *TrMUCg7* o peptídeo sinal foi considerado não válido ou ausente, como demonstrado na Tabela 7. Permanecendo da dúvida quanto à predição gênica e consequentemente ao tamanho da proteína real.

Apesar dessas sequências variarem de 95 a 230 aa (sendo a proteína madura 50 aa menor pela clivagem de peptídeos de endereçamento), todas sequências possuem similaridade de 87,83 % \pm 13,24. Para todas os membros de *TrMUCg*, a região de âncora GPI possui o mesmo sítio ω , o que significa a conservação dessa região para esse grupo de mucinas, corroborando com o descrito por Di Noia *et al.*, (1998). No alinhamento, também é possível identificar uma área rica em resíduos de Ser e Thr. Em todas as sequências, o motivo T₂xxT₂xT₂ está presente, e em *TrMUCg1* e *TrMUCg3* é possível destacar uma região de repetições em tandem ST_{4/5}, como demonstrado na Figura 24B.

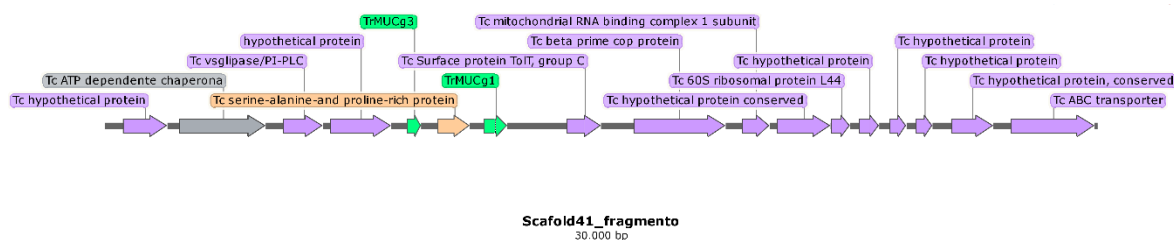
Figura 24 – *TrMUCg* possui os elementos canônicos e motivo conservado exclusivo de *Trypanosoma rangeli*

Alinhamento múltiplo do grupo *TrMUCg*. Sequência predita para peptídeo sinal (bloco laranja claro), regiões ricas em Ser e Thr (bloco amarelo), região conservada exclusiva de *TrMUCg* (bloco verde), região C-terminal que codifica o para âncora GPI (bloco roxo). Disparidade de predição do

B



C



Fonte: Autora.

Também, foi possível identificar um segmento de 23 aa em todas *TrMUCg*, que parece configurar uma assinatura desse grupo. Essa sequência está parcialmente presente em *TcMUC II*, no motivo QAPS (ALLEN; KELLY, 2001). Entretanto, nenhum organismo presente no banco de dados do NCBI ou TriTrypDB possuiu a esse motivo de 23 aa.

Foi realizada a busca por sequências homologas às *TrMUCg* no genoma de *T. cruzi* (genoma CL Brener Esmeraldo-like) por *BLASTp* e foram encontradas correspondências aos genes *TcMUCII* para todos membros de *TrMUCg*, como demonstrado na Tabela 10 no Apêndice desta tese.

Embora, essa versão do genoma ainda não esteja organizada em cromossomos, os *scaffolds*, sozinhos ou por combinação, serão parte componente da organização de cada cromossomo. Assim, infere-se preliminarmente a distribuição dos genes de mucina no genoma de *T. rangeli* e o conjunto de genes adjacentes. Uma vez que se sabe que os genes de *TcMUC* estão intercalados com genes de *TcTS* e

MASP no genoma de *T. cruzi*, foi realizada a análise de organização dos genes de mucina de *T. rangeli*. Os genes de *TrMUCg* estão localizados em dois *scaffolds*. Na Figura 24C é demonstrada a representação do fragmento do *scaffold* 41, onde estão localizados os genes *TrMUCg1* e *TrMUCg3*. Na região analisada, não foram encontrados genes para *TcTS* ou MASP. Entretanto, dos 17 genes encontrados dentro desta região, 13 possuem correspondência a genes contidos no cromossomo 35 de CL Brener *Esmeraldo-like*, distribuídos em ≈ 104 Kb. Apesar de *TrMUCg1* e *TrMUCg3* corresponderem a genes de *T. cruzi* pertencentes a outros cromossomos (Chr 18, 29, 33), dentro da área observada do cromossomo 35 de CL Brener, estão contidos genes *TcMUC I*, *TcMUCII* e MASP, mas não *TcTS*. Interessantemente, entre os genes *TrMUCg1* e *TrMUCg3*, foram identificadas sequências que codificam para os genes *TcSAP* (do inglês *Serine-, Alanine-, and Proline-Rich Protein*) que são proteínas expressas por tripomastigotas metacíclicos na superfície e promovem mobilização de Ca^{2+} no hospedeiro (BAIDA *et al.*, 2006); proteína de superfície *ToIT* tipo C, também expressa por tripomastigotas e descrita como alvos para sistema imune durante a infecção por *T. cruzi* (LOBO *et al.*, 2018); e GPI-fosfolipase C expressa por *T. cruzi*, mas notoriamente descrita pela ação da clivagem de VSG em *T. brucei* sobre condições de estresse (BÜLOW; OVERATH, 1986; CARRINGTON *et al.*, 1998).

Essa análise preliminar de sintenia indica que a mucinas de *T. rangeli* estão alocadas no genoma em conjunto a outras proteínas de superfície expressas por formas tripomastigotas, ao menos em *T. cruzi*, sendo possível que alguns desses genes sejam expressos em conjunto de forma policistrônica.

9.1.2 Análise do grupo *TrMUCp*

Interessantemente, dentre as sequências *TrMUCg* não foi encontrada a sequência de mucina descrita no proteoma de superfície de *T. rangeli* (AGN32981.1-GenBank) (WAGNER *et al.*, 2013), indicando que a mucina de 33 kDa descrita por Wagner *et al.* (2013) pertence a um grupo distinto. Assim, a mesma abordagem de busca foi realizada com a sequência do peptídeo sinal de AGN32981.1. Essa sequência codifica para um peptídeo sinal com sítio de clivagem no resíduo 31. Logo, o BLASTn foi realizado utilizando os primeiros 93 nucleotídeos da sequência como *query*. Nessa segunda abordagem, foram considerados válidos os resultados com *e-value* $< 1 \times 10^{-4}$, obtendo 188 *hits*. Desses, 12 *hits* foram excluídos por não

corresponderem à localização de uma ORF e outros 16 *hits* corresponderam a posições com ORF em duas fases de leitura. Assim, foram obtidas 192 sequências codificantes que foram analisadas quanto a presença dos elementos canônicos, conforme sumarizado no diagrama da Figura 25A. Desse modo, um novo grupo de mucinas pode ser identificado em *T. rangeli* contendo 88 genes (Tabela 11 no Apêndice). Devido a origem da sequência advir do Proteoma de *T. rangeli*, o grupo foi denominado *TrMUCp*, seguindo a mesma lógica de nomenclatura do grupo *TrMUCg*.

Essas sequências possuem similaridade média de apenas 38,39 % ± 18,06 entre si. Quando realizada a análise por BLASTp contra a sequência AGN32981.1, alguns membros alinham somente com a porção N-terminal correspondente ao peptídeo sinal, denotando grande variabilidade entre as sequências, fato já esperado para essa família gênica. Dessa forma, foi realizada a análise filogenética, com base na sequência proteica, a fim de identificar subgrupos em *TrMUCp* e possibilitar a comparação das sequências em busca de motivos conservados. Nessa análise foram distinguidos 9 subgrupos (*TrMUCp* A – I) (Figura 25B).

A proteína detectada no proteoma de superfície corresponde à sequência denominada *TrMUCp35*, alocada no subgrupo H. A título de demonstração do grupo *TrMUCp*, o alinhamento desse subgrupo é demonstrado na Figura 25C.

De forma semelhante à *TrMUCg*, um gene foi predito com início a montante dos demais (*TrMUCp57_286*) no subgrupo H. Conforme a predição da ferramenta PredGPI v5, o peptídeo sinal dessa proteína é válido. Entretanto, com menor valor preditivo do que o obtido para a sequência conservada (box laranja na Figura 25C) utilizada para a busca. Fato semelhante foi observado em outras duas sequências do subgrupo G, totalizando ao menos cinco genes de mucinas de *T. rangeli* em que há incerteza da predição gênica, mas que interessantemente foram preditos como peptídeos sinais válidos. Dessa forma, faz-se o registro da ocorrência de possíveis sequências de peptídeos sinais a montante de glicoproteínas de *T. rangeli* que exigem inspeção rigorosa.

Com relação às características do grupo *TrMUCp*, nota-se que a porção N-terminal das sequências é mais variável que a porção C-terminal, e essa variabilidade foi observada nos diversos subgrupos. Na porção N-terminal foi identificada a presença de resíduos conservados que possuem características relevantes como os resíduos de Cys – aminoácido capaz de formar pontes dissulfeto –, e assim, formar estruturas em forma de grampo. Também, estão conservados os aminoácidos

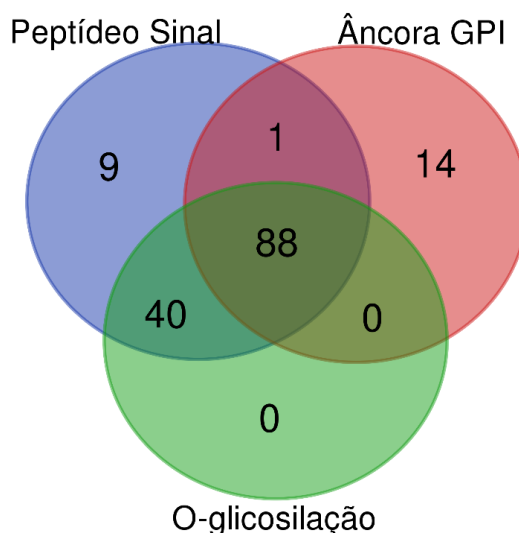
hidrofóbicos Phe, Trp e Tyr, localizados entre o centro e a porção *N*-terminal da sequência (Figura 25D). Essa região se assemelha a região hipervariável de *TcMUC* II, o mesmo local que apresenta esse tipo de resíduos de aminoácidos, quando presentes.

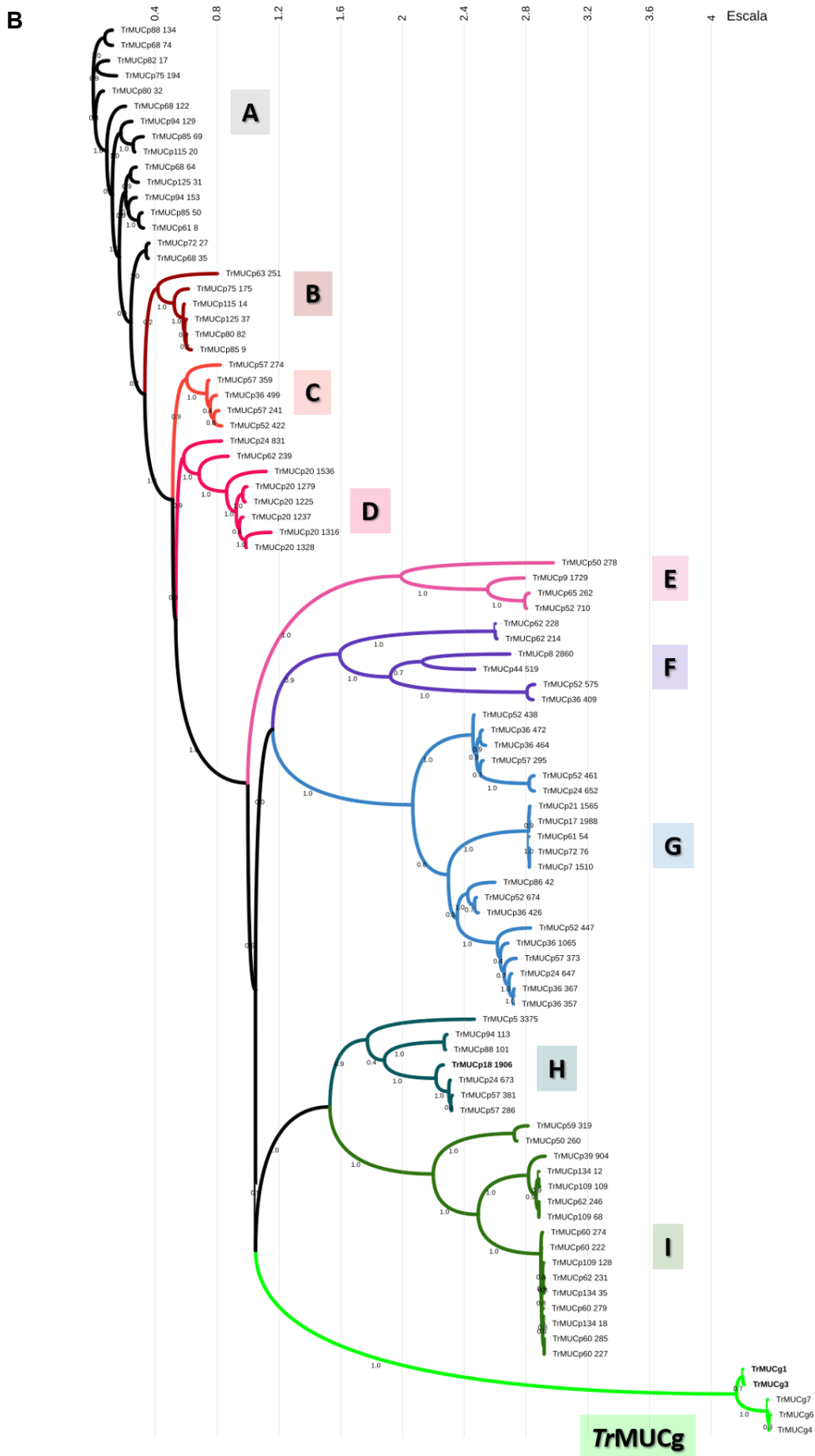
Na porção *C*-terminal, nota-se a concentração de resíduos Ser e Thr, e principalmente Pro, estando esses em meio a resíduos de carga positiva como Arg, His e Lys. O aminoácido Pro confere maior rigidez à estrutura proteica, e no grupo *TrMUCp* ocorrem em duplas ou trincas, intercaladas entre resíduos passíveis de *O*-glicosilação. Resíduos de Pro também estão presentes na estrutura das mucinas de *T. cruzi*, sendo a repetição T₈KP₂ uma característica importante da família *TcMUC* I. Contudo, os resíduos Pro não se apresentam concentrados como ocorre em *TrMUCp*.

Figura 25 – Os membros do grupo *TrMUCp* são mais variáveis e possuem resíduos hidrofóbicos não característicos de mucinas.

A) Diagrama de Venn representando a classificação das ORF obtidas quanto a presença de elementos canônicos. Análise de presença de *O*-glicosilações condicionada a validação da presença de peptídeo sinal. **B)** Análise filogenética de mucina de *T. rangeli*. (Árvore obtida pela análise de *Maximum-likelihood* das sequências aminoacídicas identificadas neste estudo. Valores de *bootstrap* de 1000 replicatas indicados no centro dos ramos. Distâncias em relação à raiz indicadas na escala superior. Classificação de subgrupos, indicada ao lado direito do respectivo clado. **C)** Alinhamento das sequências *TrMUCp* subgrupo H com indicações de peptídeo sinal (bloco laranja claro), com sítio de clivagem sinalizado pela tesoura e tracejado preto; resíduos de Ser e Thr (linhas amarelas); Pro (linhas azuis). Região de âncora GPI (bloco roxo) com sítio ω apontado pelo tracejado preto. # indica blocos conservados avaliados por Gblocks. **D)** Logo da região compreendida entre as posições 65 a 186 do alinhamento (região hipervariável), com conservação de resíduos hidrofóbicos (à cima). Região rica em Pro (à baixo). No topo de cada logo está indicado a posição de cada resíduo na sequência e na parte inferior, o índice de ocupação do resíduo indicado (regiões de *gap* são penalizadas e demonstradas em azul).

A





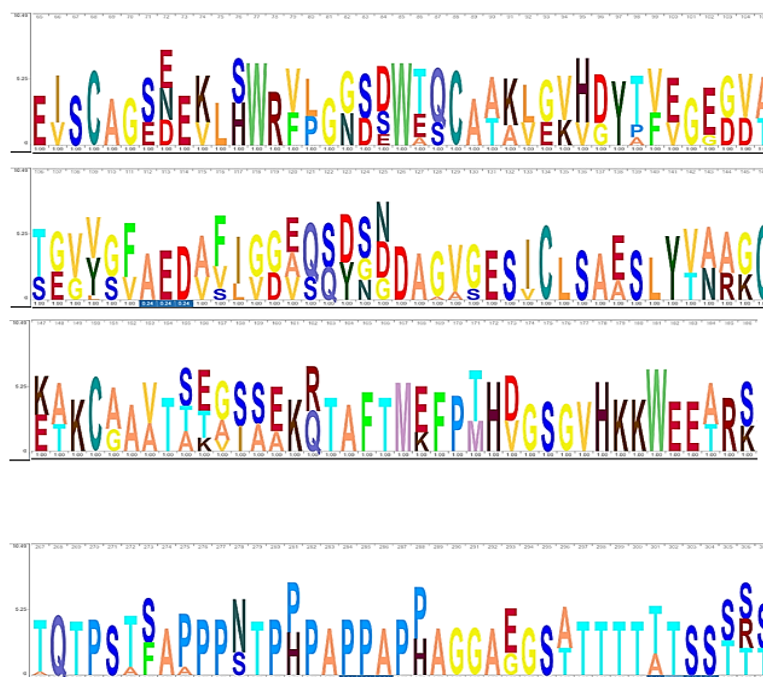
C

```

=====+=====+=====+=====+=====+=====+
          10         20         30         40         50         60
TrMUCp5_3375 -----MARMLTVRRRHTVCALLFLSLLYVCCCSARA
TrMUCp88_101 -----MAMATVRRCAVWAVAVVALLCGCCSFVCGA
TrMUCp94_113 -----MAMATVRRCAVWAVAVVALLCGCCSFVCGA
TrMUCp35 -----MAMAMVRRRAVCALAVVAVLCCGFSSVCGA
TrMUCp24_673 -----MAMATVRRCAVCVFVAVFVAVLCCGFSSVCGA
TrMUCp57_381 -----MAMATVRRCAVWALTVFVAVLCCGFSSVCGA
TrMUCp57_286 MFLFVLCLFVAASQLTAPANLLPPPLTPRR
          70         80         90         100        110        120
TrMUCp5_3375 VSG-----VSDDVNVPEFTCPRSGESTRWRFLEKKNWTTCSINI
TrMUCp88_101 ASAPAETRKAFAKRIPLPPVLRREWKWVEVPVEVSCCKGTEKLSWRFPGGGAWQSCPVAV
TrMUCp94_113 ASAPAETRKAFAKRIPLPPVLRREWKWVEVPVEVSCCKGNVEELSWRFPGGGEWQSCPVAV
TrMUCp35 TNTGV-----YAVPGMFKEVPVEIS CAGSDEKLSWRVLGGS EWAQCAAKL
TrMUCp24_673 TKTEV-----YAVPGMFKEVPVEIS CAGSDEKLSWRVLGGS DWTQCAAKL
TrMUCp57_381 TKTEV-----YAVPGMFKEVPVEIS CAGSDEKLSWRVLGGS DWTQCAAKL
TrMUCp57_286 TKTEV-----YAVPGMFKEVPVEIS CAGSDEKLSWRVLGGS DWTQCAAKL
          130        140        150        160        170        180
TrMUCp5_3375 GDTADSTVGDIL-----TASLC-----YWANDIVKDCA
TrMUCp88_101 GGLDYKVDLDTVDVGEEDIVS IDEVVSVDVTAGAADGAGESVCLSAESLYVAAKCDASCS
TrMUCp94_113 GGLDYKVDLGTVDVGEEDVVS IDEVVSVDVTAGAADGAGESVCLSAESLYVAAKCDASCS
TrMUCp35 GVHDYAVEGGGVA TEVLGFASIGGA----QSDNDAGAGESVCLSAESLYVAAKCAKCA
TrMUCp24_673 GVHDYVEGEGVA TEVVGFAFIGGA----QSDSNDAAVGESICLSAESLYVAAKCAKCA
TrMUCp57_381 GVHDYVEGEGVA TEVVGFAFIGGA----QSDSDDAGVGESICLSAESLYVAAKCAKCA
TrMUCp57_286 GVHDYVVEGEGVA TEVVGFAFIGGA----QSDSDDAGVGESICLSAESLYVAAKCAKCA
          190        200        210        220        230        240
TrMUCp5_3375 ARCTSSSRDAAAVCTADYPLHPQSELYKRWEKAKVTSSSSSASGNKS-----
TrMUCp88_101 AAA---GREKQTAF TMNFSTHANS GYVVKWLEAKKTHGDSSAPLTPAPNAGPLGKPGVICAL
TrMUCp94_113 AAA---GREKQTAF TMNFSTHANS GYVVKWLEAKKTHGDSSAPLTPNAGPLGKPGVICAL
TrMUCp35 AATTKVSAEKQTAF TMEFPMHVGS GVHKKWEARS SSSRAPLLLDGAETGLFGTSGVCLL
TrMUCp24_673 AVTTEGSSEKRTAF TMEFPTHDGS GVHKKWEARS PSSRAPLLLDGAETGLLGTSGVCLL
TrMUCp57_381 AVTSEGSSEKRTAF TMEFPTHDGS GVHKKWEARS PSSRAPLLLDGAETGLLGTSGVCLL
TrMUCp57_286 AVTSEGSSEKRTAF TMEFPTHDGS GVHKKWEARS PSSRAPLLLDGAETGLLGTSGVCLL
          250        260        270        280        290        300
TrMUCp5_3375 -----AVDTEPGTSPVGDAAHAPGNTDAPS
TrMUCp88_101 TFPAIKPAGEAGSAHGGT PSAPPPGEKAAPS SEAPS---ASPAVTSDNAAHGPGQAAAPS
TrMUCp94_113 TFSAIKPAGEAGSAHGGT PSAPPPGEKAAPS SEAPA---ASPAVTSDNAAHGPGQAAAPS
TrMUCp35 TDPAEKPAAKAESAQR TASPAPADEPAAS PVDAAA S SEATTGSEESAHHGHGATQTPS
TrMUCp24_673 TDPAEKPAAKDSDSAPQRTASPPAPAEPEAAS PVEVAAS SEATTGSEESAHRPGATQTPS
TrMUCp57_381 TDPAEKPAAKDSDSAPQRTASPPAPAEPEAAS PVEVAAS SEATTGSEESAHRPGAAQTPS
TrMUCp57_286 TDPAEKPAAKDSDSAPQRTASPPAPAEPEAAS PVEVAAS SEATTGSEESAHRPGAAQTPS
          310        320        330        340        350        360
TrMUCp5_3375 TSQDSSKAPSSAPPTTFDGTATTTT---TTTESPSAAKHTKSNADSSKATNTP--FVSA
TrMUCp88_101 TPQGPPAPPNSAPHASGTDGATTTT---TTTASPVAVKHTKSHADSHHTTTFPSPTPLL
TrMUCp94_113 TPQGPPAPPNSAPHASGTDGATTTT---TTTASPVAVKHTKSHADSHHTTTFPSPTPLL
TrMUCp35 ASAAPPNTPPPAPPAGGAEGSATTTTAT-TSSSSPVAVKHTKSKADGSDTALLMARTTL-
TrMUCp24_673 TSAPPNTPPPAPPAGGAEGSATTTT-TSSSSSPVAGKHTKSKAGGSDTALFMARTTL-
TrMUCp57_381 TSAPPNTPPPAPPAGGAEGSATTTT-TSSSSSPVAGKHTKSKAGGSDTALFMARTTL-
TrMUCp57_286 TSAPPNTPPPAPPAGGAEGSATTTT-TSSSSSPVAGKHTKSKAGGSDTALFMARTTL-
          370
TrMUCp5_3375 LPLLLLMIALACAAGQC
TrMUCp88_101 LPLPLLVAAVACAAGWG
TrMUCp94_113 LPLPLLVAAVACAAGWG
TrMUCp35 SLLLLLMAAVACAAGR-
TrMUCp24_673 SLLLLVMAAVACAAGR-
TrMUCp57_381 SLLLLVMAAVACAAGR-
TrMUCp57_286 SLLLLVMAAVACAAGR-
#####

```

D



Fonte: Autora.

Ao avaliar a proporção de aminoácidos, nota-se que Ala (15,16% \pm 2,01), Gly (10,64% \pm 1), Ser (10,56% \pm 1,36), Thr (9,67 % \pm 1,79), Val (7,06 % \pm 0,79) e Pro (6,64 % \pm 2,56) são os principais constituintes de *TrMUCp*. A quantidade Ala encontrada em *TrMUCp* é superior ao descrito na literatura para as mucinas de *T. cruzi* (DI NOIA *et al.*, 1996). De forma que a grande abundância do aminoácido Ala é uma das principais características relatadas em outras glicoproteínas como *TcSAP* e *TcTASV*, essa última recentemente descrita em *T. cruzi*, estava previamente anotada como pertencendo à família das mucinas (GARCÍA *et al.*, 2010).

Ao realizar a análise de homologia entre os genes de *TrMUCp* em relação à *T. cruzi*, foi possível encontrar correspondências à *TcTASV* em diversos genes dos subgrupos *TrMUCp_A*, D, F e G. Bem como, foram identificados genes relacionados a *TcMUC* nos subgrupos *TrMUCp_B* e H; trans-sialidases *TcS III* no subgrupo *TrMUCp_G* e proteínas hipotéticas nos subgrupos *TrMUCp_A* e I. Contudo, diversos dos resultados possuem baixa cobertura e identidade não possibilitando uma análise clara de todos os genes. Dentre os melhores resultados (cobertura > 50%, identidade > 30% e e-value < 1×10^{-13}) há a predominância da correspondência de *TcMUC* no subgrupo *TrMUCp_H* e proteínas hipotéticas em *TrMUCp_I*. Assim, é possível que no grupo *TrMUCp* estejam incluídos genes homólogos à *TcTASV* - especialmente no

subgrupo *TrMUCp_A*. Contudo, como outrora as *TcTASV* foram consideradas *TcMUC*, é possível que fato semelhante ocorra na classificação das mucinas de *T. rangeli*. Por hora, opta-se a manter a nomenclatura “*TrMUCp*” para todas as sequências identificadas neste estudo devido aos critérios adotados. A listagem dos resultados da busca por sequências homologas em *T. cruzi*, é descrita na Tabela 12 no apêndice A desta tese.

9.1.3 Comparação entre mucinas de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli*

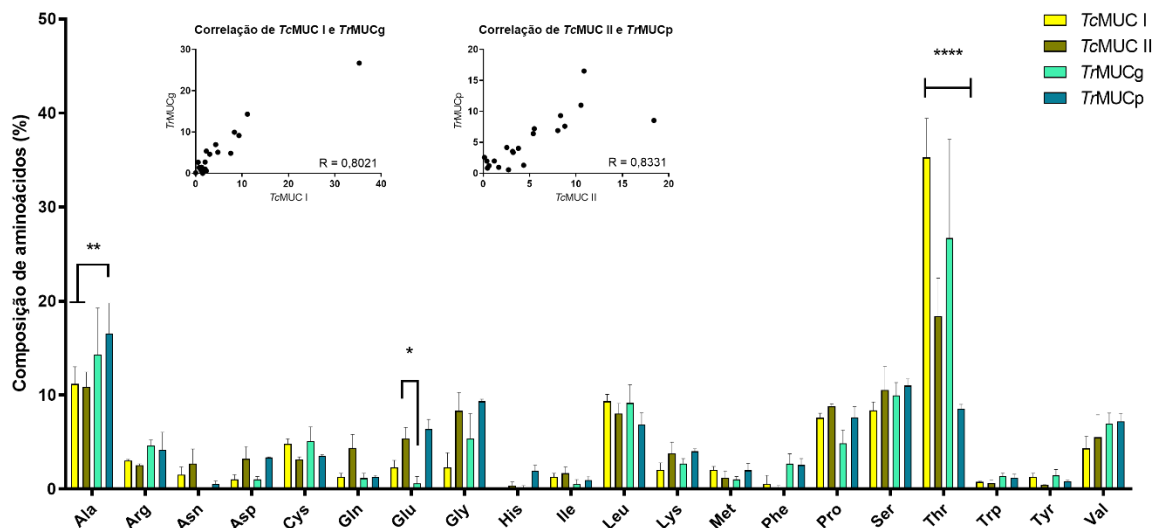
De forma geral, *TrMUCg* e *TrMUCp* possuem características bastante diferentes. Enquanto as *TrMUCg* são proteínas menores (142 aa \pm 63) e mantêm agrupados seus resíduos de Ser e Thr, formando um padrão em *tandem*. As *TrMUCp* possuem tamanho maior (334 aa \pm 81), mantendo os resíduos O-glicosilados esparsos.

Com relação a abundância de aminoácidos, como demonstrado na Figura 26, é possível perceber que há a diminuição do número de resíduos de Thr nas mucinas de *T. rangeli* em comparação as mucinas de *T. cruzi* ($p < 0,0001$). A abundância de resíduos de Thr mantém a proporção $TcMUCI > TcMUCII$ e $TrMUCg > TrMUCp$, sendo que a proporção de Ser é conservada entre os grupos. As mucinas de *T. rangeli* apresentam uma quantidade maior do resíduo Ala ($p < 0,01$) e ligeiramente maior de Arg e Phe (não estatisticamente significativo). A medida que a maior quantidade de Ala também é uma característica de mucinas de *T. carassii* e glicoproteínas similares às mucinas em *Leishmania* spp. (AGÜERO *et al.*, 2002; HICKS *et al.*, 2000). Assim, com base na constituição de aminoácidos, pode-se estabelecer a comparação entre *TcMUCI* e *TrMUCg* ($R = 0,8021$). Bem como, entre *TcMUCII* com *TrMUCp* ($R = 0,8331$). Dessa forma, afirma-se que quanto à dispersão de O-glicosilação, padrão presença/ausência de região hipervariável ou repetições em *tandem* e constituição aminoacídica, as mucinas de *T. cruzi* e *T. rangeli* possuem características em comum, como o demonstrado na Figura 27.

Figura 26 – A constituição aminoacídica reforça a correlação entre mucinas de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli*.

Gráfico de composição de aminoácidos em porcentagem relativa aos grupos *TcMUCI*, *TcMUCII*, *TrMUCg*, *TrMUCp*. Gráfico expresso em média e desvio padrão. Detalhe interno: Análise de correlação de Spearman em função da constituição de aminoácidos. Sequências de cada grupo (*TcMUCI*: EMUCe-

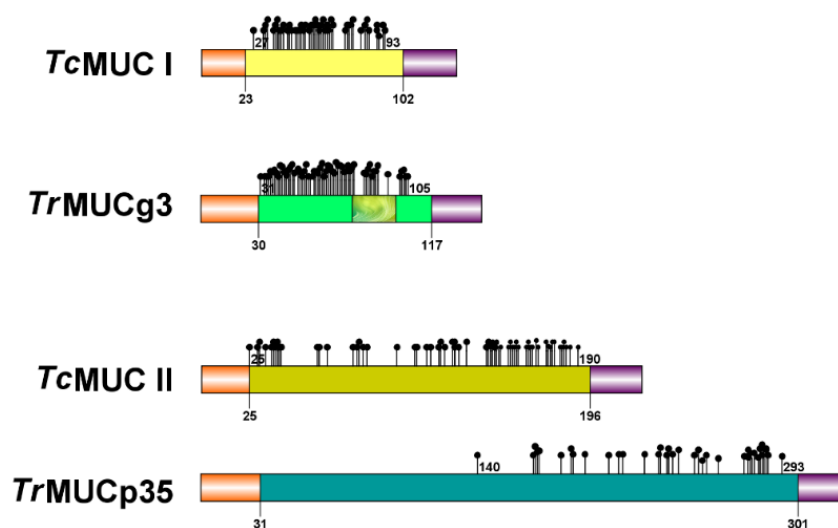
37p20, TcCLB.509847.70 e clone B4-5 (discutido no tópico 9.2.2); TcMUCII: EMUCt-4, TcCLB.507357.130 e clone B2-10; TrMUCg: TrMUCg1, TrMUCg3, TrMUCg4; TrMUCp: TrMUCp35, TrMUCp20 e TrMUCp23). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$. Análises de correlação com significância de $p \leq 0,0001$ e intervalo de confiança de 95%.



Fonte: Autora

Figura 27 – Resumo gráfico comparativo entre mucinas de *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi*.

Representação gráfica comparativa dos grupos TrMUCg (verde claro), TrMUCp (verde escuro), TcMUC I (amarelo claro) e TcMUC II (amarelo escuro). Detalhes referentes à pré-proteína em coloração gradiente: peptídeo sinal (laranja) e âncora GPI (roxo) com posição sítio de clivagem sinalizados na parte inferior. Sítios de O-glicosilação representados por pontos pretos, sendo indicada a posição do primeiro e último resíduo O-glicosilado na parte superior. Detalhe interno da sequência em TrMUCg relativo à região central conservada nesse grupo (verde perolado). Sequências utilizadas como base para representação, indicadas à esquerda, sendo TrMUCg3 e TrMUCp35 descritas ao longo dessa seção e TcMUC I e TcMUC II utilizadas neste trabalho e descritas no tópico 9.2.2.



Fonte: Autora.

9.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE *Trypanosoma rangeli*

SUPEREXPRESSANDO *TrMUCg1*, *TrMUCg3*, *TrMUCp35*, *TcMUCI* E *TcMUCII*

9.2.1 Abordagem de clonagem com FlagGPI_pROCK

Canepa *et al.* (2012) empregaram a estratégia de expressão de *TcSMUG* fusionada ao peptídeo *FlagTag* para a compreensão do processamento e secreção de *TcSMUG*. Dessa forma, foi aplicada uma abordagem semelhante neste trabalho. Observando publicações recentes, optou-se por expressar o peptídeo *3xFlagTag*[®] (Sigma-Aldrich) de forma fusionada às mucinas, visando o reconhecimento da expressão de qualquer sequência de interesse, mas de forma específica, utilizando anticorpo anti-*FlagTag* M2 (Sigma-Aldrich).

A fim de evitar possíveis interferências no reconhecimento do peptídeo sinal ou âncora GPI das mucinas (de características hidrofóbicas), foi inserido o gene *mNeonGreen* como espaçador entre a *3xFlagTag* e a âncora GPI, para minimizar a alteração ou impedimento o endereçamento e processamento correto da glicoproteína. Com essa estratégia, as mucinas foram expressas na extremidade distal da construção, estando disponíveis ao máximo para acesso a outras moléculas e mantendo a sua característica de localização na superfície do parasito. Para âncora GPI, foi selecionada a sequência que codifica essa região na glicoproteína AGN32981.1 (*TrMUCp35*), visto que há a comprovação experimental dessa glicoproteína na superfície de *T. rangeli* (WAGNER *et al.*, 2013)

Quanto à *mNeonGreen* sintetizada e fusionada à *FlagTag*: esse repórter foi escolhido por ser mais brilhante e mais estável que as demais proteínas fluorescentes até então utilizadas (GenBank KC295282 - (SHANER *et al.*, 2013). É importante registrar que a *mNeonGreen* fusionada à *FlagTag* e a *mNeonGreen* fusionada à *Luciferase*, utilizada no Capítulo I desta tese, tratam-se de sequências diferentes que compartilham 79 % de similaridade. Dessa forma, para fins dessa tese, o gene *mNeonGreen* clonado à *FlagGPI* oriundo de Shaner *et al.* (2013) foi denominado *mNG*. Enquanto, o gene *mNeonGreen* fusionado à *Luciferase* (oriundo de *pTRIX2-Luc::Neon*, advindo de *pPOTv4 blast-blast mNeonGreen* (BENEKE *et al.*, 2017; COSTA *et al.*, 2018)) foi referido como *Neon*.

Por fim, essa construção foi elaborada para conter a sequência 3' UTR de *gp82*, utilizada em estudos anteriores em nosso grupo de pesquisa (SCHLINDWEIN; STOCO, 2014). Essa sequência é descrita por promover a estabilização do mRNA em

formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Entretanto, também determina a desestabilização do RNA em epimastigotas, sendo parte da regulação estágio-específica dessa TS (CORREA *et al.*, 2013). Porém, em *T. rangeli*, esse 3' UTR se mostrou um forte elemento na estabilização do mRNA, tanto em formas epimastigotas quanto tripomastigotas. Também, foram incluídos no gene sintético dois sítios múltiplos de clonagem, um a montante da *3xFlagTag* - para clonagem das mucinas - e outro a jusante da 3' UTR para clonagem de *TcTS* ativa. Assim, foi desenhada a sequência denominada FlagGPI, como representada na Figura 23.

O gene sintético foi recebido clonado no plasmídeo pUC57, do qual foi excisado e subclonado no plasmídeo pROCK-Neo GPF (DAROCHA *et al.*, 2004), utilizando as enzimas *XbaI* e *XhoI*, e assim substituído o gene da GPF pela sequência FlagGPI, gerando o vetor denominado FlagGPI_pROCK.

9.2.2 Clonagem dos genes *TcMUCI* e *TcMUCII* e expressão heteróloga por *Trypanosoma rangeli*

Inicialmente, neste trabalho foi proposta a expressão de *TcMUCII* por ser o grupo mais expresso em tripomastigotas de *T. cruzi*, como forma de realizar um estudo comparativo às mucinas de *T. rangeli*. Para tal, foi realizada a busca na literatura quanto aos genes representativos do grupo. Devido às diferenças entre as sequências dos membros dessa família, buscou-se genes como o maior número de estudos, comprovações experimentais, análises de expressão, dentre outras características. Assim, foram selecionadas as sequências MUC.RA-1, disponível em GenBank: TENG0454 (denominada MUCA neste trabalho) (BUSCAGLIA *et al.*, 2004; CANEPA *et al.*, 2012; DI NOIA *et al.*, 1996; LANTOS *et al.*, 2016) e EMUCt-4, registrada no acesso GenBank: AY032683 (denominada MUCB) (BUSCAGLIA *et al.*, 2004; CAMPO *et al.*, 2006; DI NOIA *et al.*, 1998).

A partir do genoma da cepa Y de *T. cruzi*, esses genes foram amplificados via PCR utilizando os iniciadores *TcMUCA* (F:5' – TCTAGAACACCACTGAACGACC ACAC), *TcMUCA* (R:5' – CCCGGGAGCACAAAC TAACACCCGTC); *TcMUCB* (F:5' – TCTAGACAGATCAGCTCCACACCAC) e *TcMUCB* (R: 5' – CCCGGGGCCATGC ATATGAGTGTGTC), de forma que o *amplicon* contivesse parte ou totalidade da sequência 3' UTR. Os insertos foram clonados em vetor pGEM T-Easy (Promega) e sequenciados pelo método de Sanger (LAMEB/UFSC) para confirmação da identidade. Devido à natureza polimórfica dos genes de *TcMUCII* foram selecionadas

para sequenciamento dois clones de cada gene, cujas identificações são apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 – Identificação das sequências clonadas referentes à *TcMUCII*

Clone	Produto Identificado	Identidade	ID TritypDB
A3-8	Proteína hipotética	77%	TCDM_08866
A3-10	MASP	35%	TCDM_09616
B2-10	<i>TcMUCII</i> (putativa)	80%	TCDM_12662
	<i>TcMUCII</i>	71%	TCDM_08744
B4-5	<i>TcMUCII</i> (putativa)	67%	TcCLB.507357.130*
	<i>TcMUCI</i> (putativa)	93%	TcCLB.509847.70**
	<i>TcMUCI</i> (putativa)	67%	TcCLB.511149.130*

* Curado por Frasch, citado no artigo do genoma de *T. cruzi* (El-Sayed *et al.* 2005)

** Curado por Frasch, dados de microarranjo.

Fonte: Autora.

Como resultado, foram identificados genes dos grupos I e II de mucinas de *T. cruzi*, e assim, foi incluído o grupo *TcMUCI* no estudo, sendo selecionados os clones B4-5 e B2-10 como representantes dos grupos *TcMUCI* e *TcMUCII*, respectivamente. A caracterização dessas sequências revelou que todas possuem os elementos canônicos descritos na literatura sendo, portanto, consideradas mucinas putativas.

Visto isso, foi procedida a clonagem sem a região que codifica para a âncora GPI, empregando os iniciadores descritos na Tabela 3, gerando os produtos de amplificação para *TcMUCI* (314 pb) e *TcMUCII* (596 pb). A clonagem dos produtos de PCR foi realizada em vetor pGEM T-*Easy* (Promega), sendo os mesmos subclonados no vetor FlagGPI_pROCK conforme o descrito a seguir.

9.2.3 Clonagem dos genes *TrMUCg1*, *TrMUCg3* e *TrMUCp35* no vetor FlagGPI_pROCK

Foram selecionados para clonagem um exemplar de mucinas do grupo *TrMUCp* e dois membros do grupo *TrMUCg*, pois esse grupo apresentou distinção de 90 aa na porção *N*-terminal da proteína, conforme descrito no tópico 9.1.1. Dessa forma, *TrMUCg1* (693 pb) e *TrMUCg3* (426 pb) foram incluídas na seleção para clonagem. Quanto ao grupo *TrMUCp*, a sequência *TrMUCp35* (984 pb) já havia sido previamente clonada no vetor pGEM T-*Easy* pela Dr^a. Milene H. de Moraes (UFSC), sendo gentilmente cedido para a realização desse estudo. Desse modo, foram amplificados

os genes sem a sequência que codifica para a âncora GPI (Tabela 3), gerando os produtos de amplificação *TrMUCg1 s/ GPI* (620 pb) e *TrMUCg3 s/ GPI* (353 pb) e *TrMUCp35 s/ GPI* (897 pb). Esses *amplicons* foram purificados e clonados em vetor pGEM T-*Easy* e sequenciados pelo método de Sanger (LAMEB/UFSC) para verificação de suas identidades. Desses três insertos, apenas *TrMUCg3* apresentou alguma discordância com relação a sequência teórica, possuindo três mutações sinônimas e a deleção de um códon Thr.

A transfecção de *T. rangeli* com essas construções e com o vetor vazio (sem mucinas) (FlagGPI - *mock*) foi realizada conforme descrito no item 8.3. Ao longo da seleção dos transfectantes com G418, a intensidade de fluorescência foi proporcional ao aumento da concentração de G418 para alguns transfectados como Choachí_FlagGPI (*mock*). Entretanto, para outras linhagens como a Choachí_*TrMUCg3* a fluorescência se manteve bastante fraca mesmo ao atingir 500 µg/ml de G418.

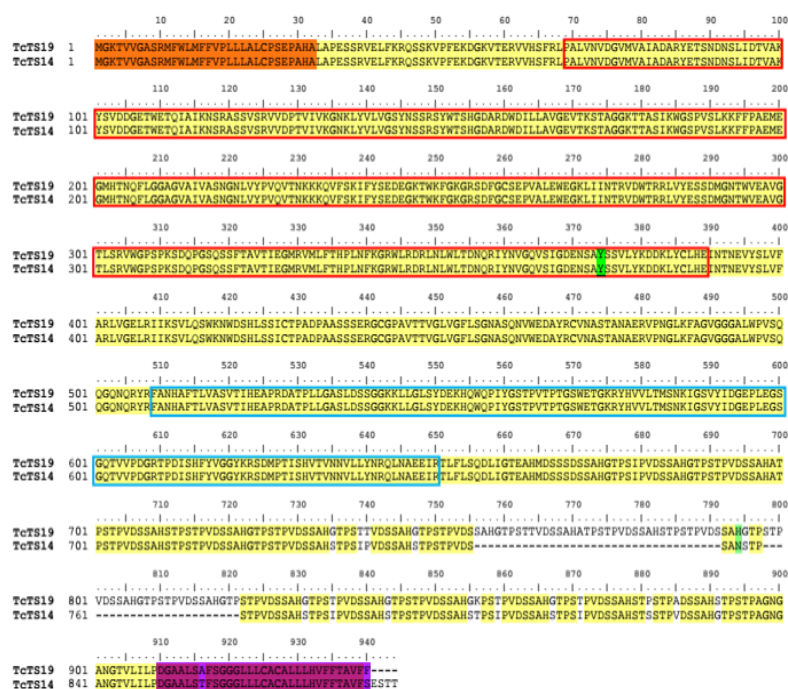
9.2.4 Clonagem do gene da *TcTS* ativa

O plasmídeo FlagGPI foi idealizado para promover a expressão de diversos genes simultaneamente. Dessa forma, durante o período de seleção dos transfectados com mucina, foi procedida a clonagem do gene da *TcTS* ativa (TSI) com todos os elementos necessários à atividade da enzima (sítio catalítico e sítio de ligação à lectina com Asp box, motivos VTV, SAPA, peptídeo sinal e âncora GPI). Assim, foram utilizadas as sequências *TcTS154* (RUBIN-DE-CELIS *et al.*, 2006; UEMURA *et al.*, 1992) e *TcTS19* (BELEW *et al.*, 2017), como base para o desenho dos iniciadores.

A partir do DNA genômico da cepa CL-Brener de *T. cruzi* e utilizando a enzima *Taq Phusion* (Thermo Fischer Scientific), foi possível obter um produto da amplificação com os iniciadores *TcTS F* e *TcTS19 R*, o qual foi clonado em vetor pJET. O gene de *TcTS* clonado foi analisado por sequenciamento com os iniciadores descritos na Tabela 3, além de iniciadores internos utilizados exclusivamente para o sequenciamento (*TcTS F2*: 5' – GTTCGAGAAGCTACTGGACG e *TcTS R2*: 5' – TGTCATGTGTGC TTCCGTG). A partir do resultado do sequenciamento, foi determinada a fase de leitura e sequência de aminoácidos, possibilitando a comparação com a *TcTS* descrita por Belew *et al.* (2017). Devido ao número de regiões SAPA no produto clonado, a trans-sialidase obtida neste trabalho foi denominada *TcTS14* (Figura 28).

Figura 28 – Análise comparativa da *TcTS14* com *TcTS19*

Alinhamento global da trans-sialidase clonada neste trabalho em relação a sequência *TcTS19* (Belew, *et al.* 2017) com indicações das regiões de peptídeo sinal (laranja), âncora GPI (roxo), domínio neuraminidase (caixa vermelha, com destaque em verde para o resíduo de Tyr³⁷⁴), domínio lectina (caixa azul). Resíduos em amarelo indicam resíduos idênticos. Domínios determinados pelo programa Pfam.



Fonte: Autora.

A partir do alinhamento, foi possível identificar que a *TcTS14* é conservada em relação à *TcTS19*, que foi descrita como funcional e responsável e pelo aumento de infectividade em cepas pouco virulentas de *T. cruzi* (BELEW *et al.*, 2017). No alinhamento é possível observar a ausência do códon de parada no gene clonado e a substituição de um aminoácido na sequência de reconhecimento da âncora GPI. Sem o códon de parada, a proteína tem tamanho maior que o esperado e os preditores não consideram válida a posição como um possível sítio ω . Entretanto, pela similaridade à *TcTS19* foi dado prosseguimento na clonagem da *TcTS14* em FlagGPI para transfecção do vetor na cepa Choachí de *T. rangeli*. Dessa forma, foram geradas linhagens para expressão da enzima *TcTS14* simultaneamente à cada uma das mucinas, possibilitando avaliar a contribuição de dessas glicoproteínas separadas e em conjunto na infectividade de *T. rangeli*.

9.3 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DOS GENES CLONADOS

9.3.1 Massa molecular de *TrMUCg3* e *TrMUCp35* indica baixa ou ausência de glicosilação das mucinas de *Trypanosoma rangeli*

A confirmação da expressão dos genes de interesse foi realizada por WB, utilizando o anticorpo anti-FlagTag. Em diversos momentos ao longo deste trabalho, essa análise foi realizada para certificação a manutenção do perfil de expressão em formas epimastigotas e tripomastigotas. O resultado apresentado na Figura 29, é representativo da expressão dos parasitos transfectados ao longo de todo trabalho. Também foi realizada a predição da massa molecular teórica com base nas sequências gênicas e tradução *in silico* utilizando a plataforma *Benchling* (Figura 29 e Tabela 9).

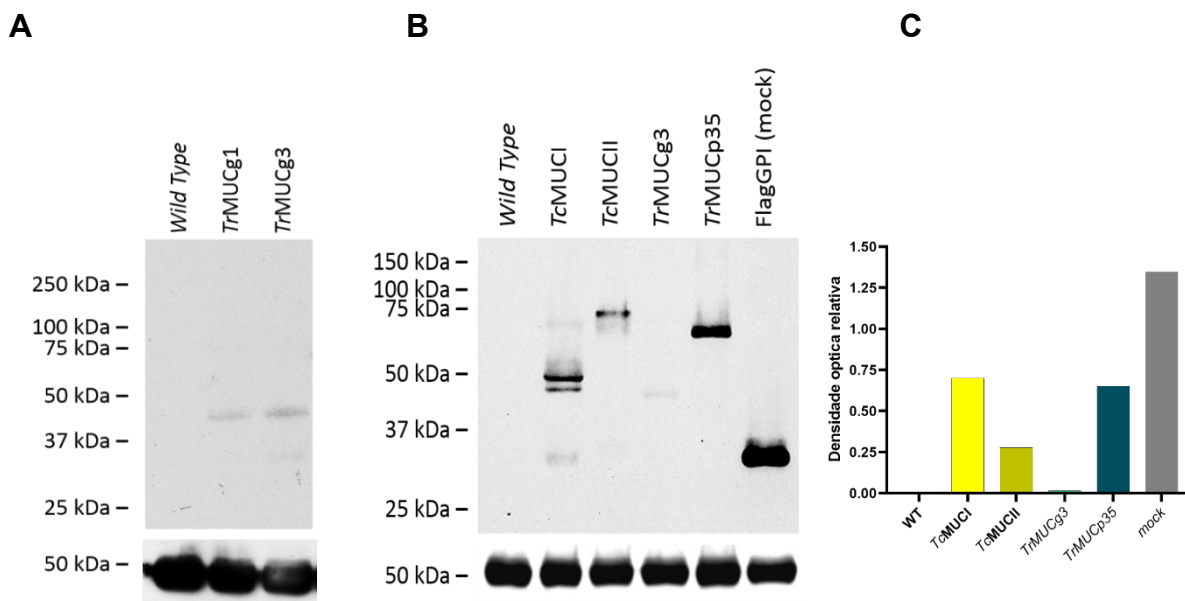
Com relação à expressão de mucinas pertencentes ao grupo *TrMUCg*, cuja predição de peptídeo sinal era distinta para *TrMUCg1* (90 aa maior) que as demais do grupo, não foi identificada diferença de massa molecular entre as mucinas expressas por *TrMUCg1* e *TrMUCg3*. Dessa forma, compreende-se que houve erro de predição da sequência codificante e na prática o valor teórico de 44,75 kDa *TrMUCg3* foi observado para os dois produtos gênicos.

Também pode ser identificado que as mucinas de *T. cruzi*, expressas por *T. rangeli*, possuem massa molecular maior do que a predita *in silico* com base unicamente na sequência de aminoácidos. Para *TcMUCI*, podem ser identificadas três bandas de diferentes tamanhos, possivelmente devido a distintos índices de glicosilação da mesma proteína. Em *TcMUCII*, foi identificado o aumento de mais de 40% da massa molecular, tal qual como é descrito para as mucinas naturalmente expressas por *T. cruzi*.

Todavia, as mucinas de *T. rangeli* aparentam possuir número muito reduzido de glicanas ou carboidratos pouco complexos, sendo possível que não possuam nenhuma modificação pós-traducional, visto que não há alteração de massa molecular. Essa característica afeta diretamente a capacidade de recepção de Sia, devido a transferência dessa glicana ser feita a resíduos $\alpha 2, 3$ de β -galactopiranosil pela trans-sialidase.

Figura 29 – Análise da massa molecular das mucinas expressas de forma fusionadas à FlagGPI.

A) Análise comparativa da expressão de mucinas de diferentes membros do grupo *TrMUCg*. **B)** Comparação entre mucinas homólogas e heterólogas fusionadas à FlagGPI expressas pelas linhagens de Choachí transfectadas. Detecção com anti-FlagTag e anti-*mouse* HRP. Para todas as amostras foram utilizados 50 µg de extrato proteico total de epimastigotas. Controle de quantidade de proteína obtido com anti-β tubulina e anti-*rabbit* HRP, demonstrado na parte inferior da respectiva amostra. **C)** Análise densitométrica do WB, utilizando β-tubulina como normalizador. Marcador de massa molecular Bio-Rad Dual Xtra.



Fonte: Autora.

Tabela 9 – Comparativo da massa molecular das mucinas fusionadas à FlagGPI.

Glicoproteína	Massa teórica (kDa)	Massa real (aproximada) (kDa)
<i>TcMUCI</i>	43,76	33*/ 45 / 50 / 70
<i>TcMUCII</i>	53,40	75
<i>TrMUCg1</i>	54,27	45
<i>TrMUCg3</i>	44,75	45
<i>TrMUCp35</i>	63,32	65
<i>FlagGPI mock</i>	33,13	33

*Banda referente a expressão da construção sem mucina.

Fonte: Autora.

Ponderando que todas as construções para expressão das mucinas fusionadas são iguais quanto às sequências de controle (HX1 e 3'UTR) e fusão ao gene sintético FlagGPI, observa-se que *TrMUCg3* foi a mucina que demonstrou a menor expressão dentre as mucinas expressas de forma fusionada. Comparando

TrMUCg3 ao controle de expressão *mock*, ou à outra mucina homóloga, *TrMUCp35*, pode-se levantar o questionamento acerca da presença em *TrMUCg3* de algum sinal que a desestabiliza, fazendo com que seja menos expressa, possivelmente devido a controle pós-traducional. Esse dado é reforçado, pelo fato que *TrMUCg1*, apresenta o mesmo nível de expressão a partir de uma sequência nucleotídica diferente, mas que expressa possivelmente a mesma sequência peptídica. Entretanto, na ausência de análise de expressão por RNA, não é possível afirmar este fato.

A presença do gene de mucina (de modo genérico, em referência a qualquer das mucinas fusionadas) influencia negativamente a expressão da proteína final. Essa afirmação é feita com base na menor expressão em todos transfectados contendo gene de mucina em relação ao *mock*. Isso pode estar relacionado ao fato de que são necessárias várias etapas no processamento da glicoproteína (abordados não tópico 1.4). E por isso, há vários pontos de conferência desse correto processamento. Essa é uma observação do sistema biológico, que não infere em falha da construção do cassete ou impedimento da utilização da abordagem neste estudo. Mas, uma consideração quanto a escolha do vetor utilizado e do tipo de proteína expressa. De modo que, ao utilizar a abordagem fusionada para expressão de proteínas ancoradas por GPI, pode-se obter como resultado níveis de expressão menores em relação ao vetor vazio.

Por fim, nota-se variação de níveis de expressão proteica entre as diferentes mucinas estudadas. Tendo em vista que, todos os genes foram clonados em um mesmo plasmídeo, e logo, estão sob controle de um mesmo promotor e sequências regulatórias, esperava-se o mesmo nível de transcrição. Assim, a diferença na expressão das proteínas pode ser atribuída à pelo menos dois fatores:

- Diferentes taxas de eficiência da transfecção – Caso cada linhagem transfectada seja composta por população de transfectados que expressam mucina fusionada e população resistente ao antibiótico de seleção sem o cassete de integração (já que a concentração de G418 foi gradualmente aumentada conforme os parasitos se adaptavam) é possível observar diferentes níveis de expressão. Contudo, essa justificativa é pouco provável, devido à alta concentração de G418 utilizada.
- Controle pós-traducional diferenciado – A sequência aminoacídica de cada glicoproteína pode ser reconhecida de forma diferente, e assim

direcionar à degradação pelo sistema ubiquitina-proteassoma, por exemplo. Dessa forma, seriam obtidos diferentes níveis de expressão dentre os transfectados.

Diante dessas considerações, foi realizada análise por citometria de fluxo para avaliação da população.

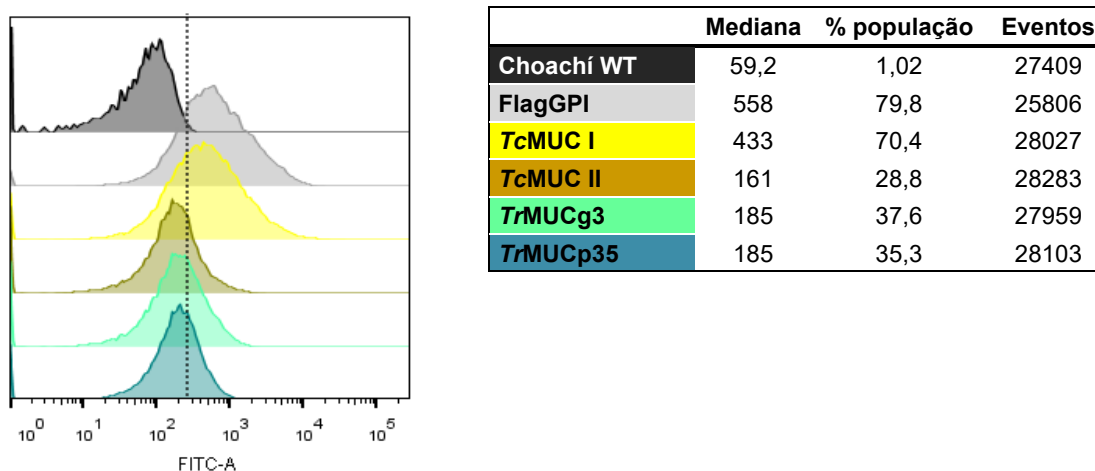
Quanto a expressão de *TcTS14*, não foi possível identificar sua expressão através de WB com anticorpos anti-SAPA, anti-*TcTS*-Sítio catalítico e soro anti-*iTcTS*. A expressão também foi avaliada pela atividade da enzima trans-sialidase, porém não foi possível validar os resultados por questões técnicas. Dessa forma, foi dada continuidade ao trabalho, sem a coexpressão de *TcTS* com as mucinas heterólogas e superexpressas.

9.3.2 Enriquecimento da população transfectada para expressão de mucinas fusionadas à FlagGPI

Uma vez que todas as mucinas eram expressas em níveis muito distintos, foi realizada a avaliação da porcentagem da população fluorescente por citometria de fluxo, com base na detecção da fluorescência de mNG (Figura 30).

Figura 30 – Avaliação de população fluorescente dos transfectados com FlagGPI_pROCK

Avaliação de porcentagem de população fluorescente e intensidade de fluorescência dentre as linhagens de parasitos transfectados com as mucinas heterólogas ou superexpressas. Linha tracejada indica parâmetro estabelecido como ponto de corte de fluorescência negativa/positiva com base na cepa Choachí_WT para determinação de porcentagem da população. Histograma normalizado pelo eixo Y.



Fonte: Autora.

A cepa Choachí_FlagGPI (*mock*) é a que possui a maior porcentagem de parasitos fluorescentes (79,8%) e com maior intensidade de fluorescência (558 unidades relativas de fluorescência). Enquanto, a cepa Choachí_TcMUCII é a que possui menor taxa da população fluorescente (28,8%) e com menor intensidade de fluorescência. Logo, notam-se diferenças na emissão de fluorescência entre as linhagens. A cepa Choachí_TcMUCII não é a que possui a menor expressão de mucina por WB, mas é a que expressa a mucina mais glicosilada. Assim, conclui-se que a glicosilação pode ter influenciado na conformação de mNeonGreen, impedindo o seu correto dobramento e prejudicando sua capacidade de emissão de fluorescência. Contudo, a fluorescência do parasito é um indicativo da expressão. Por exemplo, Choachí_TcMUCI possui níveis altos de expressão e boa intensidade de fluorescência em comparação a Choachí_FlagGPI.

Dessa forma, antes de proceder os experimentos *in vivo* e *in vitro*, foi realizado o enriquecimento da população, a fim de obter um cultivo composto por parasitos com o maior nível de expressão de mNG, e possivelmente maior expressão das mucinas fusionadas de forma mais homogênea. A seleção populacional foi realizada por *cell sorting*. Diferentemente de *T. cruzi* que pode ser clonado em placas com meio ágar ou em meios líquidos em concentrações menores que 0,5 parasitos por poço, o *T. rangeli* possui dificuldade em se desenvolver em cultivos de baixa densidade, possivelmente devido a fatores como *quorum sensing*. Por essa razão, foram obtidas culturas com aproximadamente 10^6 parasitos via *cell sorting*.

Após 72 h da separação, foi realizada a análise de fluorescência da população enriquecida, sendo repetida após um mês de cultivo para avaliação da manutenção do perfil de expressão (Figura 31).

Com o enriquecimento, a população da linhagem Choachí_FlagGPI obteve o incremento de 79,8% para 92% da população mNG positiva na primeira avaliação. Este índice decaiu levemente durante a manutenção dos parasitos em cultura (86%). Para a linhagem Choachí_TcMUCII, mesmo sendo estabelecido a separação dos parasitos de maior intensidade de fluorescência, não possível atingir índices como as obtidas em Choachí_FlagGPI, ficando em torno de 66% na primeira avaliação e, após um mês de cultivo, apenas 17% da população apresentava fluorescência.

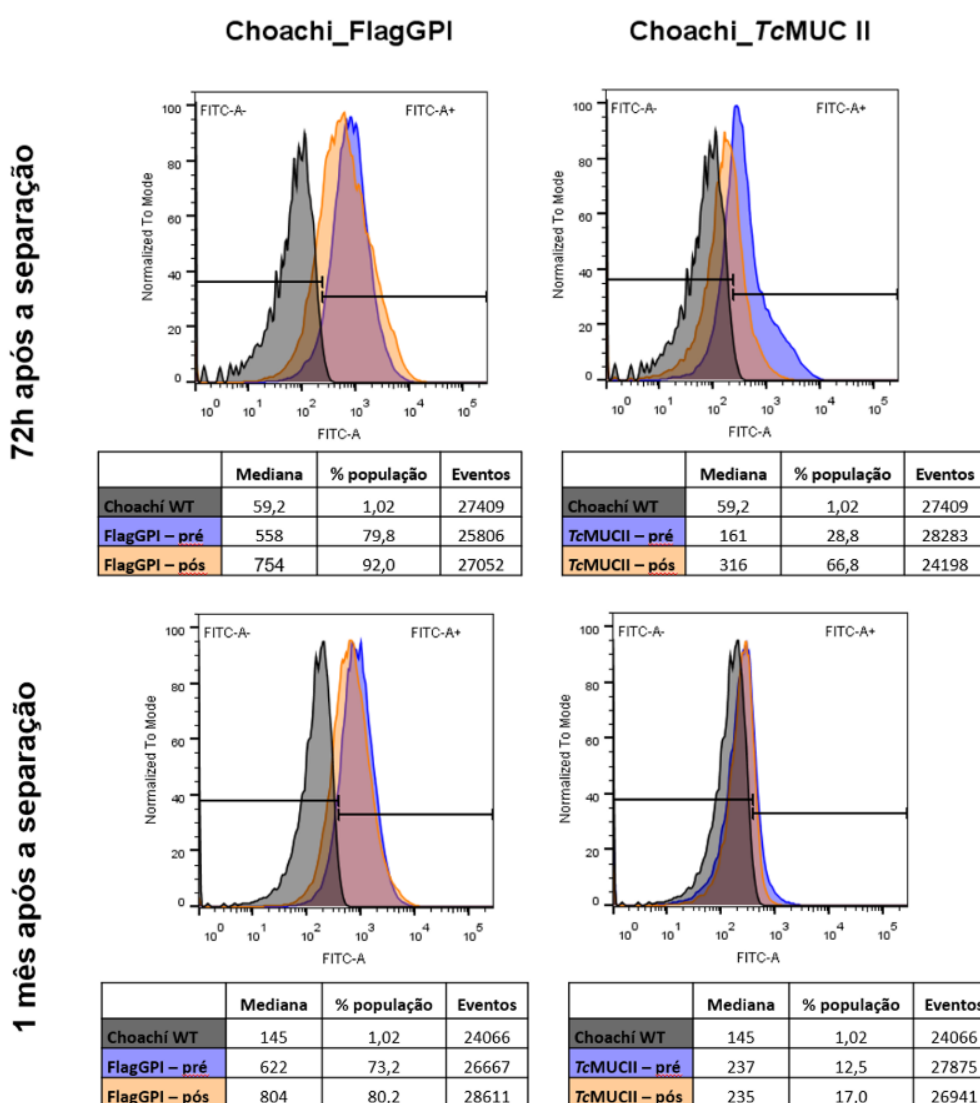
Com base nestes resultados, conclui-se que o enriquecimento foi eficiente, do ponto de vista técnico. Entretanto, a manutenção da população fluorescente não

depende da seleção momentânea dos parasitos de maior fluorescência, no caso de abordagem de expressão fusionada à glicoproteínas como a aplicada neste trabalho.

Diante do fato que as mucinas são expressas, contudo, a fluorescência é fraca e não reflete a população ou níveis de expressão, a fluorescência de mNG não foi aplicada a nenhum dos demais experimentos desta tese.

Figura 31 – Avaliação da manutenção do perfil populacional após enriquecimento por *cell sorting*.

Determinação de homogeneidade da população fluorescente após 72 h e 1 mês do processo de separação por *cell sorting* para as linhagens Choachi_FlagGPI e Choachi_TcMUCII (pós). Para cada análise foi utilizado com controle a linhagem parental e amostra de cultivo não separada por *cell sorting* (pré). Legenda de cada gráfico com informações de intensidade de fluorescência (Mediana FITC-A), porcentagem de parasitos fluorescentes e contagem de eventos dos dados apresentados. Histograma normalizado pelo eixo Y.



Fonte: Autora.

9.3.3 Citolocalização das mucinas heterólogas e superexpressas

Para essa análise, foram observadas a citolocalização das mucinas fusionadas à FlagGPI nas formas tripomastigota - forma infectiva do parasito -, além da forma replicativa em cultura. Para tal foi realizada diferenciação *in vitro* das linhagens transfectadas, sendo que todas foram capazes de atingir níveis de diferenciação compatíveis com o observado para a cepa selvagem (dados não mostrados).

Para avaliação da presença das mucinas na superfície dos parasitos, foi realizada microscopia de fluorescência indireta com anticorpo anti-FlagTag. O protocolo foi executado de modo que as linhagens que expressam mucinas não foram permeabilizadas com Triton x-100 na etapa prévia ao bloqueio. Ainda, nenhum tampão entre as lavagens conteve algum tipo de detergente. Esses procedimentos foram adotados com o objetivo de que o anticorpo não tivesse acesso os epítomos intracelulares das proteínas fusionadas com FlagTag. Dessa forma, toda fluorescência emitida é proveniente da membrana externa do parasito. Como controles, foram utilizadas as linhagens Choachí_FlagGPI com e sem permeabilização. Uma vez que, essa linhagem expressa a proteína FlagGPI, mas sem um peptídeo sinal a proteína fica dispersa no citosol. Logo, é esperado que somente os parasitos permeabilizados apresentem fluorescência. Também foi incluída como controle a cepa Choachí_WT, com e sem permeabilização e incubada com os anticorpos anti-Proteína ligante de Cálcio flagelar (FCaBP) que reconhece uma proteína de membrana plasmática e anti-Dihidrolipoamida desidrogenase (DLD) que reconhece uma proteína mitocondrial.

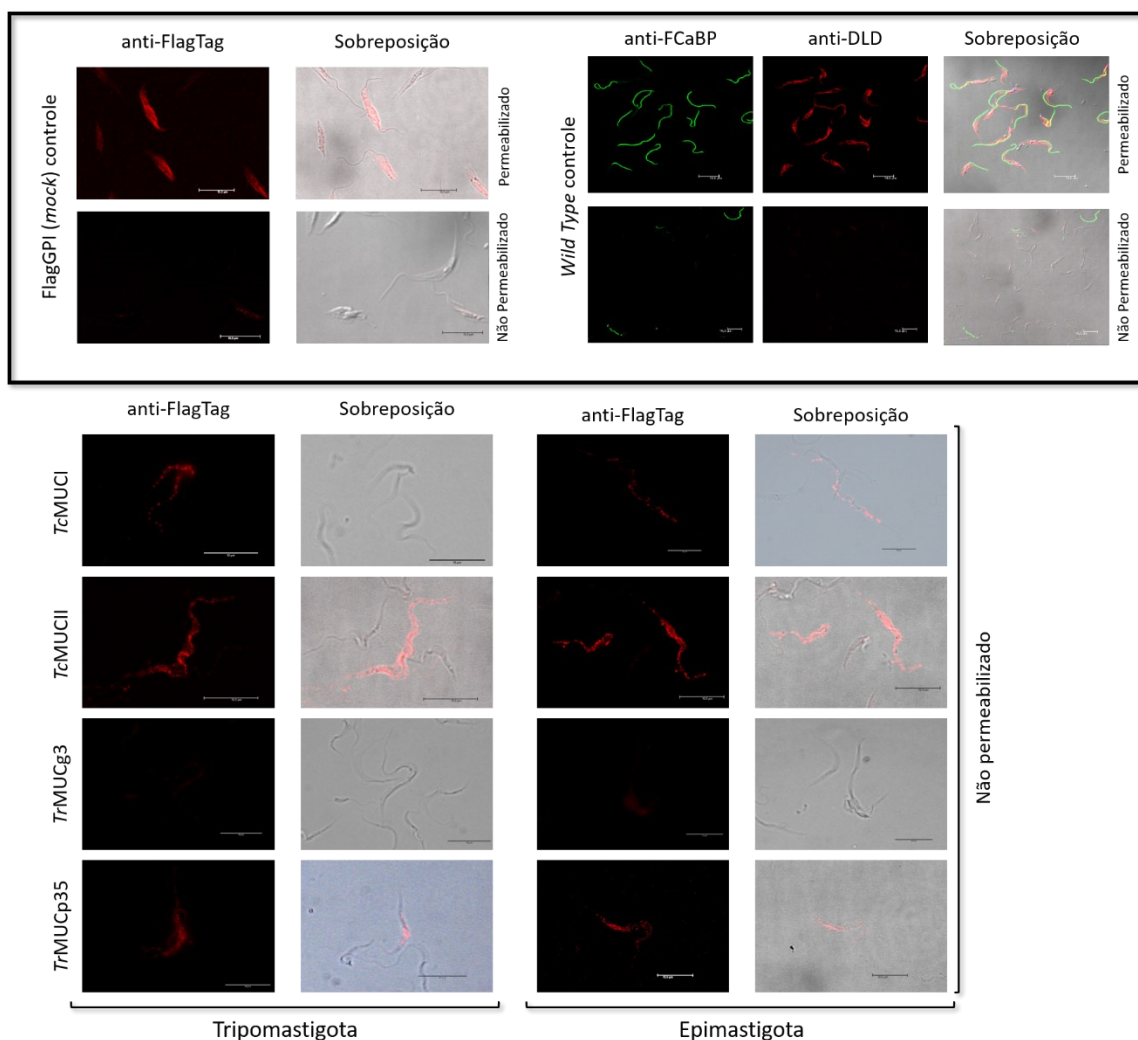
Com base nos resultados da imunofluorescência (Figura 32), conclui-se que todas as mucinas expressas de forma fusionada estão na membrana plasmática do parasito, tanto em formas epimastigotas quanto em tripomastigotas.

Conforme o esperado, não houve o reconhecimento nos controles não permeabilizados pelo anticorpo anti-FlagTag e anti-DLD, visto que esses anticorpos reconhecem proteínas intracelulares. Curiosamente, não houve marcação pelo anti-FCaBP nas células não permeabilizadas. Esse anticorpo foi incluído como controle, pois reconhece uma proteína de membrana localizada no flagelo. Contudo, apesar de ser uma proteína de membrana, é possível que o epítomo que esse anticorpo reconhece seja intracelular. Por essa razão, somente nos parasitos permeabilizados anti-FCaBP reconheceram a proteína alvo. De toda forma, os controles utilizados, confirmam a especificidade da técnica e nos fornecem segurança para afirmar que,

em todas as linhagens transfectadas há expressão de mucina na superfície da membrana plasmática, como planejado. Na linhagem Choachí_*TrMUCg3* pouquíssimas células foram encontradas marcadas e com uma fluorescência muito baixa, o que já era esperado com base pela análise de WB.

Figura 32 – As mucinas fusionadas à FlagTag são expressas na face externa da membrana do parasito.

Imunofluorescência indireta de epimastigotas e tripomastigotas das linhagens de Choachí transfectadas para expressão de mucinas fusionadas não permeabilizados. Anticorpos anti-FlagTag e Alexa Fluor 593 anti-*mouse*. Controles de técnica: epimastigotas de Choachí_FlagGPI e Choachí_WT permeabilizados e não permeabilizados. Anticorpos anti-FCaBP e Alexa Fluor 488 anti-*mouse*; anti-DLD e Alexa Fluor 594 anti-*rabbit*. Imagens dos controles destacados na caixa preta.



Fonte: Autora.

Para a certificação da localização das mucinas, o protocolo de extração de proteínas por Triton X-114 (CORDERO *et al.*, 2009) também foi realizado, seguido de ensaio por WB com anti-FlagTag de todas as frações obtidas da extração. Essa

metodologia visa a obtenção de fração final enriquecida de proteínas ancoradas por GPI. De acordo com o resultado obtido, em praticamente todas as frações houve reconhecimento das mucinas fusionadas à FlagTag, e assim, conclui-se que as mucinas fusionadas à FlagGPI estão ancoradas à GPI. Contudo, a localização não é exclusiva na membrana plasmática. Por falta de controles apropriados para cada uma das frações, não foi possível inferir proporcionalidade no direcionamento das mucinas à membrana. O experimento com Triton-X114 foi executado somente com a linhagem Choachí_TcMUCII, utilizando a cepa selvagem como controle. Nenhuma proteína foi reconhecida na cepa Choachí WT (dados não mostrados).

9.4 ANÁLISE DE INTEGRAÇÃO AO GENOMA

Após aproximadamente 30 dias de cultivo na presença de 500 µg/ml de G418, os parasitos passaram a ser cultivados em paralelo com e sem a droga. Após transcorridos 30 dias da ausência de G418, o DNA genômico foi extraído para verificação por PCR da manutenção da integração do cassete de expressão heteróloga. A amplificação foi realizada com o iniciador Tubulin F, o qual se liga exclusivamente no genoma do parasito, e HX1 Confirm, iniciador desenhado para a ligação na sequência do cassete, gerando um produto de 1,7 kb que indica a integração do cassete no *locus* β-tubulina do genoma do parasito, como demonstrado na Figura 33A.

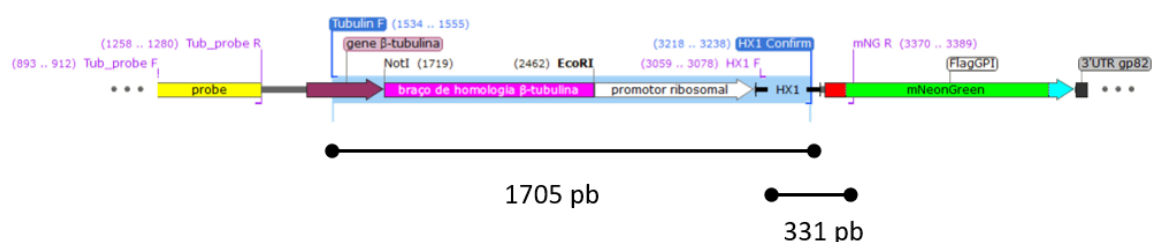
Como discutido nos resultados anteriores, algumas mucinas expressam bandas de diferentes tamanhos. Desse modo, realizou-se a certificação do tamanho dos genes clonados. Para tal, os iniciadores HX1 F e mNG R que se ligam no cassete foram utilizados. Esses iniciadores flanqueiam a região de clonagem das mucinas. Gerando produtos de tamanhos diferentes conforme o gene (Figura 33B).

Através da análise do tamanho dos produtos de PCR gerados, foi possível concluir que houve a integração dos cassetes FlagGPI-pROCK, contendo os genes de mucina no genoma de todos os parasitos analisados. Além disso, foi também possível garantir a não alteração dos insertos contidos no cassete, após a recombinação homóloga ou ocorrência de contaminação entre linhagens em cultivo pela manutenção de banda única e em posição pré-estabelecida para cada mucina.

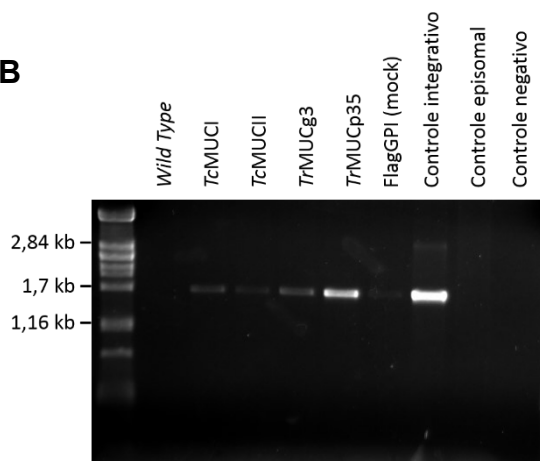
Figura 33 – Integração do cassete FlagGPI no *locus* β -tubulina.

A) Esquema representativo do cassete FlagGPI integrado ao genoma de *T. rangeli*. Barras pretas indicam tamanhos dos produtos de amplificação esperados para cada par de iniciadores utilizados. **B)** Eletroforese em gel 1% agarose do produto de amplificação obtido com iniciadores Tubulin_F e HX1 Confirm. **C)** Análise dos produtos de amplificação gerados pelos iniciadores HX1 F e mNG R dos cassetes integrados ao genoma. *Amplicons* esperados: *TcMUCI* s/ GPI (314 pb), *TcMUCII* s/ GPI (596 pb), *TrMUCg3* s/ GPI (353 pb) e *TrMUCp35* s/ GPI (897 pb) em adição aos 331 pb presentes no cassete. Controle integrativo: DNA genômico da cepa Choachí transfectada com o plasmídeo APx_pROCK (não contém gene mNG). Controle episomal: plasmídeo FlagGPI. Controle negativo: reação sem DNA molde. Marcador de massa molecular *in house* HMW (DNA Fago λ digerido com *Pst*I).

A

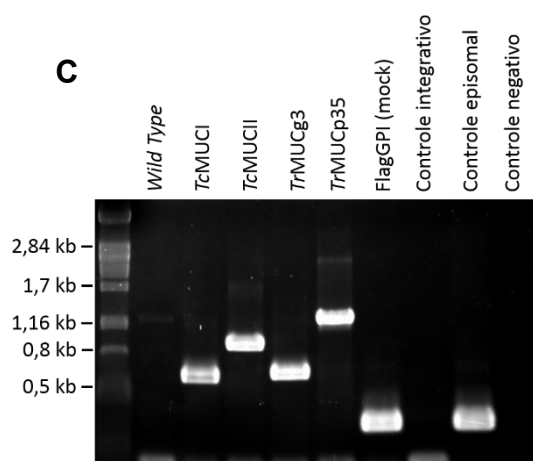


B



Fonte: Autora.

C



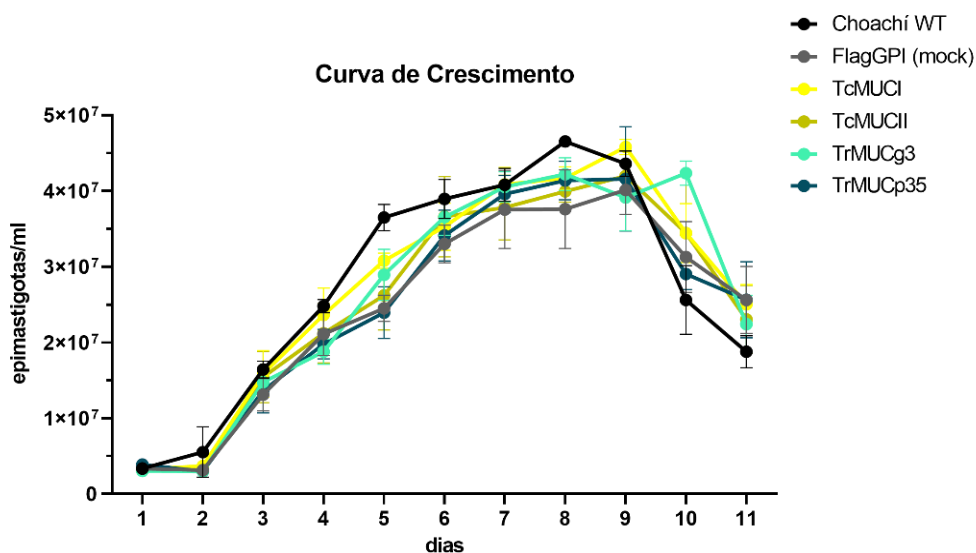
9.5 ANÁLISE DA TAXA DE REPLICAÇÃO DE EPIMASTIGOTAS EM CULTURA

Como parte do processo de caracterização das linhagens transfectadas, foi realizada a avaliação de taxa de crescimento em cultivo (Figura 34). Nenhuma linhagem diferiu significativamente em crescimento em relação à cepa Choachí_WT. (*FlagGPI* $p=0,0781$; *TcMUCI* $p>0,9999$; *TcMUCII* $p=0,3575$; *TrMUCg3* $p=0,9323$; *TrMUCp35* $p=0,0937$).

Dessa forma, tendo caracterizado as linhagens transfectantes e obtendo a confirmação (i) da expressão das mucinas fusionadas; (ii) localização na superfície dos parasitos; (iii) da integração do cassete ao genoma; (iv) da não alteração do crescimento *in vitro* e (v) capacidade de diferenciação em tripomastigotas; foram executados os experimentos de avaliação da influência das mucinas nos hospedeiros de *T. rangeli*.

Figura 34 – A expressão de mucinas fusionadas à FlagGPI não altera do crescimento do parasito em cultura axênica.

Cultivos realizados de acordo com preconizado para linhagem Choachí na ausência de G418, a partir da concentração de 2×10^6 epimastigotas/ml. Análise realizada por contagem diária em câmara de Neubauer. Gráfico expresso em média e desvio padrão de triplicata biológica. Análises estatística: ANOVA de duas vias com pós teste de Dunnett (linhagens comparadas contra Choachí_WT).



Fonte: Autora.

9.6 INFECÇÃO EM MAMÍFERO

9.6.1 Expressão de *TcMUCII* promove aumento de parasitemia, enquanto *TrMUC* diminui a infectividade da cepa Choachí em mamíferos

Considerando que as mucinas atuam como aceptores de Sia, e que estão intimamente envolvidas na interação patógeno-hospedeiro, os experimentos deste capítulo tiveram foco na avaliação da infectividade do *T. rangeli*, visto a necessidade de informações sobre o ciclo desse parasito.

A parasitemia é uma das principais características da infecção de mamíferos por *Trypanosoma* spp. Não apenas pelo fato de que é possível encontrar os parasitos no sangue durante a infecção, mas também porque a quantidade, a frequência e a duração da parasitemia expressam a diversidade de adaptações apresentadas pelas espécies do gênero. Em *T. cruzi*, a parasitemia pode persistir por aproximadamente um mês, sendo que entre 7 a 9 dias após a infecção é registrada a parasitemia máxima, seguida de um segundo pico de menor intensidade após aproximadamente 14 dias de infecção. Com o passar do tempo, o número de parasitos circulantes diminui, iniciando a fase crônica. Para *T. brucei* - que é extracelular -, a parasitemia ocorre em ciclos contínuos de aumento e diminuição do número de parasitos na corrente sanguínea. Nesses dois casos, a parasitemia reflete o ciclo de vida dessas espécies no hospedeiro mamífero. Enquanto, a quantidade de *T. cruzi* no sangue diminui porque os parasitos estão em sua fase replicativa intracelular, e, após sete dias aumenta novamente, pois houve a liberação de tripomastigotas das células infectadas (DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010); a parasitemia de *T. brucei* diminui e aumenta em reflexo a variação antigênica das glicoproteínas VSG e *quorum sensing* dos parasitos. Dessa forma, uma população de *T. brucei* com uma determinada variação antigênica sobrepõe outra que passa a ser reconhecida pelo sistema imune (MACGREGOR *et al.*, 2012), e dessa forma consegue evadir continuamente o reconhecimento do sistema imune do hospedeiro, sustentando a infecção.

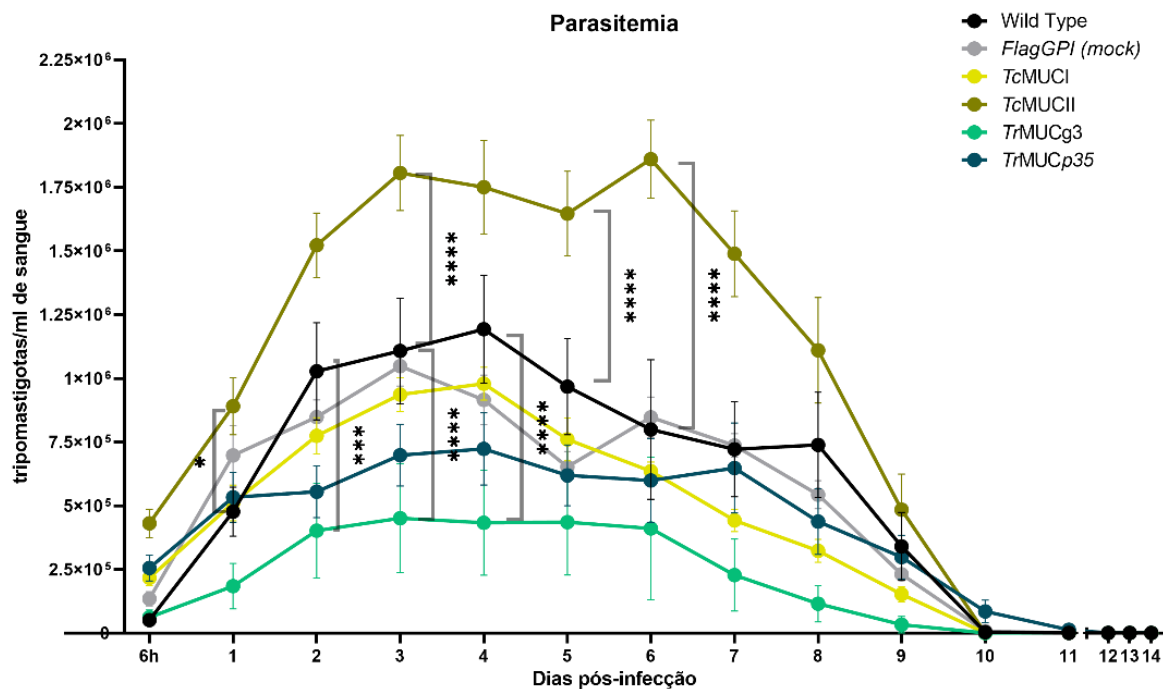
Sabendo disso, compreender a parasitemia de *T. rangeli* e avaliar os fatores que possam influenciar nos índices - quantidade, frequência e duração - auxiliam a compreensão do ciclo de vida dessa espécie em seus hospedeiros mamíferos. Através da infecção com a linhagem Choachí superexpressando *TrMUCg3*, *TrMUCp35* ou ainda expressando as mucinas heterólogas *TcMUCI* e *TcMUCII*, foi observado que o padrão de infecção é alterado de acordo com o transfectante, como demonstrado na Figura 35.

Figura 35 – Cinética de parasitemia de camundongos BALB/c infectados por Choachí expressando mucinas fusionadas à FlagGPI.

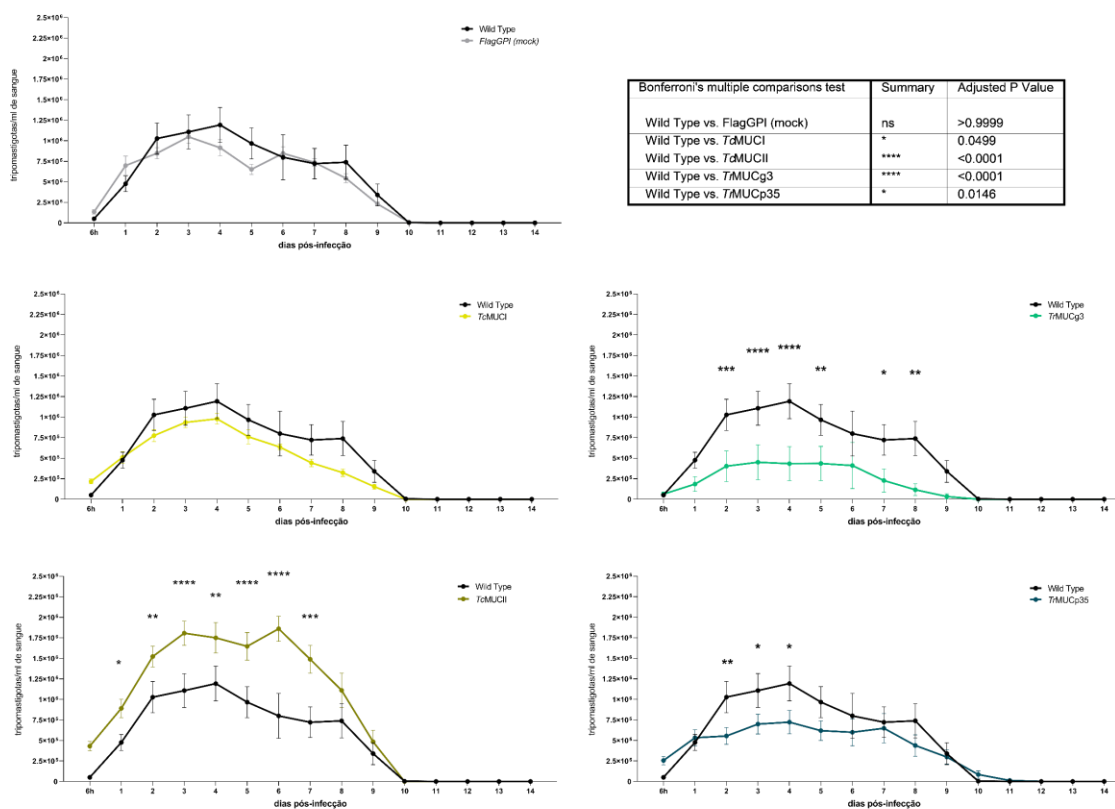
Contagem de parasitos em sangue pelo método de Pizzi-Brener. **A)** Gráfico resumo da cinética de parasitemia, com todas as linhagens transfectadas para expressão de mucinas fusionadas à FlagGPI e controles Choachí_WT e Choachí_FlagGPI (*mock*). Comparações estatísticas de maior relevância biológica de Choachí_*TcMUCII* e Choachí_*TrMUCg3* em relação à Choachí_WT assinaladas no gráfico. **B)** Comparação par a par das linhagens transfectadas em relação à cepa

parental. Análise estatística: ANOVA de duas vias, com pós teste de Dunnett. Significância da comparação entre as cepas por dia (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Tabela de p valor referente a análise global da cepa parental em relação as cepas transfectadas.

A



B



Fonte: Autora.

Dessa infecção experimental, pode-se concluir que a linhagem Choachí_*TcMUCII* promove o aumento de parasitemia de forma significativa em relação aos controles Choachí_WT e Choachí_FlagGPI ($p < 0,0001$). Com essa linhagem, o número de parasitos no sangue é maior desde o 1º dia até o 7º dia de infecção. Entretanto, a linhagem Choachí_*TrMUCg3* tem a sua infectividade reduzida em camundongos BALB/c ($p < 0,0001$). Dos sete animais desse grupo, três não apresentaram parasitemia e um apresentou quantidade ínfima de parasitos. Além disso, Choachí_*TrMUCp35* também apresentou menor parasitemia ($p = 0,146$) em relação ao controle. Assim, ambas linhagens que superexpressam *TrMUC* apresentaram perturbação na infecção em camundongos.

TcMUCII é o tipo de mucina mais expressa por tripomastigotas de *T. cruzi*. À essa mucina é ligado o Sia, tornando a carga total da superfície do parasito eletronegativa. Essa propriedade influencia na capacidade de reconhecimento por anticorpos, tornando os tripomastigotas refratários ao anticorpos anti- α -galactosil (PEREIRA-CHIOCCOLA *et al.*, 2000), o que poderia explicar uma possível indução de proteção à infecção pelo *T. rangeli* em função do parasito estar expressando a *TcMUCII*. Ainda que o *T. rangeli* não possua trans-sialidases ativas, capazes de catalisar a transferência do Sia para a mucina heteróloga, o parasito possui um rol de sialidases ativas (PONTES-DE-CARVALHO; TOMLINSON; NUSSENZWEIG, 1993); e que de alguma forma, a conjugação desses fatores pode influenciar a promoção da infectividade.

Se ponderado o papel das mucinas em relação a cada forma de *T. cruzi*, compreende-se que a relação das mucinas com o hospedeiro requer um fino equilíbrio entre graus de sialilação e a interação com diferentes grupos de *TcTS* (com e sem a atividade de transferência de Sia). Isso foi observado em tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi*, que possuem *TcTS* com menor atividade de transferência de Sia, mas expressam diversas outras enzimas com capacidade de promoção da adesão celular, como por exemplo gp82 (RUIZ *et al.*, 1998). Foi demonstrado que tripomastigotas metacíclicos previamente tratados com neuraminidase comercial, para a remoção do ácido da superfície dos parasitos, apresentam aumento de infectividade *in vitro* (YOSHIDA *et al.*, 1997). Dessa forma, o que aparentemente ocorre com a linhagem Choachí_*TcMUCII* é semelhante à condição do tripomastigota metacíclico, promovendo uma maior interação entre o parasito e as células, mesmo que na

ausência de trans-sialidase, favorecendo a entrada de *T. rangeli* na corrente sanguínea.

Sobre esse processo de entrada, ainda se desconhecem os mecanismos que *T. rangeli* utiliza de permear da membrana peritoneal para atingir a corrente sanguínea. A parasitemia de infecções experimentais de *T. rangeli* é caracteristicamente menor que o inóculo inicial. Ou seja, muitos parasitos não conseguem estabelecer a infecção. Entretanto, observa-se que uma população de parasitos possui alta avidéz para transpor o espaço intraperitoneal para a corrente sanguínea, sendo possível detectar parasitos no sangue poucas horas após a infecção. Dessa forma, é possível que a densa quantidade de modificações pós-traducionais de TcMUC (como observado na Figura 29) possa ter contribuído com essa interação.

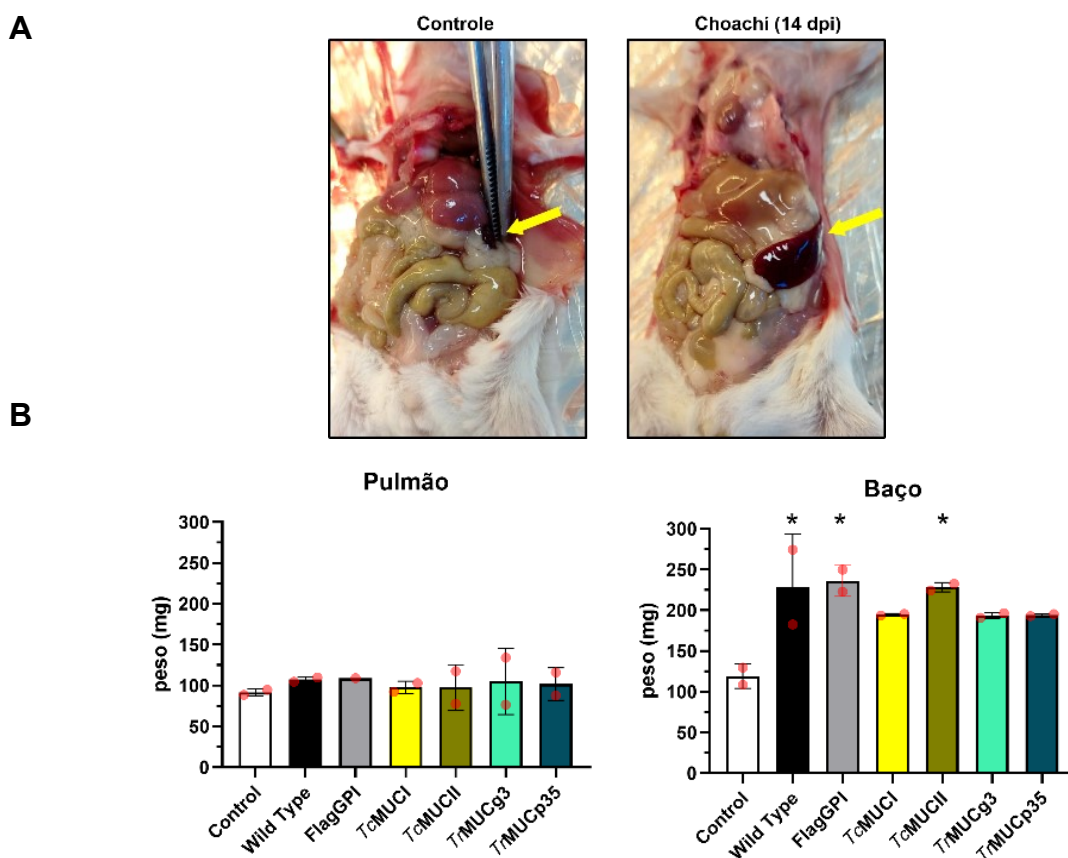
Com relação à duração da parasitemia, observa-se que mesmo para a linhagem de maior infectividade (Choachí_TcMUCII), o tempo de permanência na corrente sanguínea não foi alterado, sendo que todas as linhagens apresentam declínio do número de parasitos a partir do 6º d.p.i. e tornando a infecção subpatente. Então, apesar da expressão heteróloga de TcMUCII desencadear algum processo que aumenta a quantidade de parasitos no sangue, os eventos que levam ao *clearance* da maior parte dos parasitos não são alterados após uma semana de infecção. Uma demonstração desse fenômeno de eliminação do parasito pode ser observada na Figura 48 no apêndice desta tese, no qual é possível visualizar a deformação celular de tripomastigotas de *T. rangeli* no sangue de camundongos infectados, indicando uma possível eliminação independente de fagocitose. Pereira-Chiocola *et al.* (2000) demonstram que a ação dos anticorpos anti- α -galactosil promove a desestabilização da membrana de *T. cruzi*. Esse fato, ou outro processo semelhante, podem ser considerados como um dos mecanismos da eliminação de *T. rangeli*; que mesmo expressando TcMUC II – que não é sialilada em *T. rangeli* - é suprimido simultaneamente à cepa selvagem. Contudo um melhor detalhamento dessa observação é necessário para confirmar essa hipótese.

9.6.2 Resposta do hospedeiro à infecção por *Trypanosoma rangeli* expressando mucinas fusionadas à FlagGPI.

Durante as necropsias dos camundongos infectados por *T. rangeli*, foi observado o aumento perceptível do volume do baço em diversos animais (Figura 36A). Essa alteração, foi verificada em diferentes experimentos independentes ao longo desta tese, não apenas com transfectados expressando as mucinas fusionadas à FlagGPI. Como discutido no capítulo I, após análise por bioluminescência, pode ser identificado que o baço e o pulmão contém grande quantidade de parasitos até 9º dia da infecção, indicando que deva ocorrer alguma resposta do hospedeiro frente à presença do *T. rangeli* nesses órgãos.

Figura 36 – Esplenomegalia induzida pela infecção por *Trypanosoma rangeli*.

A) Fotografia expositiva de necropsia em camundongos BALB/c experimentalmente infectados com *T. rangeli*. À direita, controle não infectado. À esquerda: infectado com a Choachi_WT em 14 d.p.i. Seta amarela indica o órgão baço. **B)** Análise do peso de baço e pulmões. Gráfico expresso em média e desvio padrão. Órgãos coletados em 17 d.p.i. (n = 2). Análise estatística: ANOVA de uma via, com pós teste de Dunnett (* $p < 0,05$).



Fonte: Autora.

Diante das observações que apontam (i) a presença do parasito no baço e nos pulmões, (ii) alterações fisiológicas promovidas pela infecção e (iii) a modulação de mucinas de *T. cruzi* como promotoras de resposta pró-inflamatória (ALMEIDA et

al., 2000), esses órgãos foram selecionados para a avaliação de resposta inflamatória por histologia e dosagem de citocinas (CBA).

Para a dosagem de citocinas, os órgãos inteiros foram pesados para a normalização dos dados, permitindo avaliar o peso dos órgãos *per se* (Figura 36B). Não foi identificada nenhuma diferença significativa quanto ao peso dos pulmões entre camundongos infectados e não infectados. Contudo, o baço apresenta aumento de aproximadamente o dobro do peso para todas as linhagens de *T. rangeli* avaliadas (transfectadas e selvagem). Foram considerados significativos o aumento do baço dos animais infectados com Choachí_WT ($p= 0,0176$), Choachí_FlagGPI ($p= 0,0123$) e Choachí_TcMUCII ($p= 0,0176$). Recentemente, foi descrita a presença de DNA de *T. rangeli* no interior de esplenócitos até 30 dias após a infecção, e de forma semelhante foi realizada a comparação do aumento do tamanho do baço na infecção por *T. rangeli* (FERREIRA *et al.*, 2020).

Desde a primeira paciente da doença de Chagas, diagnosticada por Carlos Chagas, observa-se a ocorrência de esplenomegalia em pacientes na fase aguda da infecção por *T. cruzi* (LIDANI *et al.*, 2019), onde há ativação de células B e T, além de outras células que regulam a inflamação no baço como células *Natural Killer* (NK) (BERMEJO *et al.*, 2011; MICHEL *et al.*, 2012; MONTES *et al.*, 2007). Na análise histológica dos tecidos de camundongos infectados com Choachí_WT e transfectados expressando as mucinas fusionadas à FlagGPI (Figura 37), foram observadas alterações como hiperplasia polpa branca de leve a moderada no baço da maior parte dos animais infectados, exceto os das linhagens Choachí_TcMUCI e Choachí_TcMUCII.

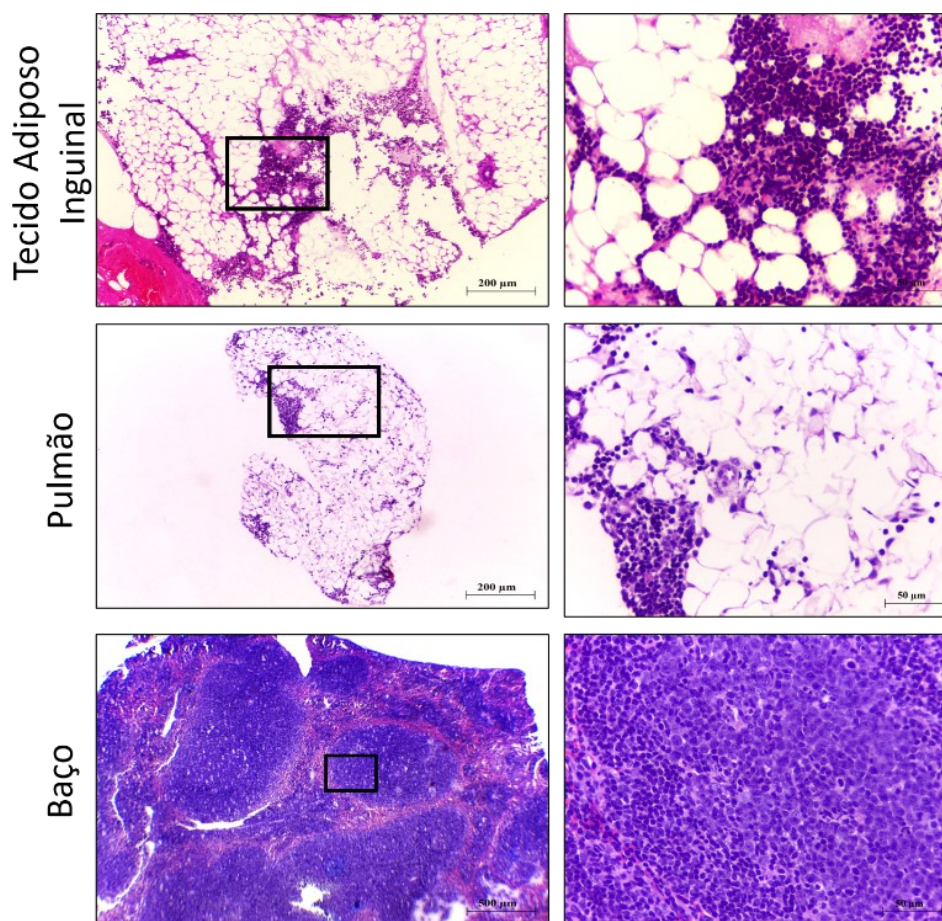
Quanto ao pulmão, poucas alterações de cunho inflamatório foram observadas, dentre as quais podem ser apontadas a presença de infiltrado mononuclear multifocal leve nos animais infectados pela linhagem Choachí_TcMUCII. No tecido adiposo inguinal (próximo ao sítio de inoculação) foi observado um infiltrado perivascular mononuclear multifocal em diversos animais, exceto nos infectados com a linhagem Choachí_TrMUCp35. A análise dos demais órgãos e tecidos apresentaram considerável divergência entre indivíduos de um mesmo grupo, não permitindo a observação de um padrão consistente. A tabela sumarizada dos resultados das análises histológicas é apresentada no apêndice desta tese (Tabela 14).

Quanto à avaliação de alterações das populações leucocitárias em sangue periférico, não foram encontradas diferenças significativas quanto à celularidade em

resposta à infecção em nenhum dos animais independentemente da linhagem infectante. A tabela com os dados das contagens, bem como os valores referência para BALB/c (SANTOS *et al.*, 2016), são apresentados no apêndice desta tese (Tabela 13).

Figura 37 – A infecção por *Trypanosoma rangeli* induz surgimento infiltrado inflamatório leve em diferentes tecidos.

Imagens representativas da avaliação histológica de camundongos infectados com *T. rangeli* expressando mucinas fusionadas em 14 d.p.i. Tecido adiposo: Infiltrado perivascular mononuclear multifocal; Pulmão: Infiltrado mononuclear multifocal leve. Baço: Hiperplasia polpa branca moderada. Parâmetros de avaliação: análise de 50 campos em magnificação de 1000x de quatro cortes histológicos com distanciamento de 15 μm entre os cortes. Graduação do infiltrado: Leve ≤ 25 células, Moderado: 26-50 células.



Fonte: Autora.

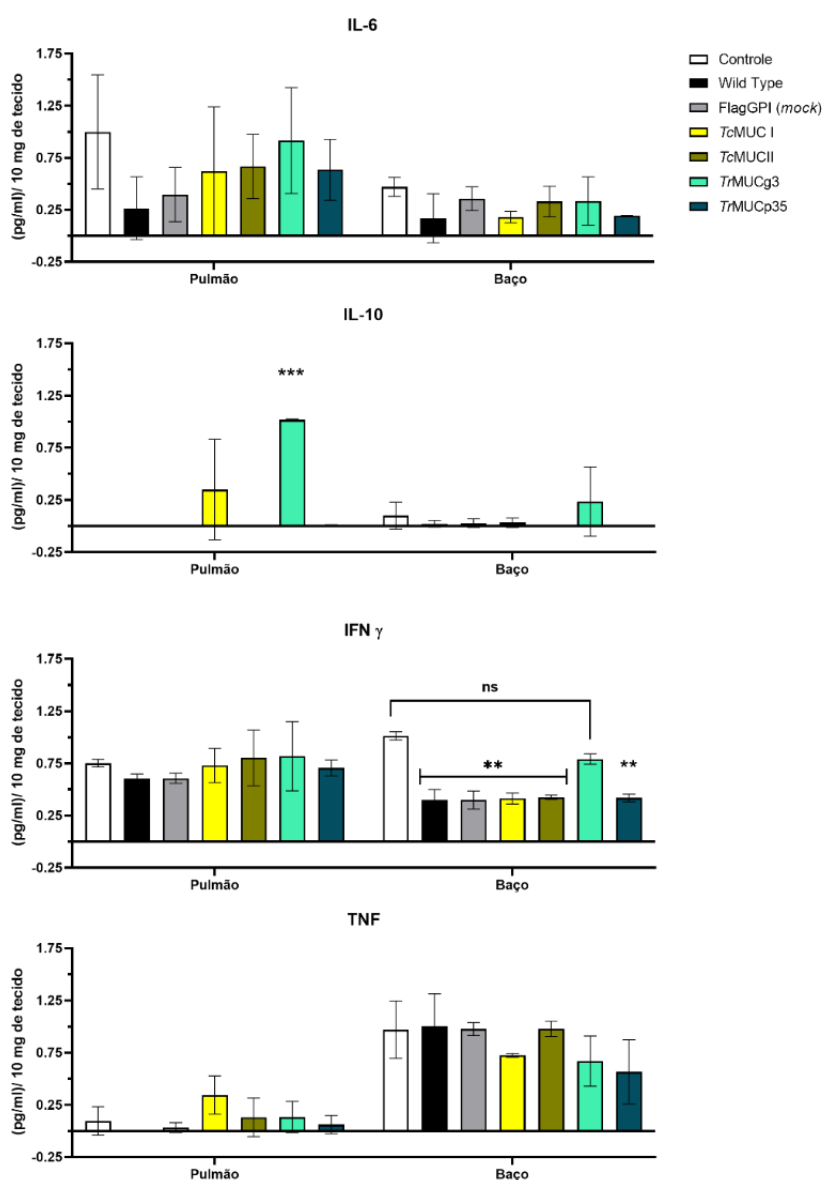
9.6.3 *Trypanosoma rangeli* modula negativamente a produção de INF γ no baço

Ao final dos experimentos de infecção, foi realizada a quantificação de citocinas presentes no baço e nos pulmões dos camundongos infectados com as diferentes

linhagens transfectantes de *T. rangeli*. Uma vez que, há alteração morfológica dos órgãos infectados (hiperplasia e existência de infiltrado inflamatório leve), buscou-se averiguar a resposta mediada por citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- γ , TNF, IL-12p70). Os resultados obtidos são apresentados na Figura 38.

Figura 38 – Dosagem de citocinas no baço e no pulmão de camundongos BALB/c infectados por *Trypanosoma rangeli*.

Gráfico da dosagem de citocinas de pulmão e de baço no 17 d.p.i. utilizando o kit CBA. Gráfico expresso em média e desvio padrão da concentração de cada citocina (pg/ml) normalizada pela massa de tecido. Análise estatística: ANOVA de uma via, com pós-teste de Dunnett (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, ns: Não significativo) Análise realizada em duplicata biológica. Valores abaixo da abrangência da curva padrão da dosagem, não incluídos na análise.



Fonte: Autora.

Notam-se diferenças com relação a expressão de citocinas dos camundongos infectados com a linhagem Choachí_*TrMUCg3*, que apresentou aumento de IL-10 no pulmão ($p=0,0001$) e não apresentou diferença em relação ao controle não infectado na quantificação de IFN γ no baço, destoando das demais linhagens que promoveram diminuição dessa citocina de forma significativa ($p= 0,0018 - 0,0028$).

IFN γ é uma das principais citocinas de ativação de fagócitos por via clássica. Expressa por células Th1 CD4⁺, CD8⁺ e células NK, o IFN γ incita a atividade microbicida de macrófagos e células dendríticas. Atua ainda em células B modulando a produção de determinados tipos de anticorpos IgG que promovem a opsonização, estimulam a expressão de proteínas componentes do complexo principal de histocompatibilidade e estão envolvidas no processamento do antígeno, entre outras funções (DRENNAN *et al.*, 2005). Dessa forma, aliando os dados observados da dosagem de citocinas aos dados de parasitemia, em que Choachí_*TrMUCg3* foi a linhagem que apresentou menor quantidade de parasitos na infecção, pode-se inferir que a superexpressão de *TrMUCg3* tenha desfavorecido o parasito – no que se refere à sobrevivência no hospedeiro mamífero –, alterando algum mecanismo que o *T. rangeli* utilize para modular a resposta imune do hospedeiro, possivelmente pela modificação da sinalização para a ativação de macrófagos.

Além desse fato, os resultados demonstram que há maiores níveis de IL-10 no pulmão de camundongos infectados com a linhagem Choachí_*TrMUCg3*. IL-10 é uma citocina regulatória envolvida na diminuição da resposta de macrófagos. No momento em que a análise foi realizada (17 d.p.i.) já não haviam mais parasitos circulantes em nenhum dos grupos avaliados. Talvez pela menor parasitemia – que pode inferir em incapacidade de Choachí_*TrMUCg3* sustentar a infecção –, os estímulos regulatórios para cessar a resposta de macrófagos foram secretados mais cedo ou mais intensamente em relação à demais linhagens. Considerando que o *T. rangeli* possa sustentar uma infecção dormente, conforme o sugerido na literatura, a presença do parasito sustenta a sinalização de contenção do agente infeccioso. Logo, será suprimida a expressão de IL-10 pela necessidade de manter os macrófagos ativos.

Essa interpretação da resposta imune diante da infecção de *T. rangeli*, corrobora com a hipótese de que o direcionamento dos parasitos para os pulmões e baço não se trate unicamente de um tropismo tissular do parasito, mas de sua captura por macrófagos ativados (TAVARES *et al.*, 2017). Ainda, Michel *et al.* (2012), abordam

a íntima relação de macrófagos e células NK especialmente no pulmão e baço para controle de infecções, e descreve que apesar de diferentes maturações das células NK conforme o órgão, os macrófagos induzem de forma diferenciada a citotoxicidade de células NK *in vitro* para resposta contra células tumorais.

Quanto a presença de citocinas no sangue, o plasma de todos os animais infectados e os controles também foi avaliado quanto a presença de citocinas, entretanto os valores obtidos ficaram abaixo do limite de detecção em todas animais e citocinas testados.

9.7 INFECÇÃO *IN VITRO*

Ponderando a possível relação entre macrófagos e *T. rangeli*, foram conduzidos experimentos em cultura celular, conforme o estabelecido por Eger-Magrigh *et al.* (2001), com algumas modificações.

Esses experimentos foram planejados para obtenção dos dados de proporção de células infectadas, quantidade de parasitos em interação (adesão e invasão) e análise de citocinas secretadas durante a interação. Para a melhor comparação dos efeitos, foram aplicados os mesmos parâmetros de quantidades de células e parasitos, condições de cultivo, opsonização entre outras características para todos os experimentos, a fim de compreender alguns dos eventos observados na experimentação *in vivo*. Dessa forma, buscou-se mimetizar ao máximo as condições da experimentação *in vivo*, mas com a vantagem do controle de fatores experimentais que o ambiente *in vitro* favorece. Assim, foram selecionadas as linhagens de camundongo L929 (fibroblasto de tecido conectivo subcutâneo) e RAW264.7. (macrófago murino) e opsonização dos parasitos com 50% de soro fresco murino (não inativado por calor) (maiores detalhes no tópico 8.8.2).

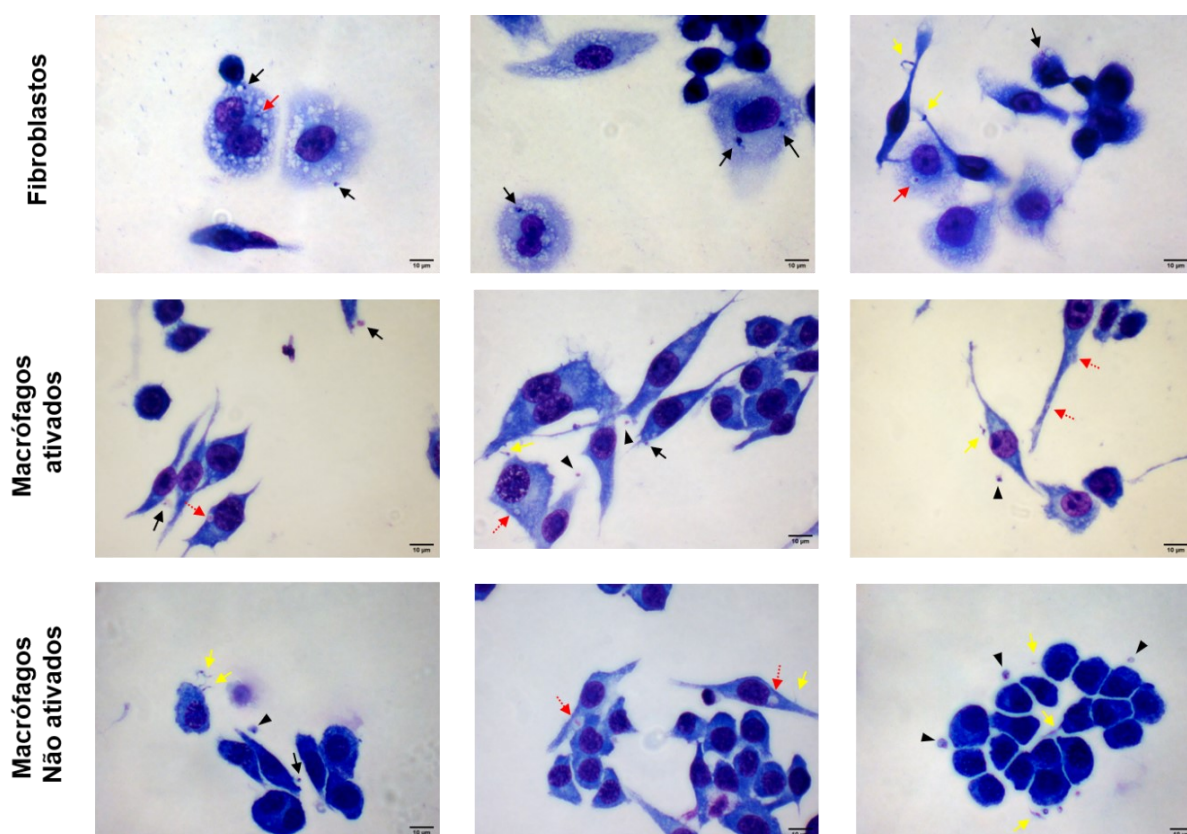
9.7.1 **A expressão das mucinas fusionadas não altera o padrão de infecção do *Trypanosoma rangeli* para células não fagocíticas**

Formas tripomastigotas expressando as mucinas fusionadas à FlagGPI, foram incubadas sobre a monocamada de fibroblastos (L929) a uma taxa de infecção (MOI) 30:1 (parasito: célula) por 2 h. Após a remoção dos parasitos não aderidos, as células infectadas foram novamente incubadas para a avaliação cinética de interação. Foram

mensuradas a quantidade de células em interação com os parasitos, bem como a quantidade de parasitos nas formas amastigota-*like*, tripomastigota e parasitos com claros sinais de degradação (presença de núcleo do parasito com ou sem localização de cinetoplasto e indefinição de limite citoplasmático) (Figura 39). Os resultados da quantificação de interação dos parasitos com fibroblastos estão apresentados na Figura 40.

Figura 39 - Infecção *in vitro* por *Trypanosoma rangeli* em células murinas.

Imagens demonstrativas da infecção *in vitro* pela cepa Choachí_WT após 2 h de interação com fibroblastos (linha superior), macrófagos ativados (linha central) e macrófagos não ativados (linha inferior), com indicações da classificação utilizada para a terminação da interação celular: Tripomastigotas (seta amarela), parasitos interiorizados em vacúolos (seta vermelha), parasitos em destruição ou lisados (seta vermelha pontilhada), amastigotas-*like* aderidos ou interiorizados (seta preta), amastigotas-*like* próximos às células (triângulos pretos). Barra de escala: 10 µm.



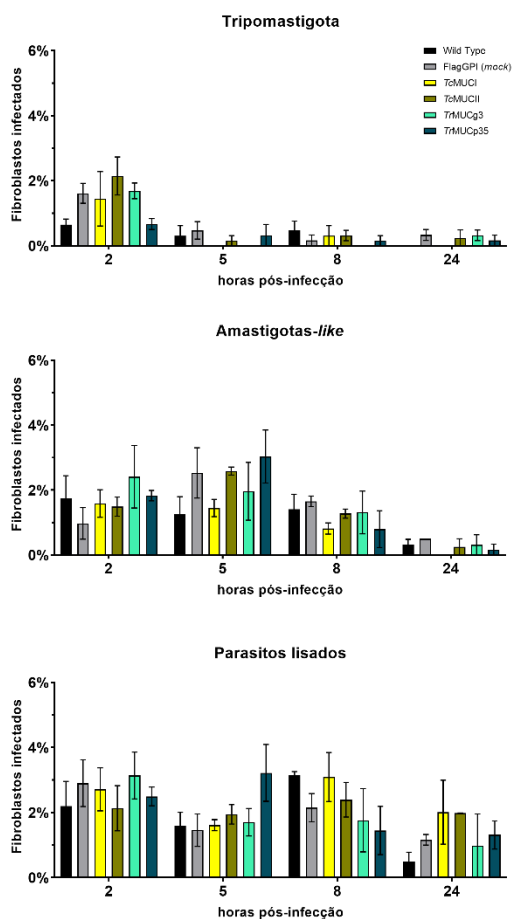
Fonte: Autora

Figura 40 – Interação *in vitro* de Choachí expressando mucinas fusionadas à FlagGPI com fibroblastos murinos.

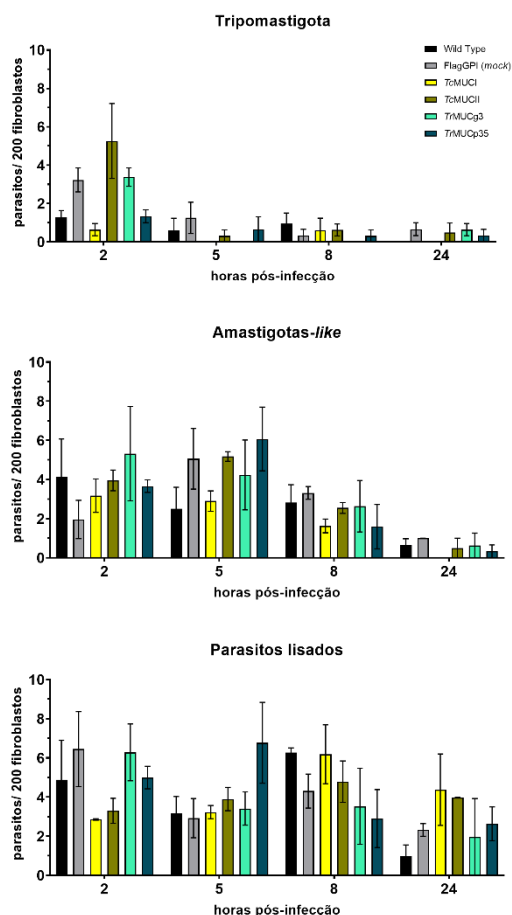
A) Gráfico da avaliação de interação parasito-célula com *T. rangeli* expressando mucinas fusionadas à FlagGPI de acordo com as formas amastigota-*like*, tripomastigota e em destruição ao

longo do tempo. **B)** Análise quantitativa cinética das linhagens transfectantes em interação com fibroblastos. Valores normalizado por 200 células. Controles Choachí_WT e Choachí_FlagGPI. Gráficos expressos em média e erro padrão de triplicata técnica. Contagem mínima de 200 células por replicata. Análise estatística: ANOVA de duas vias com pós-teste de Dunnett (em relação a cepa Choachí_WT).

A



B



Fonte: Autora.

Não foram observadas diferenças significativas entre as linhagens transfectadas e a cepa selvagem quanto ao número de fibroblastos infectados ou quanto à quantidade de parasitos envolvidos na interação. Como descrito por Eger-Mangrich *et al.* (2001) – que utilizou a linhagem Vero (fibroblasto de rim de macaco verde africano) para a análise de interação com célula não fagocítica –, o número de parasitos interagindo com as células e o número de células infectadas decaí com o tempo.

Contudo, observa-se que a quantidade de parasitos considerados em destruição não é alterada entre os tempos 2 h e 24 h ($p=0,0732$). No que se refere às

formas tripomastigotas, o número de parasitos reduz rapidamente, não sendo mais detectados a partir de 5 h de infecção em algumas linhagens avaliadas enquanto formas amastigotas-*like* foram observadas até 8 h da infecção, decrescendo na sequência ($p < 0,0001$). Dessa forma, pode-se compreender um pouco a dinâmica dos parasitos em contato com fibroblasto, que permeia todo o tecido conectivo. Nos ensaios experimentais, majoritariamente, os tripomastigotas rapidamente se tornam amastigotas-*like* e então são destruídos. Todavia, não foi comprovada a capacidade das linhagens expressando mucinas fusionadas aumentarem ou diminuir sua interação com fibroblastos. Devido a limitação metodológica, não foi possível mensurar com precisão quantos parasitos foram encontrados no interior das células, para comprovação da capacidade ativa de *T. rangeli* penetrar nas células. Contudo, foi observado a inclusão de alguns parasitos em estruturas membranares intracelulares, como vacúolos no interior dos fibroblastos (Figura 39).

9.7.2 A expressão de mucinas heterólogas ou superexpressão de mucinas não alteram a interação dos parasitos com macrófagos.

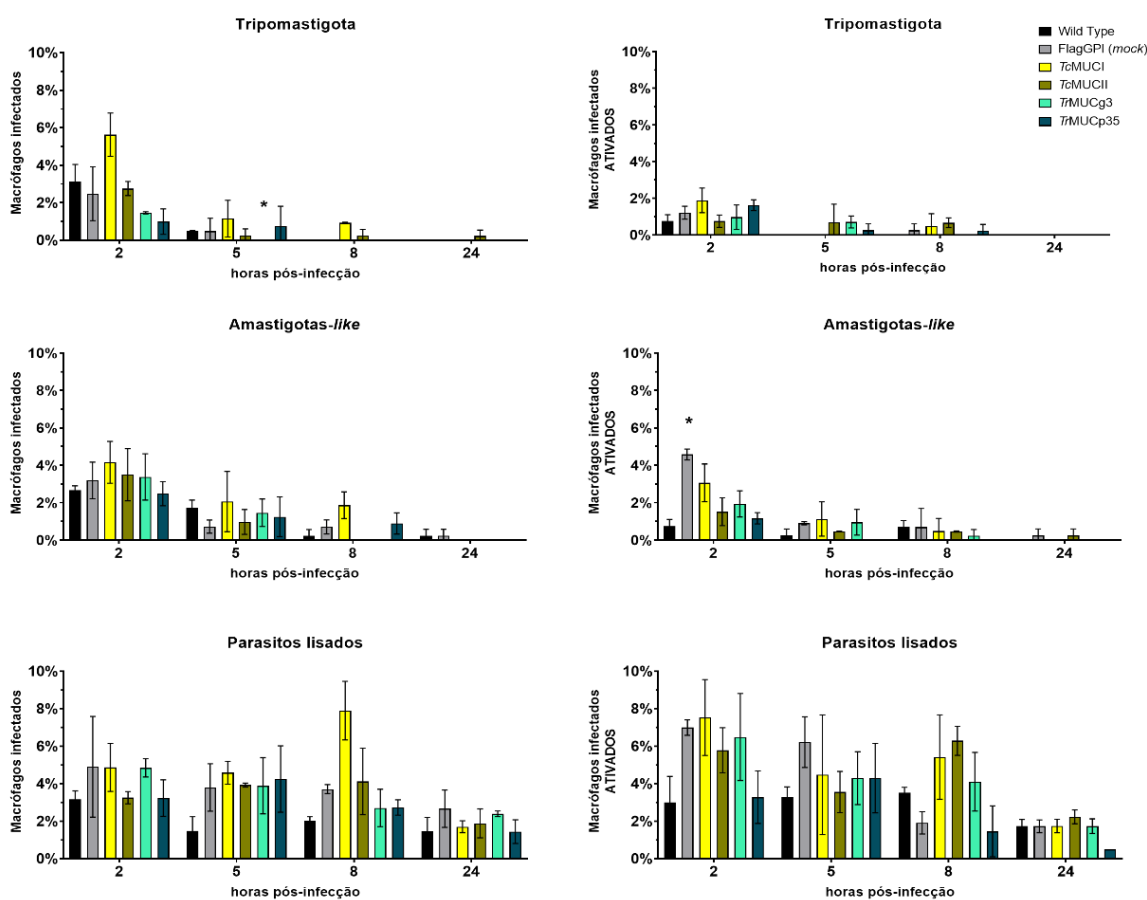
Com relação a interação das linhagens de *T. rangeli* expressando as mucinas fusionadas à FlagGPI perante macrófagos ativados ou não, não foram observadas diferenças de entre as linhagens, como demonstrado na Figura 41. Foram identificadas diferenças pontuais em Choachí_*Tr*MUCg3 e Choachí_FlagGPI, contudo essas diferenças estão relacionadas ao caráter de infectividade por algumas células (muitos parasitos em uma única célula ou questões metodológicas), mas por se tratar de fatos isolados, não representam a biologia da infecção. De forma que, na análise global, não houve diferença na taxa de infecção entre nenhuma linhagem expressando as mucinas fusionadas à FlagGPI e a Choachí_WT.

Com essa análise, pode ser observado comportamento semelhante ao demonstrado na interação com células L929, com uma diminuição acentuada do número de parasitos nas primeiras horas de interação, seguindo-se de um decréscimo progressivo dos parasitos íntegros ao longo da cinética de infecção.

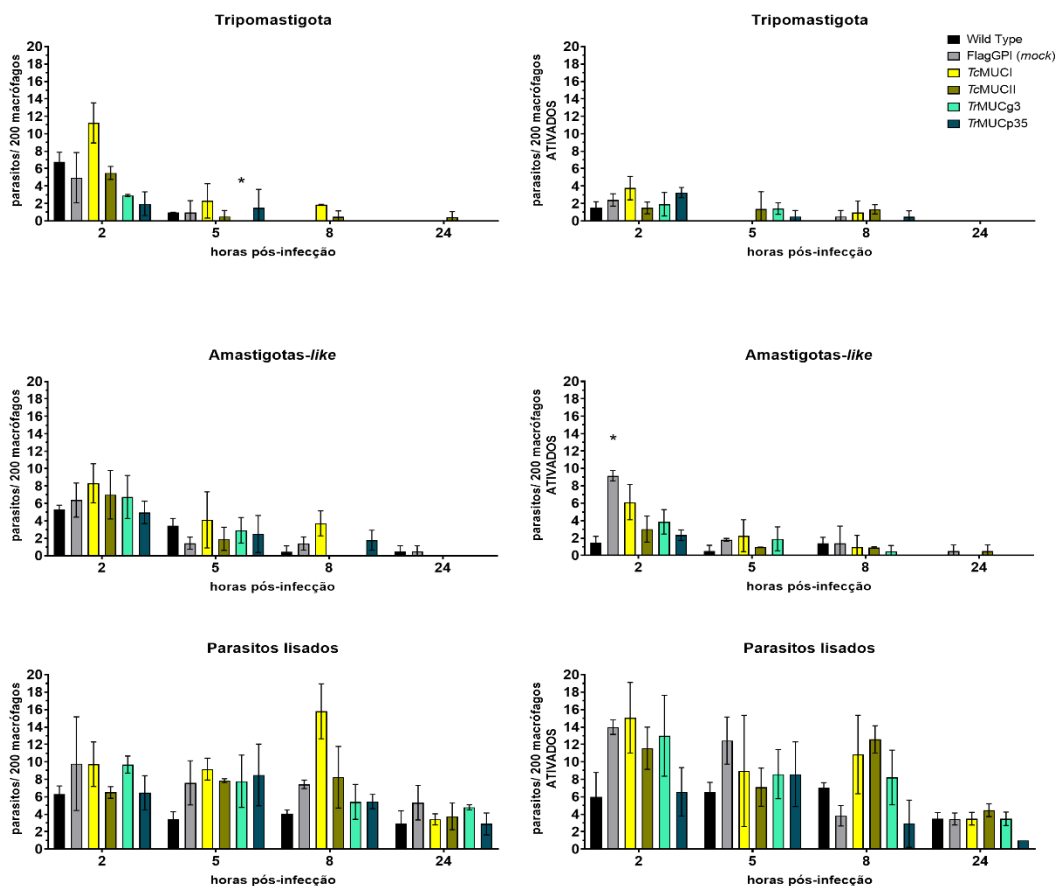
Figura 41 – Interação *in vitro* de macrófagos murinos com tripomastigotas expressando mucinas heterólogas e superexpressas.

A) Análise da taxa de infecção de macrófagos ativados e não ativados de acordo as formas tripomastigota, amastigotas-*like* e em destruição, ao longo do tempo. À direita: Macrófagos não ativados. À esquerda Macrófagos previamente ativados com 100 ng/ml LPS por 2h. **B)** Análise interação das linhagens transfectadas em função da quantidade tripomastigotas por 200 macrófagos, de acordo com a forma do parasito. Gráficos expressos em média e erro padrão de triplicata técnica. Contagem mínima de 200 células por replicata. Análise estatística: ANOVA de duas vias com pós-teste de Dunnett. (* $p < 0,05$)

A



B



Fonte: Autora

Em relação a prévia ativação dos macrófagos, fica evidente a ação na destruição dos parasitos. Nos ensaios com os macrófagos ativados, desde as 5 h de interação não são mais observadas formas tripomastigotas nas culturas. Esse fato, tem especial importância ao considerar a transmissão vetorial. Durante a picada, ocorre a introdução de microbiota do triatomíneo, tanto a presente na probólide, quanto a que possa ser introduzida pelas fezes no local da picada. Essa relação entre a microbiota e a infecção de *T. cruzi* já é bem estudada, visto que o patógeno é disperso nas fezes do triatomíneo. Contudo, transpondo que os processos de contaminação bacteriana que possam ocorrer para ambas as espécies de tripanosomatídeos pelo local da picada, a presença de LPS proveniente das bactérias pode impactar na infecção. Não necessariamente de forma a causar desvantagem ao parasito, uma vez que Osório *et al.* (1995) observaram que amastigotas-like internalizadas são viáveis e transmissíveis à *R. prolixus*.

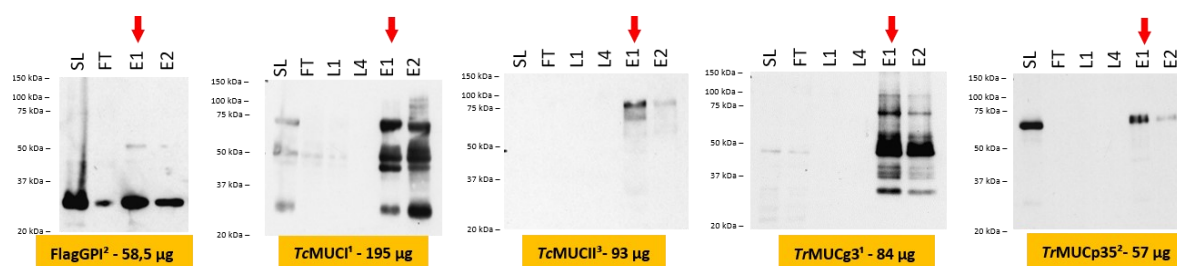
Novamente, do ponto de vista da avaliação de diferentes comportamentos entre as linhagens que expressam as mucinas, não foi observada nenhuma diferença. Em comparação ao trabalho de Schlindwein (2014), que através de expressão heteróloga de gp82 de *T. cruzi* por *T. rangeli*, observou o aumento de duas a três vezes na interação da linhagem Choachí_gp82 com células Vero e THP-1. O mesmo não foi observado para as mucinas fusionadas, independente do organismo de origem. Essa relação comparativa entre a capacidade adesiva de gp82 em contraste às mucinas gp35/50 (*TcSMUG*) foi avaliada por Ruiz *et al.* (1998), que concluíram que a invasividade promovida por gp82 é mediada por mobilização de cálcio intracelular na célula hospedeira, desencadeada em maiores quantidades por gp82 do que por mucinas ou gp90. Ainda, a superexpressão de mucinas gp35/50 impede a entrada de tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi* na célula hospedeira, ressaltando novamente a necessidade do equilíbrio entre as proteínas de superfície (RUIZ *et al.*, 1998c).

9.7.3 Modulação da secreção de citocinas pró-inflamatórias por *Trypanosoma rangeli* e mucinas fusionadas à FlagGPI purificadas

Para compreender em detalhes a resposta imune envolvida no experimento anterior, e, se as mucinas foco deste estudo influenciam na resposta pró-inflamatória, foi realizada a purificação das mucinas fusionadas à FlagGPI (conforme descrito em 8.6.) (Figura 42).

Figura 42 – Purificação de mucinas fusionadas à FlagGPI para avaliação da resposta pró-inflamatória.

Avaliação de pureza do produto purificado por WB das frações sobrenadante do lisado (SL), *Flow Through* (FT), 1ª e 4ª lavagem (L1 e L4), Eluido 1 e 2 (E1 e E2). O volume aplicado das frações SL, FT, L1 e L4: 5 µl. E1 e E2: 20 µl. Seta indica a fração escolhida para experimento. Indicação em amarelo com informações sobre lote (número sobrescrito) e valor de rendimento total de proteína obtida na purificação (soma E1 e E2).



Fonte: Autora.

O produto da purificação foi utilizado para interação direta com macrófagos ativados e não ativados. As citocinas secretadas pelas células foram mensuradas como demonstrado na Figura 43.

A partir desse resultado observa-se que, somente a mucina *TrMUCg3* modula positivamente a secreção de TNF por macrófagos não ativados ($p=0,0085$), ao passo que para macrófagos ativados, não há diferença na secreção de citocinas diante da presença das mucinas testadas.

Além disso, ao avaliar a resposta dos macrófagos não ativados diante do contato com os parasitos transfectados ou linhagem selvagem, não são observadas diferenças no perfil de secreção das citocinas avaliadas. Todavia, para os macrófagos ativados, a secreção de TNF é menor durante a infecção por *T. rangeli* com todas as linhagens de parasitos ($p= 0,0002 - 0,0004$). Interessantemente, a secreção de IL-6 pelos macrófagos é reduzida quando em contato com os parasitos, exceto os das linhagens que superexpressam as mucinas de *T. rangeli*.

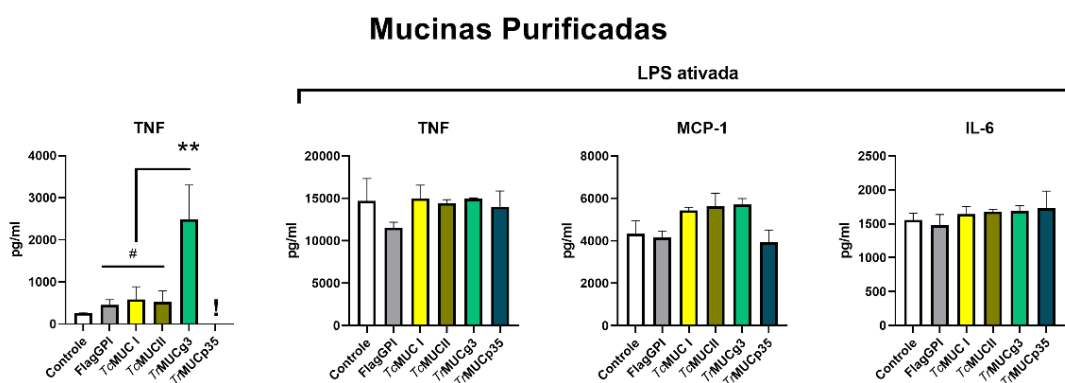
Com base nesses dados e nos obtidos da experimentação *in vivo*, a saber: Choachí_*TrMUCg3* induz expressão de IL-10 no pulmão e todas as linhagens de parasitos, exceto Choachí_*TrMUCg3*, diminuem expressão de IFN γ no baço em 17 d.p.i., conclui-se que o *T. rangeli* modula negativamente a expressão de algumas citocinas pró-inflamatórias *in vitro* e *in vivo*. Entretanto, a interferência causada pelos parasitos não é suficiente para suprimir a resposta pró-inflamatória dos macrófagos ativados por LPS.

Interessantemente, mesmo a interação com os tripomastigotas opsonizados por soro murino fresco, não há a ativação dos macrófagos. Sabe-se que *T. rangeli* é resistente à lise pelo sistema complemento murino e que há deposição de C3b na membrana do parasito (PONTES, 2020). Contudo, essa condição não parece induzir a ativação dos macrófagos. De toda forma, *in vitro* foi avaliado que ocorre fagocitose e lise dos parasitos. Mas, como descrito na literatura, esses parasitos são capazes de sobreviver no interior de macrófagos (OSORIO *et al.*, 1995). À luz dessa análise de citocinas, compreende-se que a resposta pró-inflamatória é modulada pela presença de *T. rangeli*, atenuando a injúria ao próprio parasito.

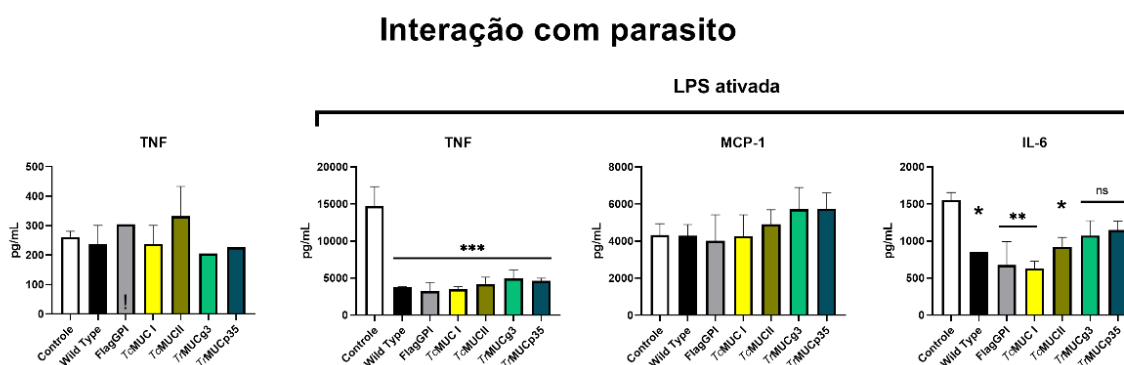
Figura 43 – *Trypanosoma rangeli* reprime a resposta pró-inflamatória de macrófagos ativados, mas *TrMUCg3* purificada estimula a secreção de TNF.

A) Secreção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos ativados e não ativados em resposta à presença de 10 µg/ml de mucinas purificadas. Controles: macrófagos não ativados e não ativados sem adição de mucina purificada e macrófagos em contato com produto de purificação FlagGPI (*mock*). **B)** Painel de citocinas produzidas em resposta à infecção por tripomastigotas de *T. rangeli* (MOI 1:10). Controles: macrófagos não infectados ativados e não ativados, macrófagos infectados por cepa Choachí_WT e Choachí_FlagGPI. Gráficos expressos em média e desvio padrão. Experimentos em duplicata técnica. Símbolo de exclamação (!): Exclusão de dados por motivo técnico. Análise estatística: ANOVA de uma via com pós-teste de Turkey (# $p < 0,05$ – diferença relativa às linhagens transfectadas) ou pós-teste de Dunnett. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ – diferenças relativas ao controle) (n=2). Citocinas IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- γ , TNF, IL-12p70 quantificadas *BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation Kit*. Valores abaixo da abrangência da curva padrão da dosagem, não incluídos na análise.

A



B



Fonte: Autora.

Com relação à participação de *TrMUC* na modulação de resposta pró-inflamatória, observa-se que especialmente que a linhagem Choachí_*TrMUCg3* (i) apresenta menor capacidade de infecção em camundongos e menor parasitemia; (ii) induz a expressão de IL-10 nos pulmões; (iii) não modula a resposta de IFN γ no baço;

(iv) não reprime a expressão de IL-6 por macrófagos ativados, além de que *TrMUCg3* purificada leva ao aumento da expressão de TNF *in vitro*.

Ainda, com relação aos resultados das análises genômicas e proteômicas, sabe-se que *TrMUCg* é o grupo com menor número de genes e o mais conservado em *T. rangeli*, possuindo um motivo proteico exclusivo; e interessantemente, Wagner *et al.* (2013) não detectaram a expressão dessa mucina na superfície de formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli*. Assim, infere-se que o grupo *TrMUCg* confere desvantagem quanto a infectividade de *T. rangeli* na relação com o hospedeiro mamífero.

Ainda, é possível que *TrMUCg* seja um grupo gênico em retração. Como elencado por Campo *et al.* (2004) a tendência de hipervariabilidade, como a apresentada em *TcMUCII* e também *TrMUCp*, denota a possibilidade de origem mais recente do que estruturas conservadas em *tandem* como as de *TcMUCI*, que seriam ancestrais. Assim, é possível que o grupo *TrMUCg* esteja em processo de supressão, tal qual *TcMUCI*.

Conforme o ensaio *in vitro* com fibroblastos e macrófagos, esse desfavorecimento apresentado por *Choachí_TrMUCg3* não está diretamente relacionado à interação com os tipos celulares testados *in vitro*. Indicando que uma possível interação de *T. rangeli* ocorra com outras células do sistema imune, e que não as observadas no estudo, como por exemplo, as células NK. Essa hipótese, leva em consideração a resposta histopatológica de aumento do tamanho do baço (órgão que concentra a maior parte das células NK) e a descrição de hiperplasia de polpa branca. A IL-12, que é uma das principais citocinas envolvidas com estímulo de função das células NK, entretanto não foi detectada em nenhuma das análises. Contudo, esse fato poderá ser futuramente avaliado pelos níveis de mRNA. Outras importantes citocinas para ativação e recrutamento de células NK, são IL-15 e IL-18, que não foram avaliadas.

Com relação às mucinas de *T. cruzi* expressas por *T. rangeli*, não foram observados outros efeitos além do aumento da parasitemia. Sabe-se que diversas das funções atribuídas às mucinas são decorrentes da atividade biológica da âncora GPI associada à essas glicoproteínas (ALMEIDA; GAZZINELLI, 2001; CAMARGO *et al.*, 1997; COELHO *et al.*, 2002; ROPERT; GAZZINELLI, 2004). Neste trabalho, para a execução da expressão heteróloga, a porção que codifica a âncora GPI de *T. cruzi* foi desassociada do restante do gene, de forma que somente a porção peptídica seria

expressa por *T. rangeli*. Ainda assim, como se trata de espécies diferentes, é possível que as modificações pós-traducionais sejam processadas de forma diferente, podendo ocorrer a adição de diferentes glicanas, o que poderia explicar os resultados distintos daqueles obtidos para *T. cruzi*, além da estrutura da GPI. A maior parasitemia observada para a linhagem Choachí_*TcMUCII* em comparação à cepa Choachí_WT é uma importante alteração fenotípica, e que pode possuir grande significado biológico, cujos mecanismos carecem maior compreensão.

9.8 INFECÇÃO EM TRIATOMÍNEOS

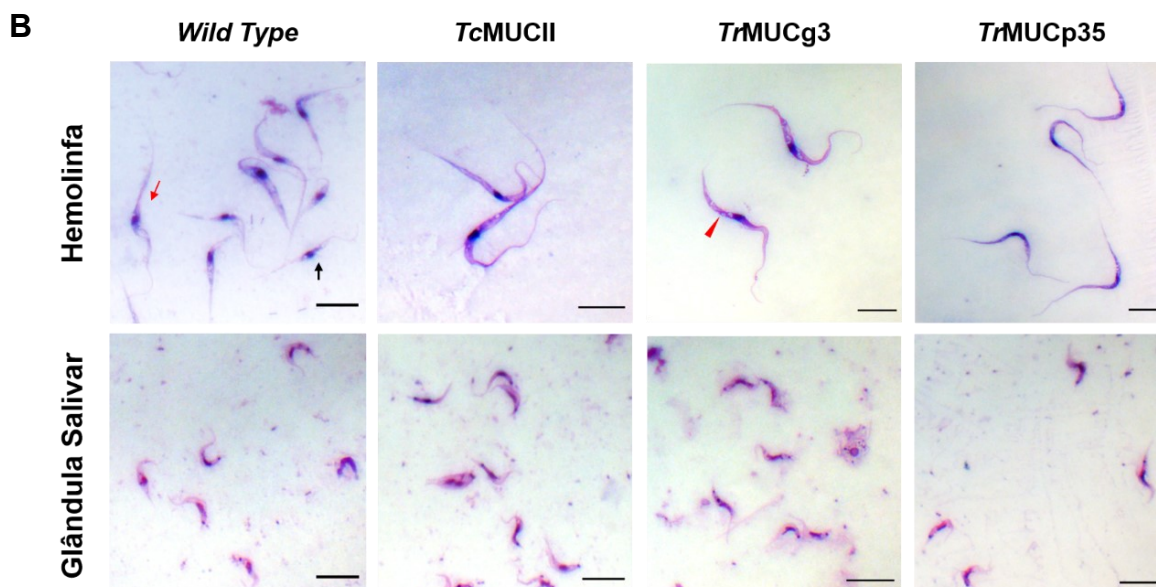
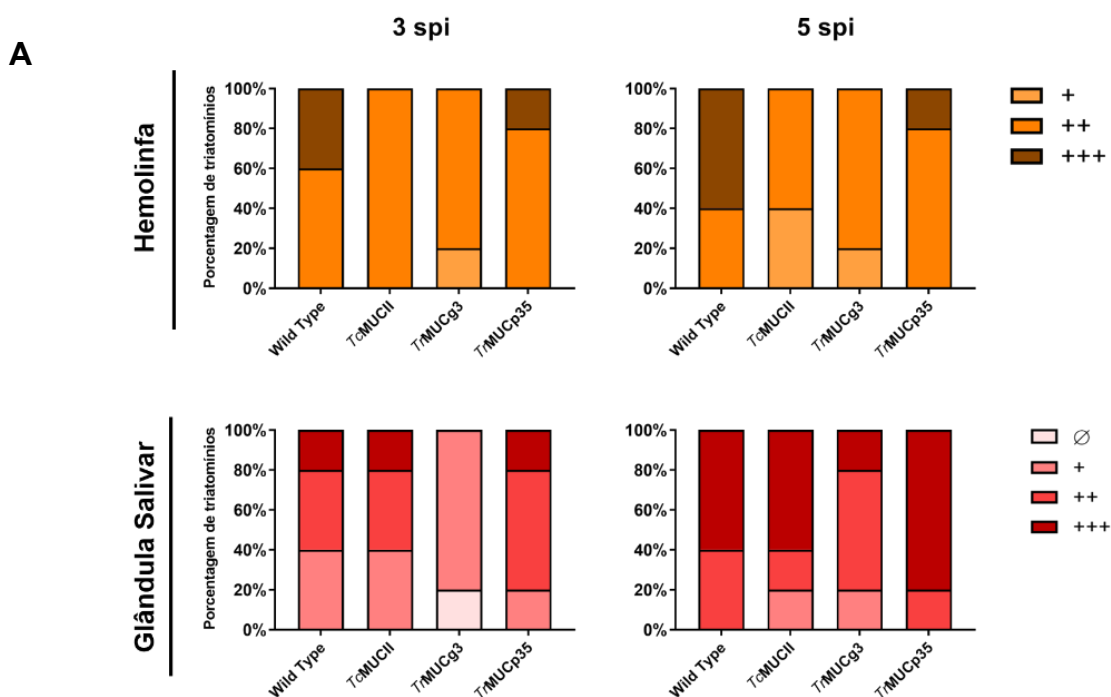
Foram realizados experimentos em *R. prolixus* para avaliar a infecção em triatomíneos pelas linhagens de *T. rangeli* expressando mucinas de *T. cruzi* ou superexpressando mucinas homólogas. Tendo em vista a descrição do envolvimento de mucinas de *T. cruzi* (*TcSMUG*) no vetor é associada principalmente ao processo de adesão ao epitélio intestinal, foi realizada infecção de *R. prolixus* por via oral. Sabe-se que infecções experimentais de *T. rangeli* por via oral ocorrem em uma baixa porcentagem de insetos, em função da necessidade de transposição do epitélio intestinal para a posterior invasão das glândulas salivares (AÑEZ; NIEVES; CAZORLA, 1987); além de incorrer em um longo tempo de acompanhamento dos insetos. Dessa forma, além da infecção por alimentação, foi utilizada a abordagem de infecção intracelômica para a avaliação da migração e transposição do epitélio da glândula salivar e a diferenciação em formas tripomastigotas metacíclicas.

9.8.1 Infecção por via intracelômica

Ninfas de 4^o e 5^o estágio (n=50) de *R. prolixus* foram infectadas por inoculação intracelômica com formas epimastigotas da cepa Choachí_WT, das linhagens Choachí_*TcMUCII*, Choachí_*TrMUCg3* e Choachí_*TrMUCp35*. Após três semanas da inoculação, foram iniciadas as avaliações quanto à morfologia e mobilidade de epimastigotas na hemolinfa e análise relativa da presença de parasitos no lúmen da glândula salivar (Figura 44).

Figura 44 – Avaliação de metaciclogênese *in vivo* de *Trypanosoma rangeli* expressando mucinas fusionadas à FlagGPI.

A) Avaliação da presença de epimastigotas na hemolinfa e glândula salivar em 3 e 5 semanas pós infecção (s.p.i.). Critério de classificação: ausência de parasitos na amostra (\emptyset), um ou mais parasitos presente na amostra (+), um ou mais parasitos esparsamente distribuídos por campo em diversos campos (++) , acúmulo de parasitos em diferentes regiões do campo em diversos campos (+++). Gráficos em tonalidade laranja referentes aos dados observados na hemolinfa, em tonalidade vermelha, referente à glândula salivar. Representação gráfica em percentual de indivíduos avaliados por grupo nas classificações descritas (n=5). Análise estatística: Teste qui-quadrado com intervalo de confiança de 95%. Todas as análises consideradas significativas ($p < 0,0001$). **B)** Coloração de Giemsa de epimastigotas presentes na hemolinfa e tripomastigotas presentes na glândula salivar em 5 s.p.i. Seta vermelha: epimastigota longo, seta preta: epimastigota curto. Triângulo vermelho: presença de corpos lipídicos. Barra de escala: 10 μ m.



Fonte: Autora.

No momento da avaliação dos triatomíneos infectados por via intracelômica (3 semanas após a infecção), em todos os grupos foram encontrados parasitos na glândula salivar. Dessa forma, não possível avaliar comparativamente a existência de diferenças na cinética da penetração na glândula salivar. Entretanto, algumas características apresentadas pelos parasitos merecem destaque, como: Os parasitos da linhagem Choachí_*TcMUCII* apresentaram reduzida mobilidade na hemolinfa em relação às demais linhagens e à cepa Choachí_WT nas duas avaliações realizadas. Os parasitos Choachí_*TcMUCII* demonstravam lento batimento flagelar ou apresentavam total imobilidade. No grupo infectado com a linhagem Choachí_*TrMUCg3*, foi identificada a presença em maior quantidade de epimastigotas no interior da glândula salivar e menor quantidade de parasitos. As avaliações qualitativas foram realizadas em conjunto com pesquisadora independente, sem prévio conhecimento dos resultados obtidos *in vivo* ou da função de cada mucina envolvida no estudo. Todos os dados qualitativos foram registrados em vídeo.

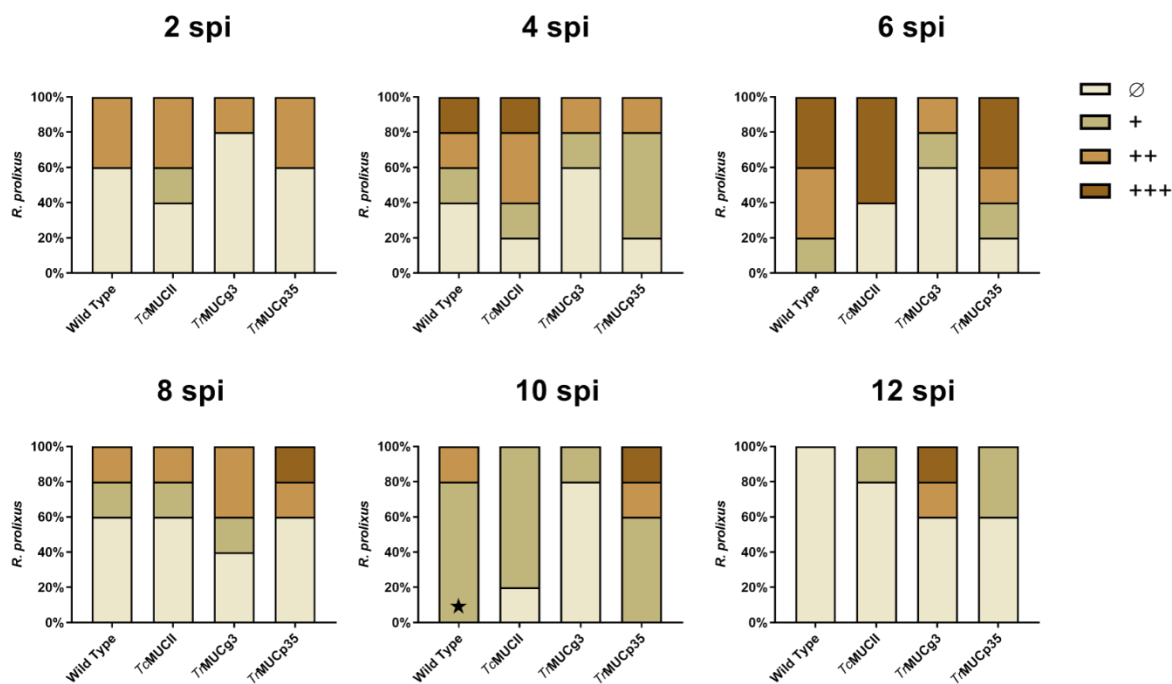
Constatada a presença de parasitos na glândula salivar, foi realizada a avaliação de transmissibilidade do parasito por alimentação em camundongos BALB/c (n= 2/grupo). Exceto para o grupo Choachí_*TrMUCg3*, no qual somente um animal apresentou parasitemia, a totalidade dos animais dos demais grupos apresentaram parasitemia patente, permitindo concluir que a expressão das mucinas fusionadas à FlagGPI não interfere na metaciclogênese *in vivo* e capacidade de transmissão vetorial ao hospedeiro mamífero.

9.8.2 Alimentação artificial

A infecção de triatomíneos via oral foi realizada conforme descrito no tópico 8.10.2, através do uso de alimentador artificial contendo $1,5 \times 10^8$ tripomastigotas. Em avaliações quinzenais foram observadas a quantidade, a motilidade e a morfologia dos parasitos nas fezes, hemolinfa e glândula salivares por um período total de três meses. Durante esse período, a visualização de epimastigotas na hemolinfa ocorreu em um inseto adulto com deformação de exoesqueleto, infectado com a cepa Choachí_WT na 10ª semana pós infecção. Na Figura 45, são mostrados os resultados da avaliação nas fezes.

Figura 45 – Avaliação de infectividade oral de *Trypanosoma rangeli* expressando as mucinas fusionadas à FlagGPI em triatomíneo.

Avaliação da presença de parasitos nas fezes de *R. prolixus* ao longo de 12 semanas pós infecção (s.p.i.). Critério de classificação: ausência de parasitos na amostra (⊖), um ou mais parasitos presente na amostra (+), um ou mais parasitos esparsamente distribuídos por campo em diversos campos (++), acúmulo de parasitos em diferentes regiões do campo em diversos campos (+++). Representação gráfica em percentual de indivíduos avaliados por grupo (n=5). Análise estatística: Teste qui-quadrado, intervalo de confiança de 95%. Todas as análises consideradas significativas ($p < 0,0001$). Estrela indica grupo e ponto de coleta da ocorrência de epimastigotas na hemolinfa de um triatomíneo.



Fonte: Autora.

Na primeira coleta poucos parasitos foram encontrados nas fezes, contudo a partir da 4 s.p.i. a quantidade de parasitos aumentou, sendo identificado através de coloração de Giemsa a presença de epimastigotas na amostra. O grupo infectado com a linhagem Choachí_*TrMUCg3* não foi avaliado quanto a forma do parasito devido a pouca quantidade de parasitos nas fezes 4 s.p.i. No decorrer da infecção, foi possível identificar epimastigotas em todos os grupos e a presença de alguns tripomastigotas e outras formas intermediárias de parasitos. Na última avaliação realizada (14 s.p.i.) não possível encontrar parasitos nas fezes em nenhum grupo (dados não demonstrados no gráfico).

Novamente o grupo Choachí_*TrMUCg3* apresenta diferença na quantidade de parasitos em relação aos demais. Dessa forma, tanto na infecção intracelômica, quanto por alimentação, o grupo de insetos infectados com a linhagem Choachí_*TrMUCg3* aparenta menor quantidade de parasitos em diversos pontos experimentais. Entretanto, essa linhagem é capaz de realizar todas as etapas do processo de desenvolvimento em triatomíneo, sendo transmissível ao hospedeiro

mamífero. Os efeitos patogênicos de *T. rangeli* no hospedeiro invertebrado não foram minuciosamente avaliados no presente estudo, mas aparentemente não foram identificadas alterações nos processos de ecdise, ovoposição e eclosão no decorrer dos experimentos.

Com base nesses resultados, não foi possível detectar nenhuma alteração fenotípica significativa nos padrões analisados durante a evolução da infecção em triatomíneos por *T. rangeli* expressando mucinas fusionadas à FlagGPI em relação à cepa parental.

9.9 RECONHECIMENTO DE ÁCIDO SIÁLICO POR *Trypanosoma rangeli*

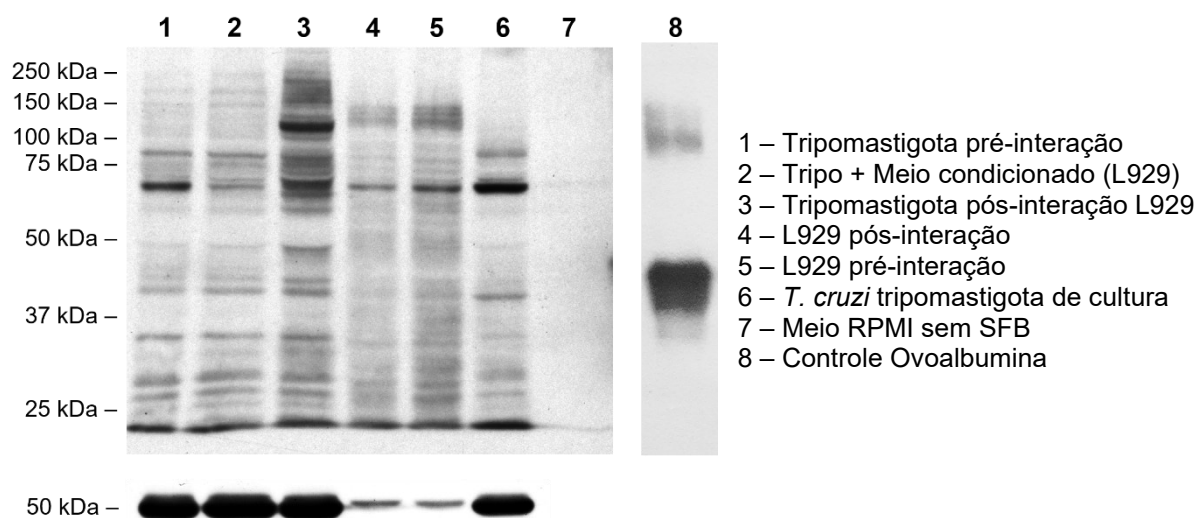
Ao longo desta tese, diversos experimentos foram realizados, e que possibilitaram o direcionamento a inferências biológicas com relação ao papel das mucinas de *T. rangeli*. Com base no conhecimento das funções das mucinas em *T. cruzi* e outras glicoproteínas correlatas, foi possível compreender mais sobre as mucinas em um parasito não patogênico à mamíferos. Contudo, não foi realizada a caracterização bioquímica das mucinas de *T. rangeli*. Dessa forma o questionamento da capacidade de acepção de Sia pelas mucinas do *T. rangeli* permanece em aberto. Considerando a importância dessa questão, foi realizado um ensaio preliminar de detecção com o anticorpo policlonal anti-ácido siálico (Wuhan USCN) em formas tripomastigotas da cepa Choachí_WT, antes e após a interação com a linhagem de fibroblastos L929.

Na Figura 46 é possível identificar o estabelecimento de padrões de banda em todas as amostras. Pela análise de WB, o padrão de bandas das formas tripomastigotas antes e após a interação direta com células L929 (linha 1 e 3) é diferente. Nota-se o reconhecimento de uma banda proeminente entre 100 a 150 kDa e o reforço em intensidade (escurecimento) de diversas outras bandas na amostra de tripomastigotas após a interação com as células L929, não sendo observado o mesmo perfil nas formas tripomastigotas que ficaram em contato apenas com o meio de cultura condicionado (linha 2). Ainda, é possível notar a tênue diminuição de intensidade de sinal de L929 incubada com os parasitos, em relação aos fibroblastos de cultura sem qualquer contato com o parasito (linhas 4 e 5). Como controles foram utilizados os meios de cultura RPMI sem SFB e a glicoproteína ovoalbumina (0,5 µg) que possui grande quantidade de Sia ligado à sua estrutura (UTRATNA *et al.*, 2017).

Como controle de quantidade de proteína nos géis, foi realizada a detecção de β -tubulina, a qual não apresentou variação de intensidade entre as amostras de *T. rangeli* ou células L929.

Figura 46 – *Trypanosoma rangeli* é capaz de incorporar ácido siálico *in vitro*.

WB com anticorpo anti-ácido siálico (PAS099Ge01) de 75 μ g de extrato proteico total de cada amostra, exceto linha 7 (\approx 2 ml de meio RPMI precipitado por acetona gelada) e linha 8 (controle de especificidade de reconhecimento anticorpo para Sia: ovoalbumina 0,5 μ g). Controle de quantidade de proteína, reconhecido por anticorpo anti- β tubulina na parte inferior de acordo com a respectiva amostra.



Fonte: Autora.

Com base nesse experimento preliminar, observa-se que de alguma forma *T. rangeli* é capaz de incorporar Sia em suas células após a interação com fibroblasto em cultura. Contudo, considerando que esta espécie não possui trans-sialidases ativas, e que tripanosomatídeos são incapazes de sintetizar esse monossacarídeo (LANTOS *et al.*, 2016), não foi possível formular uma hipótese para essa observação de aceção de Sia com base nesse experimento preliminar.

Dentre os potenciais candidatos a aceptores de Sia, em princípio, é descartada a possibilidade de que algum dos membros de *TrMUCg* ou *TrMUCp* o façam. Essa afirmação é baseada no baixo grau de glicosilação que essas proteínas apresentaram pela análise de massa molecular (Tabela 9). Considerando que houve aumento de massa molecular em *TcMUCI* e *TcMUCII*, o sistema de expressão utilizado não interferiu no processamento de glicosilação. Logo, não seria impeditivo para glicosilação de *TrMUC*. Entretanto, com base na descrição de *TcMUC*, a presença de glicosilações em grande quantidade e β gal terminal são condições básicas para função de aceção de Sia. Contudo, uma vez que se desconhece a

constituição das glicinas de *TrMUC*, é possível, porém pouco provável, que *TrMUC* possuam carboidratos muito curtos passíveis de aceção de Sia.

Na descrição do grupo *TrMUCp* (item 9.1.2), diversos membros do subgrupo G apresentam similaridade à trans-sialidase grupo III, que possuem atividade lectínica, reconhecendo o Sia do hospedeiro. Dessa forma, é possível que *T. rangeli* expresse um híbrido TS-Mucina, contudo essa hipótese carece de maiores estudos, bem como é necessário caracterizar as glicanas de *TrMUC* bioquimicamente.

10 RESUMO DE RESULTADOS CAPÍTULO II

- *T. rangeli* possui, 93 genes codificantes para mucinas putativas, as quais foram classificadas em dois grupos: *TrMUCg* e *TrMUCp*;
- As mucinas de *T. rangeli* compartilham características com as mucinas de *T. cruzi*, sendo *TcMUC I* correlacionado com *TrMUCg* e *TcMUC II* com *TrMUCp* com base na composição aminoacídica, tamanho da sequência aminoacídica e distribuição de resíduos O-glicosilados;
- *TrMUCg* que se constitui de um grupo de cinco membros e que possui apenas um peptídeo sinal válido, expressando mucinas de até 44 kDa;
- As mucinas de *T. rangeli* aparentam possuir poucas ou nenhuma modificação pós-traducional, visto que não há alteração de massa molecular;
- A expressão heteróloga de *TcMUCII* por *T. rangeli* induz aumento de parasitemia em camundongos BALB/c. Enquanto, a superexpressão de *TrMUC* diminui a infectividade, sem incorrer em alterações no tempo de permanência dos parasitos na corrente sanguínea;
- A infecção por *T. rangeli* induz esplenomegalia com hiperplasia leve a moderada da polpa branca, modulando negativamente a concentração de IFN γ no baço;
- A superexpressão de *TrMUCg3* por *T. rangeli* induz expressão de IL-10 no pulmão de camundongos BABL/c, sendo que a proteína *TrMUCg3* purificada é capaz de induzir a expressão específica de TNF *in vitro* por macrófagos não ativados;
- *T. rangeli* modula negativamente a expressão de IL-6 e TNF *in vitro*, mas não suprime a resposta pró-inflamatória dos macrófagos ativados por LPS;
- A interação de *T. rangeli* com macrófagos não induz resposta pró-inflamatória *in vitro*, mesmo quando o parasito está opsonizado por soro murino fresco (não inativado).
- A expressão das mucinas fusionadas à FlagGPI não modifica a interação do parasito com fibroblastos ou macrófagos *in vitro*;
- A superexpressão de *TrMUCg* confere desvantagem à *T. rangeli* na interação do parasito com o hospedeiro mamífero;

- A expressão das mucinas fusionadas à FlagGPI não interfere na capacidade de metaciclogênese *in vivo* ou transmissibilidade do parasito via vetor;
- Há indicativo que *T. rangeli* seja capaz de incorporar ácido siálico durante a interação com células de mamíferos.

11 CONCLUSÕES

Capítulo I

- O vetor pTRIXrang, primeiro plasmídeo integrativo específico para *T. rangeli*, promove expressão constitutiva e intensa do *dual-reporter* Luc::Neon possibilitando diversas aplicações para estudos nessa espécie;
- Os pulmões e baço são os órgãos de maior acúmulo de *T. rangeli* em mamíferos durante a fase aguda da infecção;

Capítulo II

- *T. rangeli* expressa proteínas similares à mucinas-like de *T. cruzi*. Contudo, as TrMUC aparentam possuir poucas ou nenhuma modificação pós-traducional o que interfere na capacidade de acepção de ácido siálico por essa proteína.
- As TrMUC influenciam a relação parasito-hospedeiro mamífero diminuindo a parasitemia e limitando a tentativa de modulação pelo parasito da resposta imune pró-inflamatória, com possível repressão da expressão proteica do grupo TrMUCg por *T. rangeli*.

12 PERSPECTIVAS

- Realizar a análise do estado replicativo de *T. rangeli* no hospedeiro mamífero, através da análise histológica por microscopia confocal dos órgãos bioluminescentes identificados na análise *ex vivo*, através da incorporação do reagente EdU pelos parasitos em replicação ativa;
- Caracterizar ocorrência da forma amastigota-like de *T. rangeli* na corrente sanguínea e medula óssea de camundongos infectados por Choachí Luc::Neon por citometria de fluxo e imunofluorescência para aferição da frequência e análise morfoquímica dessa forma do parasito.
- Análise dos mecanismos de resposta imune humoral e celular que desencadeiam o *clearance* de *T. rangeli*, utilizando as linhagens Luc::Neon para o melhor entendimento da resposta que leva a diminuição da parasitemia e possível encriptamento do parasito;
- Avaliação da presença de sinal de *Splicing Lider* dos genes de *TrMUC* e análise de sintenia em relação à *T. cruzi*.
- Análise do perfil de expressão de *TrMUC* endógenas e caracterização glicômica de *T. rangeli* com foco no perfil bioquímico dessas proteínas de superfície.

13 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi possível desenvolver um plasmídeo integrativo para *T. rangeli*, que possibilita a expressão forte e constitutiva de luciferase e mNeonGreen. A utilização do plasmídeo pTRIXrang ou das linhagens caracterizadas neste trabalho, possibilitam o estudo do ciclo de vida de *T. rangeli* sem introduzir viés metodológico na experimentação de mamíferos e triatomíneos. São inúmeras as possibilidades de uso dos parasitos *dual-reporter*. A melhora na acurácia das análises, o melhor aproveitamento do tempo – empregado em análises *time-consuming*, como contagem de parasitos em lâmina à fresco ou interações *in vitro* coradas com Giemsa –, agora podem ser facilmente substituídas por citometria de fluxo ou a mensuração da atividade de luciferase. Ainda, a visualização dos parasitos vivos, durante a infecção ativa pode trazer à luz diversos eventos que ainda não foram elucidados.

Devido a essa nova ferramenta, foi possível renovar o estudo das interações de *T. rangeli* e o hospedeiro mamífero, através da determinação da localização do parasito em tempo real no baço, pulmões e próstata de camundongos. Também, foi possível determinar que a diminuição da parasitemia após 10 dias da infecção, não se dá pela concentração do parasito em algum sítio anatômico, mas sim através de *clearance* do sistema imune, reduzindo a carga parasitária total a níveis abaixo da detecção por bioluminescência.

A quantidade ínfima de parasitos que sustentam a infecção, ainda é um desafio. Contudo, a análise da resposta do hospedeiro e do parasito durante a infecção, auxilia a montar o quebra cabeça que é a compreensão da biologia de *T. rangeli*.

Os efeitos da contribuição da aplicação de pTRIXrang no estudo da interação parasito-hospedeiro de *T. rangeli*, influenciaram na avaliação da infecção dessa espécie expressando mucinas fusionadas à FlagGPI. De forma que foi possível avaliar a resposta imune local dos sítios de maior concentração do parasito diante da infecção por tripomastigotas expressando diferentes mucinas de *T. rangeli* e *T. cruzi*. Assim, determinou-se que a superexpressão de TrMUC acarreta menor parasitemia. Além disso, foi possível observar que essa família de proteínas de superfície, influencia na modulação da resposta imune, revelando que *T. rangeli* é capaz de modular negativamente a expressão de citocinas no hospedeiro.

Diversas questões, e principalmente a descrição dos mecanismos envolvidos na relação *T. rangeli*-mamífero necessitam ser elucidados. De forma, que esta tese contribuiu para elencar algumas interações que ainda não foram exploradas como o papel das *TrMUC* na interação parasito-hospedeiro. Bem como, forneceu uma ferramenta que possibilita ampliar o rol metodológico dos estudos de *T. rangeli*

REFERÊNCIAS

ACOSTA-SERRANO, A.; ALMEIDA, I. C.; FREITAS-JUNIOR, L. H.; YOSHIDA, N.; SCHENKMAN, S. The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: structure and biological roles. **Mol Biochem Parasitol**, [S. l.], v. 114, n. 2, p. 143–150, 2001.

AFFRANCHINO, J. L.; IBAÑEZ, C. F.; LUQUETTI, A. O.; RASSI, A.; REYES, M. B.; MACINA, R. A.; ASLUND, L.; PETTERSSON, U.; FRASCH, A. C. Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease. **Molecular and biochemical parasitology**, Netherlands, v. 34, n. 3, p. 221–228, 1989. DOI: 10.1016/0166-6851(89)90050-9.

AGRELLOS, O. A.; JONES, C.; TODESCHINI, A. R.; PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO, L. A novel sialylated and galactofuranose-containing O-linked glycan, Neu5Aca2→3Galpβ1→6(Galfβ1→4)GlcNAc, is expressed on the sialoglycoprotein of *Trypanosoma cruzi* Dm28c. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [S. l.], v. 126, n. 1, p. 93–96, 2003. DOI: 10.1016/S0166-6851(02)00245-1.

AGÜERO, F.; VERDÚN, R. E.; FRASCH, A. C. C.; SÁNCHEZ, D. O. A random sequencing approach for the analysis of the *Trypanosoma cruzi* genome: General structure, large gene and repetitive DNA families, and gene discovery. **Genome Research**, [S. l.], v. 10, n. 12, p. 1996–2005, 2000. DOI: 10.1101/gr.GR-1463R.

AGÜERO, F.; CAMPO, V.; CREMONA, L.; JÄGER, A.; DI NOIA, J. M.; OVERATH, P.; SÁNCHEZ, D. O.; FRASCH, Alberto Carlos. Gene discovery in the freshwater fish parasite *Trypanosoma carassii*: Identification of trans-sialidase-like and mucin-like genes. **Infection and Immunity**, [S. l.], v. 70, n. 12, p. 7140–7144, 2002. DOI: 10.1128/IAI.70.12.7140-7144.2002.

ALLEN, C. L.; KELLY, J. M. *Trypanosoma cruzi*: mucin pseudogenes organized in a tandem array. **Exp Parasitol**, [S. l.], v. 97, n. 3, p. 173–177, 2001. DOI: 10.1006/expr.2001.4600.

ALMAGRO ARMENTEROS, J. J.; TSIRIGOS, K.D.; SØNDERBY, C. K.; PETERSEN, T. N.; WINTHER, O.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G.; NIELSEN, H. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. **Nature biotechnology**, United States, v. 37, n. 4, p. 420–423, 2019. DOI: 10.1038/s41587-019-0036-z.

ALMEIDA, I. C.; GAZZINELLI, R. T. Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from *Trypanosoma cruzi*: structural and functional analyses. **J Leukoc Biol**, [S. l.], v. 70, n. 4, p. 467–477, 2001. DOI: 10.1189/jlb.70.4.467. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11590183>.

ALMEIDA, I. C.; CAMARGO, M. M.; PROCÓPIO, D. O.; SILVA, L. S.; MEHLERT, A.; TRAVASSOS, Luiz R.; GAZZINELLI, Ricardo T.; FERGUSON, M. A. J. Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents. **EMBO Journal**, [S. l.], v. 19, n. 7, p. 1476–1485, 2000. DOI: 10.1093/emboj/19.7.1476.

ALMEIDA, I. C.; FERGUSON, M. A. J.; SCHENKMAN, S.; TRAVASSOS, L. R. Lytic anti-α-galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas' disease recognize novel O-linked oligosaccharides. **Biochemical Journal**, [S. l.], v. 304, p. 793–802, 1994.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local

alignment search tool. **J Mol Biol**, [S. I.], v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990. DOI: 10.1016/s0022-2836(05)80360-2.

ALVES, M. J.; COLLI, W. Glycoproteins from trypanosoma cruzi: partial purification by gel chromatography. **FEBS letters**, England, v. 52, n. 2, p. 188–190, 1975. DOI: 10.1016/0014-5793(75)80803-9.

ALVES, M. J. M.; COLLI, W. Role of the gp85/trans-sialidase superfamily of glycoproteins in the interaction of Trypanosoma cruzi with host structures. **Sub-cellular biochemistry**, United States, v. 47, p. 58–69, 2008. DOI: 10.1007/978-0-387-78267-6_4.

AMAYA, M.F.; BUSCHIAZZO, A.; NGUYEN, T.; ALZARI, P. M. The high resolution structures of free and inhibitor-bound Trypanosoma rangeli sialidase and its comparison with T. cruzi trans-sialidase. **Journal of Molecular Biology**, [S. I.], v. 325, n. 4, p. 773–784, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)01306-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)01306-2). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283602013062>.

AMTHAUER, R.; KODUKULA, K.; GERBER, L.; UDENFRIEND, S. Evidence that the putative COOH-terminal signal transamidase involved in glycosylphosphatidylinositol protein synthesis is present in the endoplasmic reticulum. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. I.], v. 90, n. 9, p. 3973 LP – 3977, 1993. DOI: 10.1073/pnas.90.9.3973. Disponível em: <http://www.pnas.org/content/90/9/3973.abstract>.

AÑEZ, N.; NIEVES, E.; CAZORLA, D. Studies on Trypanosoma rangeli Tejera, 1920. IX. Course of infection in different stages of Rhodnius prolixus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 1987. DOI: 10.1590/S0074-02761987000100001.

ARAÚJO-JORGE, T. C. de; CASTRO, S. L. de. **Doença de chagas: manual para experimentação animal**. [s.l: s.n.]. DOI: 10.7476/9788575413937.

ARCHER, S. K. Standard culture medium allows clonal dilution of Trypanosoma brucei procyclic cells after auto-conditioning. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [S. I.], v. 164, n. 1, p. 100–103, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2008.11.003>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166685108002600>.

AREGAWI, W. G.; AGGA, G. E.; ABDI, R. D.; BÜSCHER, P. Systematic review and meta-analysis on the global distribution, host range, and prevalence of Trypanosoma evansi. **Parasites & vectors**, [S. I.], v. 12, n. 1, p. 67, 2019. DOI: 10.1186/s13071-019-3311-4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30704516>.

ATWOOD 3RD, J. A.; WEATHERLY, D. B.; MINNING, T. A.; BUNDY, B.; CAVOLA, C.; OPPERDOES, F. R.; ORLANDO, R.; TARLETON, R. L. The Trypanosoma cruzi proteome. **Science**, [S. I.], v. 309, n. 5733, p. 473–476, 2005. DOI: 10.1126/science.1110289.

AZAMBUJA, P.; GARCIA, E. S.; WANIEK, P. J.; VIEIRA, C. S.; FIGUEIREDO, M. B.; GONZALEZ, M. S.; MELLO, C. B.; CASTRO, D. P.; RATCLIFFE, N. A. Rhodnius prolixus: from physiology by Wigglesworth to recent studies of immune system modulation by Trypanosoma cruzi and Trypanosoma rangeli. **J Insect Physiol**, [S. I.], v. 97, n. November, p. 45–65, 2017. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2016.11.006.

BAIDA, R. C. P.; SANTOS, M. R. M.; CARMO, M. S.; YOSHIDA, N.; FERREIRA, D.;

FERREIRA, A. T.; EL SAYED, N. M.; ANDERSSON, B.; DA SILVEIRA, J. F. Molecular characterization of serine-, alanine-, and proline-rich proteins of *Trypanosoma cruzi* and their possible role in host cell infection. **Infection and immunity**, [S. l.], v. 74, n. 3, p. 1537–1546, 2006. DOI: 10.1128/IAI.74.3.1537-1546.2006.

BALOUZ, V.; DE CÁMARA, M. los M.; CÁNEPA, G. E.; CARMONA, S. J.; VOLCOVICH, R.; GONZALEZ, N.; ALTICHEH, J.; AGÜERO, F.; BUSCAGLIA, C. A. Mapping antigenic motifs in the trypomastigote small surface antigen from *Trypanosoma cruzi*. **Clinical and Vaccine Immunology**, [S. l.], v. 22, n. 3, p. 304–312, 2015. DOI: 10.1128/CVI.00684-14.

BARRETO-SANTANA, D.; SANTOS-SCHUENKER, L.; FONSECA, A. R. da; GURGEL-GONÇALVES, Rodrigo; CUBA-CUBA, Cesar Augusto. Susceptibility of different *Rhodnius* species (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) to a Brazilian strain of *Trypanosoma rangeli* (SC58/KP1-). **Biomédica**, [S. l.], v. 35, p. 81–89, 2015. Disponível em: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572015000100011&nrm=iso.

BARTHOLOMEU, D. C.; CERQUEIRA, G. C.; LEO, A. C.; DAROCHA, W. D.; PAIS, F. S.; MACEDO, C.; DJIKENG, A.; TEIXEIRA, S. M.; EL-SAYED, N. M. Genomic organization and expression profile of the mucin-associated surface protein (masp) family of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. **Nucleic Acids Res**, [S. l.], v. 37, n. 10, p. 3407–3417, 2009. DOI: 10.1093/nar/gkp172.

BARTHOLOMEU, D. C.; DE PAIVA, R. M.; MENDES, T. A.; DAROCHA, W. D.; TEIXEIRA, S. M. Unveiling the intracellular survival gene kit of trypanosomatid parasites. **PLoS Pathog**, [S. l.], v. 10, n. 12, p. e1004399, 2014. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004399.

BASSO, B.; MARINI, V. Experimental Chagas disease in Balb/c mice previously vaccinated with *T. rangeli*. II. The innate immune response shows immunological memory: reality or fiction? **Immunobiology**, [S. l.], v. 220, n. 3, p. 428–436, 2015. DOI: 10.1016/j.imbio.2014.10.003.

BASSO, B.; MORETTI, E.; FRETES, R. Vaccination with *Trypanosoma rangeli* induces resistance of guinea pigs to virulent *Trypanosoma cruzi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, [S. l.], v. 157, n. 1–2, p. 119–123, 2014. DOI: 10.1016/j.vetimm.2013.10.011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.10.011>.

BATISTA M.; MARCHINI F. K.; CELEDON P. A.; FRAGOSO S. P.; PROBST C. M.; PRETI H.; OZAKI L. S.; BUCK G. A.; GOLDENBERG S.; KRIEGER M. A. A high-throughput cloning system for reverse genetics in *Trypanosoma cruzi*. **BMC Microbiology**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 259, 2010. DOI: 10.1186/1471-2180-10-259. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/259>.

BAYER-SANTOS E.; AGUILAR-BONAVIDES C.; RODRIGUES S. P.; CORDERO E. M.; MARQUES A. F.; VARELA-RAMIREZ A.; CHOI H.; YOSHIDA N.; da SILVEIRA J. F.; ALMEIDA I. C. Proteomic analysis of *trypanosoma cruzi* secretome: Characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins. **Journal of Proteome Research**, [S. l.], v. 12, n. 2, p. 883–897, 2013. DOI: 10.1021/pr300947g.

BELEW A. T.; JUNQUEIRA C.; RODRIGUES-LUIZ G. F.; VALENTE B. M.; OLIVEIRA A. E. R.; POLIDORO R. B.; ZUCCHERATO L. W.; BARTHOLOMEU D. C.; SCHENKMAN S.; GAZZINELLI R. T.; BURLEIGH B. A.; EL-SAYED N. M.; TEIXEIRA S. M. R. Comparative transcriptome profiling of virulent and non-virulent *Trypanosoma cruzi* underlines the role of surface proteins during infection.

PLoS Pathog. [S. l.], v. 13, n. 12, p. 1–23, 2017. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006767.

BELTRAME-BOTELHO, I. T.; STOCO, P. H.; STEINDEL, M.; ANDERSSON, B.; PELOSO, E. F.; GADELHA, F. R.; GRISARD, E. C. Overexpression of *Trypanosoma rangeli* trypanothione reductase increases parasite survival under oxidative stress. **Parasitology Open**, [S. l.], v. 2, n. 2016, 2016. a. DOI: 10.1017/pao.2016.14.

BELTRAME-BOTELHO, I. T.; TALAVERA-LOPEZ, C.; ANDERSSON, B.; GRISARD, E. C.; STOCO, P. H. A Comparative In Silico Study of the Antioxidant Defense Gene Repertoire of Distinct Lifestyle Trypanosomatid Species. **Evol Bioinform Online**, [S. l.], v. 12, p. 263–275, 2016. b. DOI: 10.4137/ebo.s40648.

BENEKE, T.; MADDEN, R.; MAKIN, L.; VALLI, J.; SUNTER, J.; GLUENZ, E. A CRISPR Cas9 high-throughput genome editing toolkit for kinetoplastids. **Royal Society Open Science**, [S. l.], v. 4, n. 5, p. 1–16, 2017. DOI: 10.1098/rsos.170095.

BERMEJO D. A.; AMEZCUA VESELY M. C.; KHAN M.; ACOSTA RODRÍGUEZ E. V.; MONTES C. L.; MERINO M. C.; TOELLNER K. M.; MOHR E.; TAYLOR D.; CUNNINGHAM A. F.; GRUPPI A. *Trypanosoma cruzi* infection induces a massive extrafollicular and follicular splenic B-cell response which is a high source of non-parasite-specific antibodies. **Immunology**, [S. l.], v. 132, n. 1, p. 123–133, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2010.03347.x>.

BERN, C. Chagas' Disease. **The New England journal of medicine**, United States, v. 373, n. 5, p. 456–466, 2015. DOI: 10.1056/NEJMra1410150.

BERRIMAN, M et al. The Genome of the African Trypanosome *Trypanosoma brucei* **Science**, [S. l.], v. 309, n. 5733, p. 416, 2005. Disponível em: <http://science.sciencemag.org/content/309/5733/416.abstract>.

BEUCHER, M.; NORRIS, K. A. Sequence Diversity of the Trypanosoma cruzi Complement Regulatory Protein Family. **Infection and Immunity**, [S. l.], v. 76, n. 2, p. 750 LP – 758, 2008. DOI: 10.1128/IAI.01104-07. Disponível em: <http://iai.asm.org/content/76/2/750.abstract>.

BEVERLEY, S. M. Protozoomics: trypanosomatid parasite genetics comes of age. **Nature Reviews Genetics**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 11–19, 2003. DOI: 10.1038/nrg980. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrg980>.

BIRHANU H.; FIKRU R.; SAID M.; KIDANE W.; GEBREHIWOT T.; HAGOS A.; ALEMU T.; DAWIT T.; BERKVENS D.; GODDEERIS B. M.; BÜSCHER P. Epidemiology of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma vivax* in domestic animals from selected districts of Tigray and Afar regions, Northern Ethiopia. **Parasites & Vectors**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 212, 2015. DOI: 10.1186/s13071-015-0818-1. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0818-1>.

BOULANGER, N. B. T. Skin and Arthropod Vectors (ORG.). Chapter 6 - Insect-Borne Pathogens and Skin Interface: Flagellate Parasites and Skin Interface. In: [s.l.] : Academic Press, 2018. p. 193–238. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811436-0.00006-X>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012811436000006X>.

BOUVIER, L. A.; CÁMARA, M. de los M.; CANEPA, G. E.; MIRANDA, M. R.; PEREIRA, C. A. Plasmid Vectors and Molecular Building Blocks for the Development of Genetic Manipulation Tools for

Trypanosoma cruzi. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 8, n. 10, p. 1–11, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0080217.

BRANCHINI B. R.; SOUTHWORTH T. L.; FONTAINE D. M.; KOHRT D.; WELCOME F.S.; FLORENTINE C. M.; HENRICKS E. R.; DEBARTOLO D. B.; MICHELINI E.; CEVENINI L.; RODA A.; GROSSEL M. J. Red-emitting chimeric firefly luciferase for in vivo imaging in low ATP cellular environments. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 534, p. 36–39, 2017. DOI: 10.1016/j.ab.2017.07.001.

BUEREN-CALABUIG, J. A.; PIERDOMINICI-SOTTILE, G.; ROITBERG, A. E. Unraveling the differences of the hydrolytic activity of Trypanosoma cruzi trans-sialidase and Trypanosoma rangeli sialidase: a quantum mechanics-molecular mechanics modeling study. **Journal of Physical Chemistry B**, [S. l.], v. 118, n. 22, p. 5807–5816, 2014. DOI: 10.1021/jp412294r.

BÜLOW, R.; OVERATH, P. Purification and characterization of the membrane-form variant surface glycoprotein hydrolase of Trypanosoma brucei. **The Journal of biological chemistry**, United States, v. 261, n. 25, p. 11918–11923, 1986.

BURNS, J. M.; SHREFFLER, W. G.; ROSMAN, D. E.; SLEATH, P. R.; MARCH, C. J.; REED, S. G. Identification and synthesis of a major conserved antigenic epitope of Trypanosoma cruzi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 89, n. 4, p. 1239–1243, 1992. DOI: 10.1073/pnas.89.4.1239. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/89/4/1239>.

BUSCAGLIA, C. A.; ALFONSO, J.; CAMPETELLA, O.; FRASCH, A. C. Tandem amino acid repeats from Trypanosoma cruzi shed antigens increase the half-life of proteins in blood. **Blood**, United States, v. 93, n. 6, p. 2025–2032, 1999.

BUSCAGLIA, C. A.; CAMPO, V. A.; DI NOIA, J. M.; TORRECILHAS, A. C.; DE MARCHI, C. R.; FERGUSON, M. A.; FRASCH, A. C.; ALMEIDA, I. C. The surface coat of the mammal-dwelling infective trypomastigote stage of Trypanosoma cruzi is formed by highly diverse immunogenic mucins. **J Biol Chem**, [S. l.], v. 279, n. 16, p. 15860–15869, 2004. DOI: 10.1074/jbc.M314051200.

BUSCAGLIA, C. A.; CAMPO, V. A.; FRASCH, A. C. C.; DI NOIA, J. M. Trypanosoma cruzi surface mucins: host-dependent coat diversity. **Nat Rev Microbiol**, [S. l.], v. 4, n. 3, p. 229–236, 2006. DOI: 10.1038/nrmicro1351.

BUSCAGLIA, C. A.; KISSINGER, J. C.; AGÜERO, F. Neglected Tropical Diseases in the Post-Genomic Era. **Trends in Genetics**, [S. l.], v. 31, n. 10, p. 539–555, 2015. DOI: 10.1016/j.tig.2015.06.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2015.06.002>.

BUSCHIAZZO, A.; AMAYA, M. F.; CREMONA, M. L.; FRASCH, A. C.; ALZARI, P. M. The crystal structure and mode of action of trans-sialidase, a key enzyme in Trypanosoma cruzi pathogenesis. **Molecular Cell**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 757–768, 2002.

BUSCHIAZZO, A.; CAMPETELLA, O.; FRASCH, A. C. Trypanosoma rangeli sialidase: cloning, expression and similarity to T. cruzi trans-sialidase. **Glycobiology**, [S. l.], v. 7, n. 8, p. 1167–1173, 1997.

CAMARGO, M. M.; ANDRADE, A. C.; ALMEIDA, I. C.; TRAVASSOS, L. R.; GAZZINELLI, R. T. Glycoconjugates isolated from Trypanosoma cruzi but not from Leishmania species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN-gamma-primed macrophages. **J Immunol**, [S. l.], v. 159, n. 12, p. 6131–6139, 1997.

CAMPETELLA, O.; SÁNCHEZ, D.; CAZZULO, J. J.; FRASCH, A. C. C. A superfamily of

trypanosoma cruzi surface antigens. **Parasitology Today**, [S. l.], v. 8, n. 11, p. 378–381, 1992. DOI: [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(92\)90175-2](https://doi.org/10.1016/0169-4758(92)90175-2). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0169475892901752>.

CAMPO, V. A.; BUSCAGLIA, C. A.; DI NOIA, J. M.; FRASCH, A. C. Immunocharacterization of the mucin-type proteins from the intracellular stage of Trypanosoma cruzi. **Microbes Infect**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 401–409, 2006. DOI: 10.1016/j.micinf.2005.07.008.

CAMPO, V.; DI NOIA, J. M.; BUSCAGLIA, C. A.; AGUERO, F.; SANCHEZ, D. O.; FRASCH, A. C. Differential accumulation of mutations localized in particular domains of the mucin genes expressed in the vertebrate host stage of Trypanosoma cruzi. **Mol Biochem Parasitol**, [S. l.], v. 133, n. 1, p. 81–91, 2004.

CÁNEPA G. E.; MESÍAS A. C.; YU H.; CHEN X.; BUSCAGLIA C. A. Structural features affecting trafficking, processing, and secretion of Trypanosoma cruzi mucins. **J Biol Chem**, [S. l.], v. 287, n. 31, p. 26365–26376, 2012. DOI: 10.1074/jbc.M112.354696.

CARLEVARO, G.; LANTOS, A. B.; CÁNEPA, G. E.; de los MILAGROS C., M.; SOMOZA, M.; BUSCAGLIA, C. A.; CAMPETELLA, O.; MUCCI, J. Metabolic Labeling of Surface Neosialylglyconjugates Catalyzed by Trypanosoma cruzi trans-Sialidase. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, [S. l.], v. 1955, p. 135–146, 2019. DOI: 10.1007/978-1-4939-9148-8_10.

CARNES J.; ANUPAMA A.; BALMER O.; JACKSON A.; LEWIS M.; BROWN R.; CESTARI I.; DESQUESNES M.; GENDRIN C.; HERTZ-FOWLER C.; IMAMURA H.; IVENS A.; KOŘENÝ L.; LAI DH.; MACLEOD A.; MCDERMOTT SM.; MERRITT C.; MONNERAT S.; MOON W.; MYLER P.; PHAN I.; RAMASAMY G.; SIVAM D.; LUN ZR.; LUKEŠ J.; STUART K.; SCHNAUFER A. Genome and Phylogenetic Analyses of Trypanosoma evansi Reveal Extensive Similarity to T. brucei and Multiple Independent Origins for Dyskinetoplasty. **PLoS Negl Trop Dis**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. e3404, 2015. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003404. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003404>.

CARRINGTON, M.; CARNALL, N.; CROW, M. S.; GAUD, A.; REDPATH, M. B.; WASUNNA, C. L.; WEBB, H. The properties and function of the glycosylphosphatidylinositol-phospholipase C in Trypanosoma brucei. **Molecular and biochemical parasitology**, Netherlands, v. 91, n. 1, p. 153–164, 1998. DOI: 10.1016/s0166-6851(97)00190-4.

CASTRESANA, J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. **Mol Biol Evol**, [S. l.], v. 17, n. 4, p. 540–552, 2000. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026334.

CAVALCANTI, D. P.; DE SOUZA, W. The Kinetoplast of Trypanosomatids: From Early Studies of Electron Microscopy to Recent Advances in Atomic Force Microscopy. **Scanning**, [S. l.], v. 2018, p. 9603051, 2018. DOI: 10.1155/2018/9603051.

CHANG, Yung-Chi; NIZET, Victor. Siglecs at the Host-Pathogen Interface. **Advances in experimental medicine and biology**, [S. l.], v. 1204, p. 197–214, 2020. DOI: 10.1007/978-981-15-1580-4_8.

CHOI, J.; EL-SAYED, N. M. Functional genomics of trypanosomatids. **Parasite Immunol**, [S. l.], v. 34, n. 2–3, p. 72–79, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-3024.2011.01347.x.

COELHO P. S.; KLEIN A.; TALVANI A.; COUTINHO S. F.; TAKEUCHI O.; AKIRA S.; SILVA

J. S.; CANIZZARO H.; GAZZINELLI RT.; TEIXEIRA M. M. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes induce in vivo leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production by IFN-gamma-primed-macrophages. **J Leukoc Biol**, [S. l.], v. 71, n. 5, p. 837–844, 2002. DOI: 10.1189/jlb.71.5.837. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11994509>.

COHEN, S. N.; CHANG, A. C.; BOYER, H. W.; HELLING, R. B. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 70, n. 11, p. 3240–3244, 1973. DOI: 10.1073/pnas.70.11.3240. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4594039>.

COHEN, S. N. DNA cloning: A personal view after 40 years. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 110, n. 39, p. 15521–15529, 2013. DOI: 10.1073/pnas.1313397110.

CORDERO, E. M.; NAKAYASU, E. S.; GENTIL, L. G.; YOSHIDA, N.; ALMEIDA, I. C.; da SILVEIRA, J. F. Proteomic analysis of detergent-solubilized membrane proteins from insect-developmental forms of *Trypanosoma cruzi*. **J Proteome Res**, [S. l.], v. 8, n. 7, p. 3642–3652, 2009. DOI: 10.1021/pr800887u.

CORREA, P. R.; CORDERO, E. M.; GENTIL, L. G.; BAYER-SANTOS, E.; DA SILVEIRA, J. F. Genetic structure and expression of the surface glycoprotein GP82, the main adhesin of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes. **ScientificWorldJournal**, [S. l.], v. 2013, p. 156734, 2013. DOI: 10.1155/2013/156734.

COSTA F. C.; FRANCISCO A. F.; JAYAWARDHANA S.; CALDERANO S. G.; LEWIS M. D.; OLMO F.; BENEKE T.; GLUENZ E.; SUNTER J.; DEAN S.; KELLY J. M.; TAYLOR M. C. Expanding the toolbox for *Trypanosoma cruzi*: A parasite line incorporating a bioluminescence-fluorescence dual reporter and streamlined CRISPR/Cas9 functionality for rapid in vivo localisation and phenotyping. **PLoS Negl Trop Dis**, [S. l.], v. 12, n. 4, p. e0006388, 2018. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006388.

CREMONA, M. L.; CAMPETELLA, O.; SÁNCHEZ, D. O.; FRASCH, A. C. Enzymically inactive members of the trans-sialidase family from *Trypanosoma cruzi* display beta-galactose binding activity. **Glycobiology**, England, v. 9, n. 6, p. 581–587, 1999. DOI: 10.1093/glycob/9.6.581.

CREMONA, M. L.; SÁNCHEZ, D. O.; FRASCH, A. C.; CAMPETELLA, O. A single tyrosine differentiates active and inactive *Trypanosoma cruzi* trans-sialidases. **Gene**, Netherlands, v. 160, n. 1, p. 123–128, 1995. DOI: 10.1016/0378-1119(95)00175-6.

CUBA CUBA, C. A. Revisión de los aspectos biológicos y diagnósticos del *Trypanosoma* (*Herpetosoma*) rangeli. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S. l.], v. 31, p. 207–220, 1998. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86821998000200007&nrm=iso.

DA FONSECA, L. M.; DA COSTA, K. M.; CHAVES, V. de S.; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; MORROT, A.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; PREVIATO, J. O.; FREIRE-DE-LIMA, L. Theft and reception of host cell's sialic acid: Dynamics of *trypanosoma cruzi* trans-sialidases and mucin-like molecules on chagas' disease immunomodulation. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 10, n. February, p. 1–10, 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00164.

DA SILVA, F. M.; NOYES, H.; CAMPANER, M.; JUNQUEIRA, A. C.; COURA, J. R.; ANEZ, N.; SHAW, J. J.; STEVENS, J. R.; TEIXEIRA, M. M. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. **Parasitology**, [S. l.], v. 129, n. Pt 5, p. 549–561, 2004.

DAROCHA, W. D.; SILVA, R. A.; BARTHOLOMEU, D. C.; PIRES, S. F.; FREITAS, J. M.; MACEDO, A. M.; VAZQUEZ, M. P.; LEVIN, M. J.; TEIXEIRA, S. M. Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. **Parasitol Res**, [S. l.], v. 92, n. 2, p. 113–120, 2004. DOI: 10.1007/s00436-003-1004-5.

DAVIES, P. C. W.; RIEPER, E.; TUSZYNSKI, J. A. Self-organization and entropy reduction in a living cell. **Bio Systems**, [S. l.], v. 111, n. 1, p. 1–10, 2013. DOI: 10.1016/j.biosystems.2012.10.005.

DE ARRUDA, M. V; COLLI, W.; ZINGALES, B. Terminal beta-D-galactofuranosyl epitopes recognized by antibodies that inhibit *Trypanosoma cruzi* internalization into mammalian cells. **European journal of biochemistry**, England, v. 182, n. 2, p. 413–421, 1989. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1989.tb14847.x.

DE LEDERKREMER, R. M.; AGUSTI, R. **Chapter 7 Glycobiology of *Trypanosoma cruzi***. [s.l: s.n.]. v. 62 DOI: 10.1016/S0065-2318(09)00007-9.

DE MORAES, M. H.; GUARNERI, A. A.; GIRARDI, F. P.; RODRIGUES, J. B.; EGER, I.; TYLER, K. M.; STEINDEL, M.; GRISARD, E. C. Different serological cross-reactivity of *Trypanosoma rangeli* forms in *Trypanosoma cruzi*-infected patients sera. **Parasites and Vectors**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 1–10, 2008. DOI: 10.1186/1756-3305-1-20.

DE NOYA, B. A.; GONZÁLEZ, O. N.; GONZALEZ, O. N. An ecological overview on the factors that drives to *Trypanosoma cruzi* oral transmission. **Acta Trop**, [S. l.], v. 151, n. 1, p. 94–102, 2015. DOI: 10.1016/j.actatropica.2015.06.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.06.004>.

DE OLIVEIRA, M. A.; DE SOUZA, W. An electron microscopic study of penetration by *Trypanosoma rangeli* into midgut cells of *Rhodnius prolixus*. **J Invertebr Pathol**, [S. l.], v. 77, n. 1, p. 22–26, 2001. DOI: 10.1006/jipa.2000.4988.

DE SCORZA, C.; URDANETA-MORALES, S.; TEJERO, F. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920: preliminary report on histopathology in experimentally infected mice. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [S. l.], v. 28, n. 5, p. 371–378, 1986. DOI: 10.1590/s0036-46651986000500014.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M. U.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host cell interaction. **International Journal of Cell Biology**, [S. l.], v. 2010, 2010. DOI: 10.1155/2010/295394.

DI NOIA, J. M.; D'ORSO, I.; ASLUND, L.; SANCHEZ, D. O.; FRASCH, A. C. The *Trypanosoma cruzi* mucin family is transcribed from hundreds of genes having hypervariable regions. **J Biol Chem**, [S. l.], v. 273, n. 18, p. 10843–10850, 1998.

DI NOIA J. M.; POLLEVICK G. D.; XAVIER M. T.; PREVIATO J. O.; MENDOÇA-PREVIATO L.; SÁNCHEZ D. O.; FRASCH A. C. High diversity in mucin genes and mucin molecules in *Trypanosoma*

cruzi. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 271, n. 50, p. 32078–32083, 1996. DOI: 10.1074/jbc.271.50.32078.

DI NOIA, J. M.; BUSCAGLIA, C. A.; DE MARCHI, C. R.; ALMEIDA, I. C.; FRASCH, A. C. A Trypanosoma cruzi small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. **The Journal of experimental medicine**, [S. l.], v. 195, n. 4, p. 401–413, 2002. DOI: 10.1084/jem.20011433.

DORTA, M. L.; FERREIRA, A. T.; OSHIRO, M. E.; YOSHIDA, N. Ca²⁺ signal induced by Trypanosoma cruzi metacyclic trypomastigote surface molecules implicated in mammalian cell invasion. **Mol Biochem Parasitol**, [S. l.], v. 73, n. 1–2, p. 285–289, 1995.

DRENNAN, M. B.; STIJLEMANS, B.; VAN DEN ABEELE, J.; QUESNIAUX, V. J.; BARKHUIZEN, M.; BROMBACHER, F.; DE BAETSELIER, P.; RYFFEL, B.; MAGEZ, S. The Induction of a Type 1 Immune Response following a Trypanosoma brucei Infection Is MyD88 Dependent. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 175, n. 4, p. 2501–2509, 2005. DOI: 10.4049/jimmunol.175.4.2501.

DUBOIS, M. E.; DEMICK, K. P.; MANSFIELD, J. M. Trypanosomes Expressing a Mosaic Variant Surface Glycoprotein Coat Escape Early Detection by the Immune System. **Infection and Immunity**, [S. l.], v. 73, n. 5, p. 2690 LP – 2697, 2005. DOI: 10.1128/IAI.73.5.2690-2697.2005. Disponível em: <http://iai.asm.org/content/73/5/2690.abstract>.

EGER-MANGRICH, I.; DE OLIVEIRA, M. A.; GRISARD, E. C.; DE SOUZA, W.; STEINDEL, M. Interaction of Trypanosoma rangeli Tejera, 1920 with different cell lines in vitro. **Parasitol Res**, [S. l.], v. 87, n. 6, p. 505–509, 2001.

EINHAUER, A.; JUNGBAUER, A. The FLAG peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. **J Biochem Biophys Methods**, [S. l.], v. 49, n. 1–3, p. 455–465, 2001.

EISENHABER, B.; EISENHABER, S.; KWANG, T. Y.; GRÜBER, G.; EISENHABER, F. Transamidase subunit GAA1/GPAA1 is a M28 family metallo-peptide-synthetase that catalyzes the peptide bond formation between the substrate protein's omega-site and the GPI lipid anchor's phosphoethanolamine. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, [S. l.], v. 13, n. 12, p. 1912–1917, 2014. DOI: 10.4161/cc.28761. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24743167>.

EL-SAYED, N. M. *et al.* The genome sequence of Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, [S. l.], v. 309, n. 5733, p. 409–415, 2005. DOI: 10.1126/science.1112631.

EMANUELSSON, O.; NIELSEN, H.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G. Predicting Subcellular Localization of Proteins Based on their N-terminal Amino Acid Sequence. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 300, n. 4, p. 1005–1016, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3903>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283600939032>.

FELLET, M. R.; LORENZO, M. G.; ELLIOT, S. L.; CARRASCO, D.; GUARNERI, A. A. Effects of infection by Trypanosoma cruzi and Trypanosoma rangeli on the reproductive performance of the vector Rhodnius prolixus. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 9, n. 8, p. 26–32, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0105255.

FERGUSON M. A. J, HART G. W, KINOSHITA T. Glycosylphosphatidylinositol Anchors. *In*: VARKI A, CUMMINGS R. D, ESKO J. D, STANLEY P, HART G. W, AEBI M, DARVILL A. G, KINOSHITA T, PACKER N. H, PRESTEGARD J. H, SCHNAAR R. L, SEEBERGER P. H, (org). **Essentials of**

Glycobiology. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453072/>.

FERGUSON, M. A.; HOMANS, S. W.; DWEK, R. A.; RADEMACHER, T. W. Glycosylphosphatidylinositol moiety that anchors *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein to the membrane. **Science**, [S. l.], v. 239, n. 4841, p. 753 LP – 759, 1988. DOI: 10.1126/science.3340856. Disponível em: <http://science.sciencemag.org/content/239/4841/753>.

FERNANDES, M. C.; ANDREWS, N. W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. **FEMS Microbiol Rev**, [S. l.], v. 36, n. 3, p. 734–747, 2012. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2012.00333.x.

FERREIRA, L. de L.; ARAÚJO, F. F. de; MARTINELLI, P. M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ALVES-SILVA, J.; GUARNERI, A. A. New features on the survival of human-infective *Trypanosoma rangeli* in a murine model: Parasite accumulation is observed in lymphoid organs. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 14, n. 12, p. e0009015, 2020. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009015.

FERREIRA, L. L.; LORENZO, M. G.; ELLIOT, S. L.; GUARNERI, A. A. A standardizable protocol for infection of *Rhodnius prolixus* with *Trypanosoma rangeli*, which mimics natural infections and reveals physiological effects of infection upon the insect. **Journal of Invertebrate Pathology**, [S. l.], v. 105, n. 1, p. 91–97, 2010. DOI: 10.1016/j.jip.2010.05.013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2010.05.013>.

FIELD M. C.; HORN D.; FAIRLAMB A. H.; FERGUSON M. A.; GRAY D. W.; READ K. D.; DE RYCKER M.; TORRIE L. S.; WYATT P. G.; WYLLIE S.; GILBERT I. H. ANTI-trypanosomatid drug discovery: An ongoing challenge and a continuing need. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 15, n. 4, p. 217–231, 2017. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.193. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2016.193>.

FIELD, M. C.; CARRINGTON, M. The trypanosome flagellar pocket. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 7, n. 11, p. 775–786, 2009. DOI: 10.1038/nrmicro2221.

FLORES-FERRER, A.; MARCOU, O.; WALECKX, E.; DUMONTEIL, E.; GOURBIERE, S. Evolutionary ecology of Chagas disease; what do we know and what do we need? **Evol Appl**, [S. l.], v. 11, n. 4, p. 470–487, 2018. DOI: 10.1111/eva.12582.

FRAGA, J.; FERNÁNDEZ-CALIENES, A.; MONTALVO, A. M.; MAES, I.; DEBORGGRAEVE, S.; BÜSCHER, P.; DUJARDIN, J. C.; VAN DER AUWERA, Gert. Phylogenetic analysis of the *Trypanosoma* genus based on the heat-shock protein 70 gene. **Infection, Genetics and Evolution**, [S. l.], v. 43, p. 165–172, 2016. DOI: 10.1016/j.meegid.2016.05.016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2016.05.016>.

FREIRE-DE-LIMA, L.; FONSECA, L. M.; OELTMANN, T.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; PREVIATO, J. O. The trans-sialidase, the major *Trypanosoma cruzi* virulence factor: Three decades of studies. **Glycobiology**, [S. l.], v. 25, n. 11, p. 1142–1149, 2015. DOI: 10.1093/glycob/cwv057.

FREIRE-DE-LIMA L.; GENTILE L. B.; DA FONSECA L. M.; DA COSTA K. M.; SANTOS LEMOS J.; JACQUES L. R.; MORROT A.; FREIRE-DE-LIMA C. G.; NUNES M. P.; TAKIYA C. M.; PREVIATO J. O.; MENDONÇA-PREVIATO L. Role of Inactive and Active *Trypanosoma cruzi* Trans-sialidases on T Cell Homing and Secretion of Inflammatory Cytokines. **Frontiers in microbiology**, [S. l.],

I., v. 8, p. 1307, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01307.

FREITAS-JUNIOR, L. H. G.; BRIONES, M. R. S.; SCHENKMAN, S. Two distinct groups of mucin-like genes are differentially expressed in the developmental stages of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [*S. I.*], v. 93, n. 1, p. 101–114, 1998. DOI: 10.1016/S0166-6851(98)00025-5.

FREITAS, L. M.; DOS SANTOS, S. L.; RODRIGUES-LUIZ, G. F.; MENDES, T. A.; RODRIGUES, T. S.; GAZZINELLI, R. T.; TEIXEIRA, S. M.; FUJIWARA, R. T.; BARTHOLOMEU, D. C. Genomic analyses, gene expression and antigenic profile of the trans-sialidase superfamily of *Trypanosoma cruzi* reveal an undetected level of complexity. **PLoS One**, [*S. I.*], v. 6, n. 10, p. e25914, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0025914.

GARCÍA, E.A.; ZILIANI, M.; AGÜERO, F.; BERNABÓ, G.; SÁNCHEZ, D. O.; TEKIEL, V. TcTASV: A novel protein family in *Trypanosoma cruzi* identified from a subtractive trypomastigote cDNA library. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [*S. I.*], v. 4, n. 10, 2010. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000841.

GAZZINELLI, R. T.; PEREIRA, M. E.; ROMANHA, A.; GAZZINELLI, G.; BRENER, Z. Direct lysis of *Trypanosoma cruzi*: a novel effector mechanism of protection mediated by human anti-gal antibodies. **Parasite immunology**, England, v. 13, n. 4, p. 345–356, 1991. DOI: 10.1111/j.1365-3024.1991.tb00288.x.

GERBER, L. D.; KODUKULA, K.; UDENFRIEND, S. Phosphatidylinositol glycan (PI-G) anchored membrane proteins. Amino acid requirements adjacent to the site of cleavage and PI-G attachment in the COOH-terminal signal peptide. **The Journal of biological chemistry**, United States, v. 267, n. 17, p. 12168–12173, 1992.

GHOSH, S. Sialylation and sialyltransferase in insects. **Glycoconj J**, [*S. I.*], 2018. DOI: 10.1007/s10719-018-9835-6.

GONÇALVES, M. F.; UMEZAWA, E. S.; KATZIN, A. M.; DE SOUZA, W.; ALVES, M. J.; ZINGALES, B.; COLLI, W. *Trypanosoma cruzi*: shedding of surface antigens as membrane vesicles. **Experimental parasitology**, United States, v. 72, n. 1, p. 43–53, 1991. DOI: 10.1016/0014-4894(91)90119-h.

GOURBIERE, S.; DORN, P.; TRIPET, F.; DUMONTEIL, E.; GOURBIÈRE, S.; DORN, P.; TRIPET, F.; DUMONTEIL, E. Genetics and evolution of triatomines: from phylogeny to vector control. **Heredity (Edinb)**, [*S. I.*], v. 108, n. 3, p. 190–202, 2012. DOI: 10.1038/hdy.2011.71. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/hdy.2011.71>.

GRANUCCI, N. **Estudo da interação celular parasito-hospedeiro a partir da expressão heteróloga de trans-sialidase de *Trypanosoma cruzi* por *Trypanosoma rangeli* em ensaios in vitro e in vivo**. 2013. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências 2014. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

GREEN, G. M. Pulmonary clearance of infectious agents. **Annual review of medicine**, [*S. I.*], v. 19, n. 176, p. 315–336, 1968. DOI: 10.1146/annurev.me.19.020168.001531.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring

Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.

GRISARD, E. C.; STEINDEL, M.; GUARNERI, A. A.; EGER-MANGRICH, I.; CAMPBELL, D. A.; ROMANHA, A. J. Characterization of *Trypanosoma rangeli* strains isolated in Central and South America: an overview. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, [S. l.], v. 94, n. 2, p. 203–209, 1999.

GRISARD, E. C. Salivaria or Stercoraria? The *Trypanosoma rangeli* dilemma. **Kinetoplastid Biology and Disease**, [S. l.], v. 1, p. 1–2, 2002. DOI: 10.1186/1475-9292-1-5.

GRISARD E. C.; STOCO P. H.; WAGNER G.; SINCERO T. C.; ROTAVA G.; RODRIGUES J. B.; SNOEIJER C. Q.; KOERICH L. B.; SPERANDIO M. M.; BAYER-SANTOS E.; FRAGOSO S. P.; GOLDENBERG S.; TRIANA O.; VALLEJO G. A.; TYLER K. M.; DÁVILA A. M.; STEINDEL M. Transcriptomic analyses of the avirulent protozoan parasite *Trypanosoma rangeli*. **Mol Biochem Parasitol**, [S. l.], v. 174, n. 1, p. 18–25, 2010. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2010.06.008.

GUARNER, J.; BARTLETT, J.; ZAKI, S. R.; COLLEY, D. G.; GRIJALVA, M. J.; POWELL, M. R. Mouse model for Chagas disease: immunohistochemical distribution of different stages of *Trypanosoma cruzi* in tissues throughout infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [S. l.], v. 65, n. 2, p. 152–158, 2001. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2001.65.152>. Disponível em: <http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.2001.65.152>.

GUARNERI, A. A.; ATELLA, G.; PRETO, B. Interação Parasito-Vetor (Tripanossomatídeos). *In: Tópicos Avançados em Entomologia Molecular Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular* [S. l.], p. 1–44, 2012.

GUEVARA P.; DIAS M.; ROJAS A.; CRISANTE G.; ABREU-BLANCO M. T.; UMEZAWA E.; VAZQUEZ M.; LEVIN M.; AÑEZ N.; RAMIREZ J. L. Expression of fluorescent genes in *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): Its application to parasite-vector biology. **Journal of Medical Entomology**, [S. l.], v. 42, n. 1, p. 48–56, 2005. DOI: 10.1093/jmedent/42.1.48.

GUHL, F.; VALLEJO, G. A. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920: an updated review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, [S. l.], v. 98, n. 4, p. 435–442, 2003.

GULL, K. The biology of kinetoplastid parasites: insights and challenges from genomics and post-genomics. **Int J Parasitol**, [S. l.], v. 31, n. 5–6, p. 443–452, 2001.

GUPTA, S.; SALGADO-JIMÉNEZ, B.; LOKUGAMAGE, N.; VÁZQUEZ-CHAGOYÁN, J. C.; GARG, N. J. TcG2/TcG4 DNA Vaccine Induces Th1 Immunity against Acute *Trypanosoma cruzi* Infection: Adjuvant and antigenic effects of heterologous T. *Rangeli* Booster Immunization. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 10, n. JUN, p. 1–18, 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01456.

HADLEY, T. J. Invasion of erythrocytes by malaria parasites: a cellular and molecular overview. **Annual review of microbiology**, United States, v. 40, p. 451–477, 1986. DOI: 10.1146/annurev.mi.40.100186.002315.

HECKER, H.; SCHWARZENBACH, M.; RUDIN, W. Development and interactions of *Trypanosoma rangeli* in and with the reduviid bug *Rhodnius prolixus*. **Parasitology research**, Germany, v. 76, n. 4, p. 311–318, 1990. DOI: 10.1007/BF00928185.

HERBIG-SANDREUTER, A. Further studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera 1920. **Acta tropica**, [S. l.], v. 14, n. 3, p. 193–207, 1957. DOI: 10.5169/seals-310679.

HERREROS-CABELLO, A.; CALLEJAS-HERNÁNDEZ, F.; GIRONÈS, N.; FRESNO, M. Trypanosoma Cruzi Genome: Organization, Multi-Gene Families, Transcription, and Biological Implications. **Genes**, [S. l.], v. 11, n. 10, 2020. DOI: 10.3390/genes11101196.

HICKS, S. J.; THEODOROPOULOS, G.; CARRINGTON, S. D.; CORFIELD, A. P. The role of mucins in host-parasite interactions. Part I-protozoan parasites. **Parasitol Today**, [S. l.], v. 16, n. 11, p. 476–481, 2000.

HOSTETTLER, L.; GRUNDY, L.; KASER-PEBERNARD, S.; WICKY, C.; SCHAFER, W. R.; GLAUSER, D. A. The Bright Fluorescent Protein mNeonGreen Facilitates Protein Expression Analysis In Vivo. **G3 (Bethesda)**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 607–615, 2017. DOI: 10.1534/g3.116.038133.

HYLAND, K. V.; ASFAW, S. H.; OLSON, C. L.; DANIELS, M. D.; ENGMAN, D. M. Bioluminescent imaging of Trypanosoma cruzi infection. **International Journal for Parasitology**, [S. l.], v. 38, n. 12, p. 1391–1400, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.04.002>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751908001458>.

ILG, T.; STIERHOF, Y. D.; CRAIK, D.; SIMPSON, R.; HANDMAN, E.; BACIC, A. Purification and structural characterization of a filamentous, mucin-like proteophosphoglycan secreted by Leishmania parasites. **J Biol Chem**, [S. l.], v. 271, n. 35, p. 21583–21596, 1996.

IVENS, A. C. *et al.* The genome of the kinetoplastid parasite, Leishmania major. **Science**, [S. l.], v. 309, n. 5733, p. 436–442, 2005. DOI: 10.1126/science.1112680.

JERS, C.; MICHALAK, M.; LARSEN, D. M.; KEPP, K. P.; LI, H.; GUO, Y.; KIRPEKAR, F.; MEYER, A. S.; MIKKELSEN, J. D. Rational design of a new Trypanosoma rangeli trans-sialidase for efficient sialylation of glycans. **PLoS One**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. e83902, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0083902.

JONES, C.; TODESCHINI, A. R.; AGRELLOS, O. A.; PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO, L. Heterogeneity in the biosynthesis of mucin O-glycans from Trypanosoma cruzi Tulahuen strain with the expression of novel galactofuranosyl-containing oligosaccharides. **Biochemistry**, [S. l.], v. 43, n. 37, p. 11889–11897, 2004. DOI: 10.1021/bi048942u.

JURBERG, J.; RODRIGUES, J. M. S.; MOREIRA, F. F. F.; DALE, C.; CORDEIRO, I. R. S.; LAMAS JR, V. D.; GALVÃO, C.; ROCHA, D. da S. Atlas Iconográfico dos Triatomíneos do Brasil (Vetores da Doença de Chagas). Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 2014 p. 58.

KAHN, S.; COLBERT, T. G.; WALLACE, J. C.; HOAGLAND, N. A.; EISEN, H. The major 85-kDa surface antigen of the mammalian-stage forms of Trypanosoma cruzi is a family of sialidases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 88, n. 10, p. 4481–4485, 1991. DOI: 10.1073/pnas.88.10.4481.

KALENDAR, R.; KHASSENOV, B.; RAMANKULOV, Y.; SAMUILOVA, O.; IVANOV, K. I. FastPCR: An in silico tool for fast primer and probe design and advanced sequence analysis. **Genomics**, [S. l.], v. 109, n. 3, p. 312–319, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2017.05.005>.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. **Molecular Biology and Evolution**, [S. l.], v. 30, n. 4, p. 772–780, 2013. DOI: 10.1093/molbev/mst010.

KELLY, J. M.; WARD, H. M.; MILES, M. A.; KENDALL, G. A shuttle vector which facilitates the

expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. **Nucleic Acids Res**, [S. l.], v. 20, n. 15, p. 3963–3969, 1992.

KELLY, S.; IVENS, A.; MANNA, P. T.; GIBSON, W.; FIELD, M. C. A draft genome for the African crocodylian trypanosome *Trypanosoma grayi*. **Sci Data**, [S. l.], v. 1, p. 140024, 2014. DOI: 10.1038/sdata.2014.24.

KINOSHITA, T. Glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchors: Biochemistry and cell biology: Introduction to a thematic review series. **Journal of Lipid Research**, [S. l.], v. 57, n. 1, p. 4–5, 2016. DOI: 10.1194/jlr.E065417.

KLOEHN, J.; SAUNDERS, E. C.; O'CALLAGHAN, S.; DAGLEY, M. J.; MCCONVILLE, M. J. Characterization of Metabolically Quiescent *Leishmania* Parasites in Murine Lesions Using Heavy Water Labeling. **PLOS Pathogens**, [S. l.], v. 11, n. 2, p. e1004683, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004683>.

KOERICH, L. B.; EMMANUELLE-MACHADO, P.; SANTOS, K.; GRISARD, E. C.; STEINDEL, M. Differentiation of *Trypanosoma rangeli*: high production of infective Trypomastigote forms in vitro. **Parasitol Res**, [S. l.], v. 88, n. 1, p. 21–25, 2002. DOI: 10.1007/s004360100501.

KRATZ, J. M. Drug discovery for chagas disease: A viewpoint. **Acta Tropica**, [S. l.], v. 198, p. 105107, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105107>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X19305212>.

LANTOS A. B.; CARLEVARO G.; ARAOZ B.; RUIZ DIAZ P.; CAMARA M. de los M.; BUSCAGLIA C. A.; BOSSI M.; YU H.; CHEN X.; BERTOZZI C. R.; MUCCI J.; CAMPETELLA O. Sialic Acid Glycobiology Unveils *Trypanosoma cruzi* Trypomastigote Membrane Physiology. **PLoS Pathog**, [S. l.], v. 12, n. 4, p. e1005559, 2016. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005559.

LEE, B. Y.; BACON, K. M.; BOTTAZZI, M. E.; HOTEZ, P. J. Global economic burden of Chagas disease: A computational simulation model. **The Lancet Infectious Diseases**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 342–348, 2013. DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70002-1.

LEE, M. G.; VAN DER PLOEG, L. H. Transcription of protein-coding genes in trypanosomes by RNA polymerase I. **Annual review of microbiology**, United States, v. 51, p. 463–489, 1997. DOI: 10.1146/annurev.micro.51.1.463.

LEFRANÇAIS E.; ORTIZ-MUÑOZ G.; CAUDRILLIER A.; MALLAVIA B.; LIU F.; SAYAH D. M.; THORNTON E. E.; HEADLEY M. B.; DAVID T.; COUGHLIN S. R.; KRUMMEL M. F.; LEAVITT A. D.; PASSEGUÉ E.; LOONEY M. R. The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. **Nature**, [S. l.], v. 544, n. 7648, p. 105–109, 2017. DOI: 10.1038/nature21706.

LEFRANÇAIS, E.; LOONEY, M. R. Platelet Biogenesis in the Lung Circulation. **Physiology**, [S. l.], v. 34, n. 6, p. 392–401, 2019. DOI: 10.1152/physiol.00017.2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/physiol.00017.2019>.

LEGUIZAMON, M. S.; CAMPETELLA, O. E.; GONZALEZ CAPPAS, S. M.; FRASCH, A. C. Mice infected with *Trypanosoma cruzi* produce antibodies against the enzymatic domain of trans-sialidase that inhibit its activity. **Infect Immun**, [S. l.], v. 62, n. 8, p. 3441–3446, 1994.

LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new

developments. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 47, n. W1, p. W256–W259, 2019. DOI: 10.1093/nar/gkz239. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz239>.

LEWIS M. D.; FORTES FRANCISCO A.; TAYLOR M. C.; BURRELL-SAWARD H.; MCLATCHIE A. P.; MILES M. A.; KELLY J. M. Bioluminescence imaging of chronic *Trypanosoma cruzi* infections reveals tissue-specific parasite dynamics and heart disease in the absence of locally persistent infection. **Cell Microbiol**, [S. l.], v. 16, n. 9, p. 1285–1300, 2014. DOI: 10.1111/cmi.12297.

LEWIS, M. D.; KELLY, J. M. Putting Infection Dynamics at the Heart of Chagas Disease. **Trends in Parasitology**, [S. l.], v. 32, n. 11, p. 899–911, 2016. DOI: 10.1016/j.pt.2016.08.009.

LI, H.; RASMUSSEN, M. I.; LARSEN, M. R.; GUO, Y.; JERS, C.; PALMISANO, G.; MIKKELSEN, J. D.; KIRPEKAR, F. Automated N-glycan profiling of a mutant *Trypanosoma rangeli* sialidase expressed in *Pichia pastoris*, using tandem mass spectrometry and bioinformatics. **Glycobiology**, [S. l.], v. 25, n. 12, p. 1350–1361, 2015. DOI: 10.1093/glycob/cwv063.

LIDANI, K. C. F.; ANDRADE, F. A.; BAVIA, L.; DAMASCENO, F. S.; BELTRAME, M. H.; MESSIAS-REASON, I. J.; SANDRI, T. L. Chagas disease: From discovery to a worldwide health problem. **Journal of Physical Oceanography**, [S. l.], v. 49, n. 6, p. 1–13, 2019. DOI: 10.3389/fpubh.2019.00166. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpubh.2019.00166>.

LISCHKE, A.; KLEIN, C.; STIERHOF, Y. D.; HEMPEL, M.; MEHLERT, A.; ALMEIDA, I. C.; FERGUSON, M. A.; OVERATH, P. Isolation and characterization of glycosylphosphatidylinositol-anchored, mucin-like surface glycoproteins from bloodstream forms of the freshwater-fish parasite *Trypanosoma carassii*. **Biochem J**, [S. l.], v. 345 Pt 3, p. 693–700, 2000.

LIU W.; XIE Y.; MA J.; LUO X.; NIE P.; ZUO Z.; LAHRMANN U.; ZHAO Q.; ZHENG Y.; ZHAO Y.; XUE Y.; REN J. IBS: an illustrator for the presentation and visualization of biological sequences. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 31, n. 20, p. 3359–3361, 2015. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv362.

LLANES, A.; RESTREPO, C. M.; VECCHIO, G. D.; ANGUIZOLA, F. J.; LLEONART, R. The genome of *Leishmania panamensis*: insights into genomics of the *L. (Viannia)* subgenus. **Sci Rep**, [S. l.], v. 5, p. 8550, 2015. DOI: 10.1038/srep08550

LOBO M.; BALOUZ V.; MELLI L.; CARLEVARO G.; CORTINA M. E.; CÁMARA M. L. M.; CÁNEPA G. E.; CARMONA S. J.; ALTCHÉH J.; CAMPETELLA O.; CIOCCHINI A. E.; AGÜERO F.; MUCCI J.; BUSCAGLIA C. A. Molecular and antigenic characterization of *Trypanosoma cruzi* ToIT proteins. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 13, n. 3, p. 1–27, 2018. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007245.

MACGREGOR, P.; SZÖÖR, B.; SAVILL, N. J.; MATTHEWS, K. R. Trypanosomal immune evasion, chronicity and transmission: An elegant balancing act. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 10, n. 6, p. 431–438, 2012. DOI: 10.1038/nrmicro2779.

MACHADO, P. E.; EGER-MANGRICH, I.; ROSA, G.; KOERICH, L. B.; GRISARD, E. C.; STEINDEL, M. Differential susceptibility of triatomines of the genus *Rhodnius* to *Trypanosoma rangeli* strains from different geographical origins. **Int J Parasitol**, [S. l.], v. 31, n. 5–6, p. 632–634, 2001.

MAEDA, F. Y.; CORTEZ, C.; YOSHIDA, N. Cell signaling during *Trypanosoma cruzi* invasion. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 3, n. NOV, p. 1–7, 2012. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00361.

MAEDA, F. Y.; CLEMENTE, T. M.; MACEDO, S.; CORTEZ, C.; YOSHIDA, N. Host cell invasion and oral infection by *Trypanosoma cruzi* strains of genetic groups TcI and TcIV from chagasic patients. **Parasites and Vectors**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1–12, 2016. DOI: 10.1186/s13071-016-1455-z.

MAIA da SILVA F.; NOYES H.; CAMPANER M.; JUNQUEIRA A. C.; COURA J. R.; AÑEZ N.; SHAW J. J.; STEVENS J. R.; TEIXEIRA M. M. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. **Parasitology**, [S. l.], v. 129, n. 5, p. 549–561, 2004. DOI: 10.1017/S0031182004005931.

MARÍN, D.; MARTÍN, M.; SABATER, B. Entropy decrease associated to solute compartmentalization in the cell. **Bio Systems**, Ireland, v. 98, n. 1, p. 31–36, 2009. DOI: 10.1016/j.biosystems.2009.07.001.

MARTINEZ-CALVILLO, S.; LOPEZ, I.; HERNANDEZ, R.; MARTÍNEZ-CALVILLO, S.; LÓPEZ, I.; HERNÁNDEZ, R. pRIBOTEX expression vector: a pTEX derivative for a rapid selection of *Trypanosoma cruzi* transfectants. **Gene**, [S. l.], v. 199, n. 1–2, p. 71–76, 1997. DOI: 10.1016/S0378-1119(97)00348-X.

MARTÍNEZ-CALVILLO, S.; VIZUET-DE-RUEDA, J.C.; FLORENCIO-MARTÍNEZ, L. E.; MANNING-CELA, R. G.; FIGUEROA-ANGULO, E. E. Gene Expression in Trypanosomatid Parasites. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, [S. l.], v. 2010, p. 525241, 2010. DOI: 10.1155/2010/525241. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2010/525241>.

MCCONVILLE, M. J.; FERGUSON, M. A. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. **The Biochemical journal**, [S. l.], v. 294 (Pt 2, n. Pt 2, p. 305–324, 1993. DOI: 10.1042/bj2940305.

MCLATCHIE, A. P.; BURRELL-SAWARD, H.; MYBURGH, E.; LEWIS, M. D.; WARD, T. H.; MOTTRAM, J. C.; CROFT, S. L.; KELLY, J. M.; TAYLOR, M. Highly Sensitive In Vivo Imaging of *Trypanosoma brucei* Expressing “Red-Shifted” Luciferase. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 7, n. 11, p. 1–12, 2013. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002571.

MELLO, C. B.; GARCIA, E. S.; RATCLIFFE, N. A.; AZAMBUJA, P. *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: interplay with hemolymph components of *Rhodnius prolixus*. **J Invertebr Pathol**, [S. l.], v. 65, n. 3, p. 261–268, 1995. DOI: 10.1006/jjipa.1995.1040.

MIAO, Q.; NDAO, M. *Trypanosoma cruzi* Infection and Host Lipid Metabolism. **Mediators of Inflammation**, [S. l.], v. 2014, 2014. DOI: 10.1155/2014/902038.

MICHEL, T.; POLI, A.; DOMINGUES, O.; MAUFFRAY, M.; THÉRÉSINE, M.; BRONS, N. H. C.; HENTGES, F.; ZIMMER, J. Mouse Lung and Spleen Natural Killer Cells Have Phenotypic and Functional Differences, in Part Influenced by Macrophages. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 7, n. 12, p. e51230, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051230>.

MONTES, C. L.; ACOSTA-RODRÍGUEZ, E. V.; MERINO, M. C.; BERMEJO, D. A.; GRUPPI, A. Polyclonal B cell activation in infections: infectious agents' devily or defense mechanism of the host? **Journal of Leukocyte Biology**, [S. l.], v. 82, n. 5, p. 1027–1032, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1189/jlb.0407214>.

MORENO, S. N. J.; SILVA, J.; VERCESI, A. E.; DOCAMPO, R. Cytosolic-free calcium

elevation in *Trypanosoma cruzi* is required for cell invasion. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 180, n. 4, p. 1535–1540, 1994. DOI: 10.1084/jem.180.4.1535.

MORTARA, R. A.; DA SILVA, S.; ARAGUTH, M. F.; BLANCO, S. A.; YOSHIDA, N. Polymorphism of the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes. **Infect Immun**, [S. l.], v. 60, n. 11, p. 4673–4678, 1992. DOI: 10.1128/iai.60.11.4673-4678.1992.

MORTARA, R. A.; MINELLI, L. M. S.; VANDEKERCKHOVE, F.; NUSSENZWEIG, V.; JUAREZ RAMALHO-PINTO, F.; RAMALHO-PINTO, F. J. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC) cleavage of GPI-anchored surface molecules of *Trypanosoma cruzi* triggers in vitro morphological reorganization of trypomastigotes. **J Eukaryot Microbiol**, [S. l.], v. 48, n. 1, p. 27–37, 2001. DOI: 10.1111/j.1550-7408.2001.tb00413.x.

MUCCI, J.; HIDALGO, A.; MOCETTI, E.; ARGIBAY, P. F.; LEGUIZAMÓN, M. S.; CAMPETELLA, O. Thymocyte depletion in *Trypanosoma cruzi* infection is mediated by trans-sialidase-induced apoptosis on nurse cells complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 99, n. 6, p. 3896–3901, 2002. DOI: 10.1073/pnas.052496399. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/99/6/3896>.

MUCCI, J.; RISSO, M. G.; LEGUIZAMÓN, M. S.; FRASCH, A. C. C.; CAMPETELLA, O. The trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* triggers apoptosis by target cell sialylation. **Cellular Microbiology**, [S. l.], v. 8, n. 7, p. 1086–1095, 2006. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2006.00689.x.

NAKAGAWA, A.; VON ALT, K.; LILLEMOE, K. D.; FERNÁNDEZ-DEL CASTILLO, C.; WARSHAW, A. L.; LISS, A. S. A method for fixing and paraffin embedding tissue to retain the natural fluorescence of reporter proteins. **BioTechniques**, [S. l.], v. 59, n. 3, p. 153–155, 2015. DOI: 10.2144/000114328.

NAKAYASU, E. S.; YASHUNSKY, D. V.; NOHARA, L. L.; TORRECILHAS, A. C.; NIKOLAEV, A. V.; ALMEIDA, I. C. GPIomics: global analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored molecules of *Trypanosoma cruzi*. **Mol Syst Biol**, [S. l.], v. 5, p. 261, 2009. DOI: 10.1038/msb.2009.13.

NOBLE, G. T.; CRAVEN, F. L.; SEGARRA-MASET, M. D.; MARTÍNEZ, J. E. R.; ŠARDŽÍK, R.; FLITSCH, S. L.; WEBB, S. J. Sialylation of lactosyl lipids in membrane microdomains by *T. cruzi* trans-sialidase. **Organic and Biomolecular Chemistry**, [S. l.], v. 12, n. 45, p. 9272–9278, 2014. DOI: 10.1039/c4ob01852d.

NOGUEIRA P. M.; RIBEIRO K.; SILVEIRA A. C.; CAMPOS J. H.; MARTINS-FILHO O. A.; BELA S. R.; CAMPOS M. A.; PESSOA N. L.; COLLI W.; ALVES M. J.; SOARES R. P.; TORRECILHAS A. C. Vesicles from different *Trypanosoma cruzi* strains trigger differential innate and chronic immune responses. **Journal of Extracellular Vesicles**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 1–16, 2015. DOI: 10.3402/jev.v4.28734.

OLMO, F.; COSTA, F. C.; MANN, G. S.; TAYLOR, M. C.; KELLY, J. M. Optimising genetic transformation of *Trypanosoma cruzi* using hydroxyurea-induced cell-cycle synchronisation. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [S. l.], v. 226, n. May, p. 34–36, 2018. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2018.07.002.

OSORIO, Y.; TRAVI, B. L.; PALMA, G. I.; SARAIVIA, N. G. Infectivity of *Trypanosoma rangeli*

in a promonocytic mammalian cell line. **Journal of Parasitology**, [S. I.], v. 81, n. 5, p. 687–693, 1995. DOI: 10.2307/3283955.

PACHECO-LUGO, L.; DIAZ-OLMOS, Y.; SAENZ-GARCIA, J.; PROBST, C. M.; DAROCHA, W. D. Effective gene delivery to *Trypanosoma cruzi* epimastigotes through nucleofection. **Parasitol Int**, [S. I.], v. 66, n. 3, p. 236–239, 2017. DOI: 10.1016/j.parint.2017.01.019.

PARIS, G.; RATIER, L.; AMAYA, M. F.; NGUYEN, T.; ALZARI, P. M.; FRASCH, A. C. A sialidase mutant displaying trans-sialidase activity. **J Mol Biol**, [S. I.], v. 345, n. 4, p. 923–934, 2005. DOI: 10.1016/j.jmb.2004.09.031.

PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; ACOSTA-SERRANO, A.; CORREIA DE ALMEIDA, I.; FERGUSON, M. A.; SOUTO-PADRON, T.; RODRIGUES, M. M.; TRAVASSOS, L. R.; SCHENKMAN, S. Mucin-like molecules form a negatively charged coat that protects *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes from killing by human anti- α -galactosyl antibodies. **J Cell Sci**, [S. I.], v. 113 Pt 7, p. 1299–1307, 2000.

PEREIRA, M. E. A developmentally regulated neuraminidase activity in *Trypanosoma cruzi*. **Science**, United States, v. 219, n. 4591, p. 1444–1446, 1983. DOI: 10.1126/science.6338592.

PEREIRA, M. E.; LOURES, M. A.; VILLALTA, F.; ANDRADE, A. F. Lectin receptors as markers for *Trypanosoma cruzi*. Developmental stages and a study of the interaction of wheat germ agglutinin with sialic acid residues on epimastigote cells. **The Journal of experimental medicine**, [S. I.], v. 152, n. 5, p. 1375–1392, 1980. DOI: 10.1084/jem.152.5.1375.

PEREIRA, M. E.; MEJIA, J. S.; ORTEGA-BARRIA, E.; MATZILEVICH, D.; PRIOLI, R. P. The *Trypanosoma cruzi* neuraminidase contains sequences similar to bacterial neuraminidases, YWTD repeats of the low density lipoprotein receptor, and type III modules of fibronectin. **The Journal of experimental medicine**, [S. I.], v. 174, n. 1, p. 179–191, 1991. DOI: 10.1084/jem.174.1.179.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, [S. I.], v. 391, n. 10115, p. 82–94, 2018. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4). Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673617316124>.

PETERSEN, T. N.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G.; NIELSEN, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nat Meth**, [S. I.], v. 8, n. 10, p. 785–786, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1701>.

PETERSON, J. K.; GRAHAM, A. L. What is the “true” effect of *Trypanosoma rangeli* on its triatomine bug vector? **Journal of Vector Ecology**, [S. I.], v. 41, n. 1, p. 27–33, 2016. DOI: 10.1111/jvec.12190.

PIERDOMINICI-SOTTILE, G.; PALMA, J.; ROITBERG, A. E. Free-energy computations identify the mutations required to confer trans-sialidase activity into *Trypanosoma rangeli* sialidase. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, [S. I.], v. 82, n. 3, p. 424–435, 2014. DOI: 10.1002/prot.24408.

PIERLEONI, A.; MARTELLI, P. L.; CASADIO, R. PredGPI: a GPI-anchor predictor. **BMC Bioinformatics**, [S. I.], v. 9, p. 392, 2008. DOI: 10.1186/1471-2105-9-392.

POLLEVICK, G. D.; AFFRANCHINO, J.L.; FRASCH, A. C. C.; SÁNCHEZ, D. O. The complete sequence of a shed acute-phase antigen of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical**

Parasitology, [S. I.], v. 47, n. 2, p. 247–250, 1991. DOI: [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(91\)90185-9](https://doi.org/10.1016/0166-6851(91)90185-9). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0166685191901859>.

PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; TOMLINSON, S.; NUSSENZWEIG, V. Trypanosoma rangeli sialidase lacks trans-sialidase activity. **Mol Biochem Parasitol**, [S. I.], v. 62, n. 1, p. 19–25, 1993.

PONTES, C. L. M. **Identificação e estudo funcional de proteínas relacionadas à resistência ao sistema complemento de mamíferos em Trypanosoma rangeli**. 2020. Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biociências) Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências 2014. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/219438?show=full>.

PRESTES, E. B.; STOCO, P. H.; DE MORAES, M. H.; MOURA, H.; GRISARD, E. C. Messenger RNA levels of the Polo-like kinase gene (PLK) correlate with cytokinesis in the Trypanosoma rangeli cell cycle. **Experimental Parasitology**, [S. I.], v. 204, n. March, p. 107727, 2019. DOI: 10.1016/j.exppara.2019.107727.

PREVIATO, J. O.; ANDRADE, A. F.; PESSOLANI, M. C.; MENDONÇA-PREVIATO, L. Incorporation of sialic acid into Trypanosoma cruzi macromolecules. A proposal for a new metabolic route. **Molecular and biochemical parasitology**, Netherlands, v. 16, n. 1, p. 85–96, 1985. DOI: 10.1016/0166-6851(85)90051-9.

PRICE, M. N.; DEHAL, P. S.; ARKIN, A. P. FastTree 2 – Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. **PLOS ONE**, [S. I.], v. 5, n. 3, p. e9490, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>.

QUEIROZ, R. M. L.; CHARNEAU, S.; BASTOS, I. M. D.; SANTANA, J. M.; SOUSA, M. V.; ROEPSTORFF, P.; RICART, C. A. O. Cell surface proteome analysis of human-hosted Trypanosoma cruzi life stages. **J Proteome Res**, [S. I.], v. 13, n. 8, p. 3530–3541, 2014. DOI: 10.1021/pr401120y.

RADWANSKA, M.; VEREECKE, N.; DELEEUW, V.; PINTO, J.; MAGEZ, S. Salivarian Trypanosomosis: A Review of Parasites Involved, Their Global Distribution and Their Interaction With the Innate and Adaptive Mammalian Host Immune System **Frontiers in Immunology** v9 p. 2253, 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02253. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.02253>.

RAMIREZ, M. I.; RUIZ, R. de C.; ARAYA, J. E.; DA SILVEIRA, J. F.; YOSHIDA, N. Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of Trypanosoma cruzi metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. **Infection and Immunity**, [S. I.], v. 61, n. 9, p. 3636 LP – 3641, 1993. Disponível em: <http://iai.asm.org/content/61/9/3636.abstract>.

RAO S. P. S. *et al.* Drug Discovery for Kinetoplastid Diseases: Future Directions. **ACS Infectious Diseases**, [S. I.], v. 5, n. 2, p. 152–157, 2019. DOI: 10.1021/acinfecdis.8b00298.

REAL, F. *et al.* The genome sequence of Leishmania (Leishmania) amazonensis: functional annotation and extended analysis of gene models. **DNA Res**, [S. I.], v. 20, n. 6, p. 567–581, 2013. DOI: 10.1093/dnares/dst031.

RICE, P.; LONGDEN, I.; BLEASBY, A. EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. **Trends in genetics : TIG**, England, v. 16, n. 6, p. 276–277, 2000. DOI: 10.1016/s0168-9525(00)02024-2.

RODITI, I.; FURGER, A.; RUEPP, S.; SCHURCH, N.; BUTIKOFER, P. Unravelling the procyclin coat of *Trypanosoma brucei*. **Mol Biochem Parasitol**, [S. l.], v. 91, n. 1, p. 117–130, 1998.

ROMERO, I.; TELLEZ, J.; YAMANAKA, L. E.; STEINDEL, M.; ROMANHA, A. J.; GRISARD, E. C. Transsulfuration is an active pathway for cysteine biosynthesis in *Trypanosoma rangeli*. **Parasit Vectors**, [S. l.], v. 7, p. 197, 2014. DOI: 10.1186/1756-3305-7-197.

ROMERO I.; TÉLLEZ J.; ROMANHA A. J.; STEINDEL M.; GRISARD E. C.; Upregulation of Cysteine Synthase and Cystathionine beta-Synthase Contributes to *Leishmania braziliensis* Survival under Oxidative Stress. **Antimicrob Agents Chemother**, [S. l.], v. 59, n. 8, p. 4770–4781, 2015. DOI: 10.1128/aac.04880-14.

ROPERT, C.; GAZZINELLI, R. T. Regulatory role of toll-like receptor 2 during infection with *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Endotoxin Research**, [S. l.], v. 10, n. 6, p. 425–430, 2004. DOI: 10.1179/096805104225006507.

RUBIN-DE-CELIS, S. S.; UEMURA, H.; YOSHIDA, N.; SCHENKMAN, S. Expression of trypomastigote trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* increases parasite escape from its parasitophorous vacuole. **Cell Microbiol**, [S. l.], v. 8, n. 12, p. 1888–1898, 2006. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2006.00755.x.

RUIZ, R. C.; FAVORETO, S.; DORTA, M. L.; OSHIRO, M. E. M.; FERREIRA, A. T.; MANQUE, P. M.; YOSHIDA, N. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signalling activity. **Biochemical Journal**, [S. l.], v. 330, n. 1, p. 505–511, 1998. c. DOI: 10.1042/bj3300505.

RUIZ, R. C.; RIGONI, V. L.; GONZALEZ, J.; YOSHIDA, N. The 35/50 kDa surface antigen of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes, an adhesion molecule involved in host cell invasion. **Parasite Immunology**, [S. l.], v. 15, n. 2, p. 121–125, 1993. DOI: 10.1111/j.1365-3024.1993.tb00591.x.

SANTOS, E. W. *et al.* Hematological and biochemical reference values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c mice. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, [S. l.], v. 53, n. 2 SE-, p. 138–145, 2016. DOI: 10.11606/issn.1678-4456.v53i2p138-145. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/103850>.

SCHENKMAN, R. P. F.; VANDEKERCKHOVE, F.; SCHENKMAN, S. Mammalian cell sialic acid enhances invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Infect Immun**, [S. l.], v. 61, n. 3, p. 898–902, 1993. DOI: 10.1128/iai.61.3.898-902.1993.

SCHENKMAN, S.; EICHINGER, D.; PEREIRA, M. E.; NUSSENZWEIG, V. Structural and functional properties of *Trypanosoma* trans-sialidase. **Annual review of microbiology**, United States, v. 48, p. 499–523, 1994. DOI: 10.1146/annurev.mi.48.100194.002435.

SCHENKMAN, S.; FERGUSON, M. A.; HEISE, N.; DE ALMEIDA, M. L.; MORTARA, R. A.; YOSHIDA, N. Mucin-like glycoproteins linked to the membrane by glycosylphosphatidylinositol anchor are the major acceptors of sialic acid in a reaction catalyzed by trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and biochemical parasitology**, Netherlands, v. 59, n. 2, p. 293–303, 1993. a. DOI: 10.1016/0166-6851(93)90227-o.

SCHENKMAN, S.; JIANG, M. S.; HART, G. W.; NUSSENZWEIG, V. A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian

cells. **Cell**, [S. l.], v. 65, n. 7, p. 1117–1125, 1991. DOI: 10.1016/0092-8674(91)90008-M.

SCHENKMAN, S.; PONTES DE CARVALHO, L.; NUSSENZWEIG, V. Trypanosoma cruzi trans-sialidase and neuraminidase activities can be mediated by the same enzymes. **The Journal of experimental medicine**, [S. l.], v. 175, n. 2, p. 567–575, 1992. DOI: 10.1084/jem.175.2.567.

SCHENKMAN, S.; DIAZ, C.; NUSSENZWEIG, V. Attachment of Trypanosoma cruzi trypomastigotes to receptors at restricted cell surface domains. **Experimental Parasitology**, [S. l.], v. 72, n. 1, p. 76–86, 1991. DOI: 10.1016/0014-4894(91)90123-E.

SCHENKMAN, S.; FERGUSON, M. A. J.; HEISE, N.; CARDOSO DE ALMEIDA, M. L.; MORTARA, R. A.; YOSHIDA, N. Mucin-like glycoproteins linked to the membrane by glycosylphosphatidylinositol anchor are the major acceptors of sialic acid in a reaction catalyzed by trans-sialidase in metacyclic forms of Trypanosoma cruzi. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [S. l.], v. 59, n. 2, p. 293–303, 1993. b. DOI: 10.1016/0166-6851(93)90227-O.

SCHLINDWEIN, A. D.; **Estudo das sialidasas de Trypanosoma rangeli: caracterização genômica e expressão heteróloga de uma trans-sialidase**. Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biociências) Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências 2014. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

SCHMITZ, B.; KLEIN, R. A.; DUNCAN, I. A.; EGGE, H.; GUNAWAN, J.; PETER-KATALINIC, J.; DABROWSKI, U.; DABROWSKI, J. MS and NMR analysis of the cross-reacting determinant glycan from Trypanosoma brucei brucei MITat 1.6 variant specific glycoprotein. **Biochemical and biophysical research communications**, United States, v. 146, n. 3, p. 1055–1063, 1987. DOI: 10.1016/0006-291x(87)90754-6.

SCHOTTELIUS, J. Neuraminidase fluorescence test for the differentiation of Trypanosoma cruzi and Trypanosoma rangeli. **Trop Med Parasitol**, [S. l.], v. 38, n. 4, p. 323–327, 1987.

SEBAUGH, J. L. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. **Pharmaceutical Statistics**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 128–134, 2011. DOI: 10.1002/pst.426.

SHANER N. C.; LAMBERT G. G.; CHAMMAS A.; NI Y.; CRANFILL P. J.; BAIRD M. A.; SELL B. R.; ALLEN J. R.; DAY R. N.; ISRAELSSON M.; DAVIDSON M. W.; WANG J. A bright monomeric green fluorescent protein derived from Branchiostoma lanceolatum. **Nat Methods**, [S. l.], v. 10, n. 5, p. 407–409, 2013. DOI: 10.1038/nmeth.2413. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3811051/>.

SHARMA, R.; GLUENZ, E.; PEACOCK, L.; GIBSON, W.; GULL, K.; CARRINGTON, M. The heart of darkness: growth and form of Trypanosoma brucei in the tsetse fly. **Trends Parasitol**, [S. l.], v. 25, n. 11, p. 517–524, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.08.001>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492209001810>.

SIEVERS, F.; HIGGINS, D. G. Clustal omega. **Curr Protoc Bioinformatics**, [S. l.], v. 48, p. 3 13 1-16, 2014. DOI: 10.1002/0471250953.bi0313s48.

SIGNORELL, A.; MENON, A. K. Chapter 7 Attachment of a GPI Anchor to Protein. In: **The Enzymes**. [s.l.] : Academic Press, 2009. v. 26p. 133–149. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1874-6047\(09\)26007-0](https://doi.org/10.1016/S1874-6047(09)26007-0). Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874604709260070>.

SILBERSTEIN, Erica; SERNA, Carylinda; FRAGOSO, Stenio Perdigão; NAGARKATTI, Rana; DEBRABANT, Alain. A novel nanoluciferase-based system to monitor *Trypanosoma cruzi* infection in mice by bioluminescence imaging. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. e0195879, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195879>.

SKALICKÝ T.; DOBÁKOVÁ E.; WHEELER R. J.; TESAŘOVÁ M.; FLEGONTOV P.; JIRSOVÁ D.; VOTÝPKA J.; YURCHENKO V.; AYALA F. J.; LUKEŠ J. Extensive flagellar remodeling during the complex life cycle of *Paratrypanosoma*, an early-branching trypanosomatid. **Proc Natl Acad Sci U S A**, [S. l.], v. 114, n. 44, p. 11757–11762, 2017. DOI: 10.1073/pnas.1712311114.

SMIRCICH, P.; DUHAGON, M. A.; GARAT, B. Conserved Curvature of RNA Polymerase I Core Promoter Beyond rRNA Genes: The Case of the Trityps. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, [S. l.], v. 13, n. 6, p. 355–363, 2015. DOI: 10.1016/j.gpb.2015.09.005.

SOGAYAR, R.; KIPNIS, T. L.; CURI, P. R. A critical evaluation of the expression of parasitemia in experimental Chagas' disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, Brazil, v. 35, n. 5, p. 395–398, 1993. DOI: 10.1590/s0036-46651993000500002.

SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J Mol Biol**, [S. l.], v. 98, n. 3, p. 503–517, 1975.

STEENTOFT, C. et al. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. **EMBO J**, [S. l.], v. 32, n. 10, p. 1478–1488, 2013. DOI: 10.1038/emboj.2013.79.

STEINDEL, M.; GRISARD, E. C.; DE CARVALHO PINTO, C. J.; CORDEIRO, F. D.; RIBEIRO-RODRIGUES, R.; ROMANHA, A. J. Characterization of trypanosomes from the subgenus *Schizotrypanum* isolated from bats, *Eptesicus* sp. (Chiroptera: Vespertilionidae), captured in Florianópolis, Santa Catarina State, Brazil. **J Parasitol**, [S. l.], v. 84, n. 3, p. 601–607, 1998.

STEINDEL, M.; PINTO, J. C.; TOMA, H. K.; MANGIA, R. H.; RIBEIRO-RODRIGUES, R.; ROMANHA, A. J. *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920) isolated from a sylvatic rodent (*Echymys dasythrix*) in Santa Catarina Island, Santa Catarina State: first report of this trypanosome in southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 1991. DOI: 10.1590/S0074-02761991000100012.

STEVENS, J.; NOYES, H.; GIBSON, W. The Evolution of Trypanosomes Infecting Humans and Primates. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, [S. l.], v. 93, p. 669–676, 1998. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761998000500019&nrm=iso.

STOCO, P. H. et al. Genome of the avirulent human-infective trypanosome--*Trypanosoma rangeli*. **PLoS Negl Trop Dis**, [S. l.], v. 8, n. 9, p. e3176, 2014. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003176.

STOCO, P. H.; MILETTI, L. C.; PICOZZI, K.; STEINDEL, M.; GRISARD, E. C. Other Major Trypanosomiasis. In: MARCONDES, Carlos Brisola (org.). **Arthropod Borne Diseases**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 299–324. DOI: 10.1007/978-3-319-13884-8_19. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-319-13884-8_19.

STOTHARD, P. The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. **BioTechniques**, England, v. 28, n. 6, p. 1102,1104, 2000. DOI: 10.2144/00286ir01.

TAKLE, G. B.; CROSS, G. A. An 85-kilodalton surface antigen gene family of *Trypanosoma*

cruzi encodes polypeptides homologous to bacterial neuraminidases. **Molecular and biochemical parasitology**, Netherlands, v. 48, n. 2, p. 185–198, 1991. DOI: 10.1016/0166-6851(91)90114-I.

TANOURA, K.; YANAGI, T.; DE GARCIA, V. M.; KANBARA, H. Trypanosoma rangeli--in vitro metacyclogenesis and fate of metacyclic trypomastigotes after infection to mice and fibroblast cultures. **The Journal of eukaryotic microbiology**, United States, v. 46, n. 1, p. 43–48, 1999. DOI: 10.1111/j.1550-7408.1999.tb04582.x.

TAVARES, J.; COSTA, D. M.; TEIXEIRA, A. R.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; AMINO, Rogerio. In vivo imaging of pathogen homing to the host tissues. **Methods**, [S. l.], v. 127, p. 37–44, 2017. DOI: 10.1016/j.ymeth.2017.05.008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2017.05.008>.

TAYLOR, M. C.; HUANG, H.; KELLY, J. M. Genetic techniques in Trypanosoma cruzi. **Adv Parasitol**, [S. l.], v. 75, p. 231–250, 2011. DOI: 10.1016/b978-0-12-385863-4.00011-3.

TAYLOR, M. C.; FRANCISCO, A. F.; JAYAWARDHANA, S.; MANN, G. S.; WARD, A. I.; OLMO, F.; LEWIS, M. D.; KELLY, J. M. Exploiting Genetically Modified Dual-Reporter Strains to Monitor Experimental Trypanosoma cruzi Infections and Host-Parasite Interactions. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, United States, v. 1955, p. 147–163, 2019. DOI: 10.1007/978-1-4939-9148-8_11.

TAYLOR, M. C.; KELLY, J. M. pTcINDEX: a stable tetracycline-regulated expression vector for Trypanosoma cruzi. **BMC Biotechnology**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 32, 2006. DOI: 10.1186/1472-6750-6-32. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1472-6750-6-32>.

TEIXEIRA, S. M.; PAIVA, R. M. C. de; KANGUSSU-MARCOLINO, M. M.; DAROCHA, Wanderson D. Trypanosomatid comparative genomics: contributions to the study of parasite biology and different parasitic diseases. **Genetics and Molecular Biology**, [S. l.], v. 35, p. 1–17, 2012. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572012000100001&nrm=iso.

TODESCHINI, A. R.; DIAS, W. B.; GIRARD, M. F.; WIERUSZESKI, J.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; PREVIATO, J. O. Enzymatically inactive trans-sialidase from Trypanosoma cruzi binds sialyl and beta-galactopyranosyl residues in a sequential ordered mechanism. **The Journal of biological chemistry**, United States, v. 279, n. 7, p. 5323–5328, 2004. DOI: 10.1074/jbc.M310663200.

TODESCHINI, A. R.; GIRARD, M. F.; WIERUSZESKI, J.; NUNES, M. P.; DOSREIS, G. A.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; PREVIATO, J. O. trans-Sialidase from Trypanosoma cruzi binds host T-lymphocytes in a lectin manner. **The Journal of biological chemistry**, United States, v. 277, n. 48, p. 45962–45968, 2002. DOI: 10.1074/jbc.M203185200.

TOMLINSON, S.; PONTES DE CARVALHO, L. C.; VANDEKERCKHOVE, F.; NUSSENZWEIG, V. Role of sialic acid in the resistance of Trypanosoma cruzi trypomastigotes to complement. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, [S. l.], v. 153, n. 7, p. 3141–7, 1994. a. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8089492>.

TOMLINSON, S.; PONTES DE CARVALHO, L. C.; VANDEKERCKHOVE, F.; NUSSENZWEIG, V. Role of sialic acid in the resistance of Trypanosoma cruzi trypomastigotes to complement. **J Immunol**, [S. l.], v. 153, n. 7, p. 3141–3147, 1994. b. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8089492>.

TOMOMORI-SATO, C.; SATO, S.; CONAWAY, R. C.; CONAWAY, J. W. Immunoaffinity

purification of protein complexes from Mammalian cells. **Methods Mol Biol**, [S. l.], v. 977, p. 273–287, 2013. DOI: 10.1007/978-1-62703-284-1_22.

TORRECILHAS, A. C.; SOARES, R. P.; SCHENKMAN, S.; FERNÁNDEZ-PRADA, C.; OLIVIER, M. Extracellular Vesicles in Trypanosomatids: Host Cell Communication. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, [S. l.], v. 10, p. 602502, 2020. DOI: 10.3389/fcimb.2020.602502. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33381465>.

TRIBULATTI, M. V.; MUCCI, J.; VAN ROOIJEN, N.; LEGUIZAMÓN, M. S.; CAMPETELLA, O. The trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* induces thrombocytopenia during acute Chagas' disease by reducing the platelet sialic acid contents. **Infection and immunity**, [S. l.], v. 73, n. 1, p. 201–207, 2005. DOI: 10.1128/IAI.73.1.201-207.2005.

TRINDADE, Sandra et al. *Trypanosoma brucei* Parasites Occupy and Functionally Adapt to the Adipose Tissue in Mice. **Cell Host Microbe**, [S. l.], v. 19, n. 6, p. 837–848, 2016. DOI: 10.1016/j.chom.2016.05.002.

UEMURA, H.; SCHENKMAN, S.; NUSSENZWEIG, V.; EICHINGER, D. Only some members of a gene family in *Trypanosoma cruzi* encode proteins that express both trans-sialidase and neuraminidase activities. **EMBO J**, [S. l.], v. 11, n. 11, p. 3837–3844, 1992.

URBAN, I.; SANTURIO, L. B.; CHIDICHIMO, A.; YU, H.; CHEN, X.; MUCCI, J.; AGUERO, F.; BUSCAGLIA, C. A. Molecular diversity of the *Trypanosoma cruzi* TcSMUG family of mucin genes and proteins. **Biochem J**, [S. l.], v. 438, n. 2, p. 303–313, 2011. DOI: 10.1042/bj20110683.

UTRATNA, M.; ANNUK, H.; GERLACH, J. Q.; LEE, Y. C.; KANE, M.; KILCOYNE, M.; JOSHI, L. Rapid screening for specific glycosylation and pathogen interactions on a 78 species avian egg white glycoprotein microarray. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-06797-6. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-06797-6>.

VALLEJO, G. A.; GUHL, F.; CARRANZA, J. C.; MORENO, J.; TRIANA, O.; GRISARD, E. C. Parity between kinetoplast DNA and mini-exon gene sequences supports either clonal evolution or speciation in *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius colombiensis*, *R. pallescens* and *R. prolixus* in Colombia. **Infect Genet Evol**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 39–45, 2003.

VALLEJO, G. A.; GUHL, F.; SCHAUB, G. A. Triatominae-*Trypanosoma cruzi*/T. *rangeli*: Vector-parasite interactions. **Acta Tropica**, [S. l.], v. 110, n. 2–3, p. 137–147, 2009. DOI: 10.1016/j.actatropica.2008.10.001.

VALLEJO, G. A. *et al.* Interacción tripanosoma-vector-vertebrado y su relación con la sistemática y la epidemiología de la tripanosomiasis americana. **Biomédica**, [S. l.], v. 27, n. 1esp, p. 110, 2007. DOI: 10.7705/biomedica.v27i1.254.

VAN VOORHIS, W. C.; EISEN, H. FI-160. A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissue. **The Journal of experimental medicine**, [S. l.], v. 169, n. 3, p. 641–652, 1989. DOI: 10.1084/jem.169.3.641.

VARGAS-PARADA, L. Kinetoplastids and Their Networks of Interlocked DNA. **Nature Education**, [S. l.], v. 3, n. 9:63, 2010.

VARKI, A.; SCHAUER, R. Sialic Acids. *In*: VARKI A, CUMMINGS R. D, ESKO J. D, STANLEY P, HART G. W, AEBI M, DARVILL A. G, KINOSHITA T, PACKER N. H, PRESTEGARD J. H, SCHNAAR

R. L, SEEBERGER P. H, (org). **Essentials of Glycobiology**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453072/>.

VAZQUEZ, M. P.; LEVIN, Mariano J. Functional analysis of the intergenic regions of TcP2 β gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector. **Gene**, [S. l.], v. 239, n. 2, p. 217–225, 1999. DOI: 10.1016/S0378-1119(99)00386-8.

VIEIRA, C. S. *et al.* *Rhodnius prolixus* interaction with *Trypanosoma rangeli*: Modulation of the immune system and microbiota population. **Parasites and Vectors**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 1–13, 2015. DOI: 10.1186/s13071-015-0736-2.

VILLAFRAZ, O.; RONDÓN-MERCADO, R.; CÁCERES, A. J.; CONCEPCIÓN, J. L.; QUIÑONES, W. Molecular and biochemical characterization of natural and recombinant phosphoglycerate kinase B from *Trypanosoma rangeli*. **Experimental Parasitology**, [S. l.], v. 187, p. 42–48, 2018. DOI: 10.1016/j.exppara.2018.03.009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.03.009>.

VINCZE, Tamas; POSFAI, Janos; ROBERTS, Richard J. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. **Nucleic Acids Res**, Oxford, UK, v. 31, n. 13, p. 3688–3691, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC168933/>.

WAGNER G.; EIKO YAMANAKA L.; MOURA H.; DENARDIN LÜCKEMEYER D.; SCHLINDWEIN A. D.; HERMES STOCO P.; BUNSELMEYER FERREIRA H.; ROBERT BARR J.; STEINDEL M.; GRISARD E. C. The *Trypanosoma rangeli* trypomastigote surfaceome reveals novel proteins and targets for specific diagnosis. **J Proteomics**, [S. l.], v. 82, p. 52–63, 2013. DOI: 10.1016/j.jprot.2013.02.011.

WAGNER G.; JARDIM R.; TSCHOEKE DA.; LOUREIRO D. R.; OCAÑA K. A.; RIBEIRO A. C.; EMMEL V. E.; PROBST C. M.; PITALUGA A. N.; GRISARD E. C.; CAVALCANTI M. C.; CAMPOS M. L.; MATTOSO M.; DÁVILA A. M. STINGRAY: System for integrated genomic resources and analysis. **BMC Research Notes**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 1–9, 2014. DOI: 10.1186/1756-0500-7-132.

WARD, A. I.; OLMO, F.; ATHERTON, R. L.; TAYLOR, M. C.; KELLY, J. M. *Trypanosoma cruzi* amastigotes that persist in the colon during chronic stage murine infections have a reduced replication rate: *Trypanosoma cruzi* proliferation. **Open Biology**, [S. l.], v. 10, n. 12, 2020. DOI: 10.1098/rsob.200261rsob200261.

WARD, S.; O'SULLIVAN, J. M.; O'DONNELL, J. S. von Willebrand factor sialylation—A critical regulator of biological function. **Journal of thrombosis and haemostasis : JTH**, England, v. 17, n. 7, p. 1018–1029, 2019. DOI: 10.1111/jth.14471.

WEATHERHEAD, J. E.; GAZZINELLI-GUIMARAES, P.; KNIGHT, J. M.; FUJIWARA, R.; HOTEZ, P. J.; BOTTAZZI, M. E.; CORRY, D. B. Host Immunity and Inflammation to Pulmonary Helminth Infections. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 11, p. 2733, 2020. DOI: 10.3389/fimmu.2020.594520. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.594520>.

WHEELER, G.; TYLER, K. M. Widefield microscopy for live imaging of lipid domains and membrane dynamics. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, [S. l.], v. 1808, n. 3, p. 634–641, 2011. DOI: 10.1016/j.bbamem.2010.11.017.

WHEELER, T. J.; CLEMENTS, J.; FINN, R. D. Skylign: a tool for creating informative,

interactive logos representing sequence alignments and profile hidden Markov models. **BMC Bioinformatics**, [S. l.], v. 15, p. 7, 2014. DOI: 10.1186/1471-2105-15-7.

WU, A. M. Glycan structures and their recognition roles in the human blood group ABH/ii, Le(a, b, x, y) and Sialyl Le(a,x) active cyst glycoproteins. **Glycoconjugate journal**, United States, v. 36, n. 6, p. 495–507, 2019. DOI: 10.1007/s10719-019-09887-x.

YAMASHITA, K.; TACHIBANA, Y.; HITOI, A.; KOBATA, A. Sialic acid-containing sugar chains of hen ovalbumin and ovomucoid. **Carbohydrate Research**, [S. l.], v. 130, p. 271–288, 1984. DOI: [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(84\)85285-4](https://doi.org/10.1016/0008-6215(84)85285-4). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0008621584852854>.

YOSHIDA, N.; DORTA, M. L.; FERREIRA, A. T.; OSHIRO, M. E.; MORTARA, R. A.; ACOSTA-SERRANO, A.; FAVORETO JÚNIOR, S. Removal of sialic acid from mucin-like surface molecules of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes enhances parasite-host cell interaction. **Molecular and biochemical parasitology**, Netherlands, v. 84, n. 1, p. 57–67, 1997. DOI: 10.1016/s0166-6851(96)02783-1.

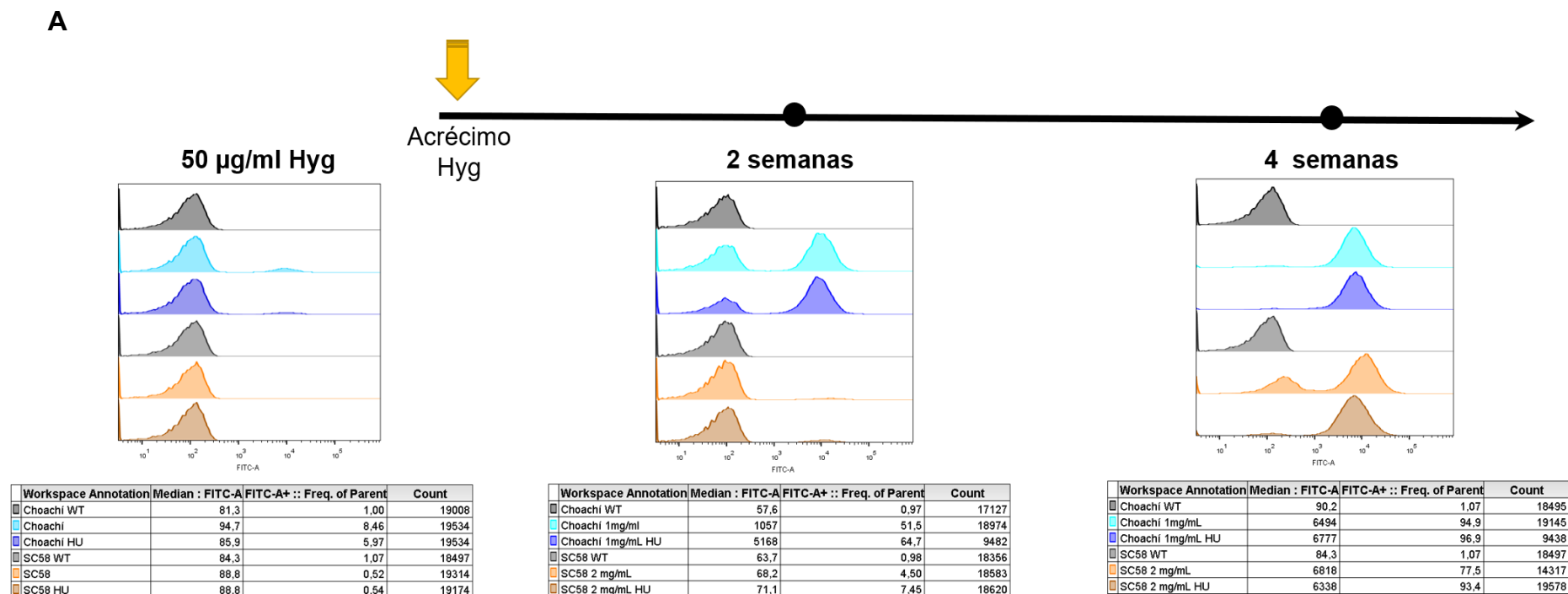
YOSHIDA, N.; MORTARA, R. A.; ARAGUTH, M. F.; GONZALEZ, J. C.; RUSSO, M. Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. **Infect Immun**, [S. l.], v. 57, n. 6, p. 1663–1667, 1989. DOI: 10.1128/iai.57.6.1663-1667.1989.

ZHOU, J. Y.; OSWALD, D. M.; OLIVA, K. D.; KREISMAN, L. S. C.; COBB, B. A. The Glycoscience of Immunity. **Trends Immunol**, [S. l.], v. 39, n. 7, p. 523–535, 2018. DOI: 10.1016/j.it.2018.04.004.

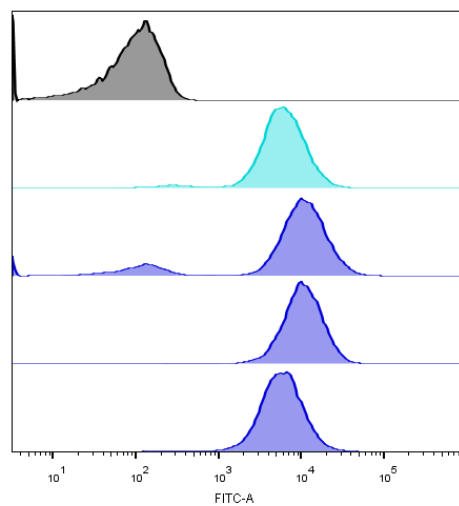
APÊNDICE A

Figura 47 – Análise de expressão de pTRIXrang durante processo de seleção de *T. rangeli* transfectado

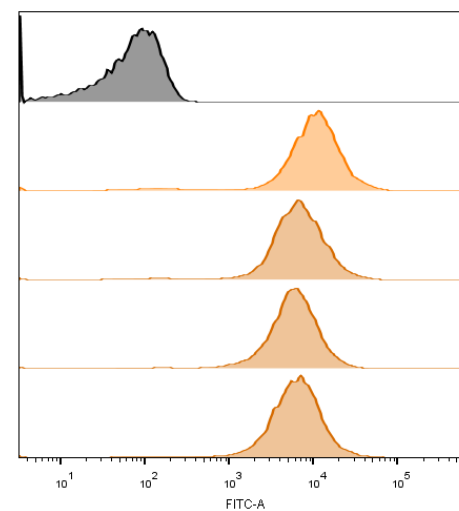
A) Análise de população fluorescente por citometria de fluxo dos parasitos mantidos em meio NNN+LIT. Perfil de expressão de Luc::Neo dos parasitos cultivados por duas semanas com concentração fixa de 50 µg/ml (gráfico à esquerda) após transfecção. Análise da população fluorescente após o acréscimo abrupto de Hyg e manutenção por 2 semanas (gráfico central) até 4 semanas (gráfico à direita) nessas concentrações da droga de seleção. **B)** Quantificação da população fluorescente obtida de diferentes poços de diluição seriada de Hyg após duas semanas de cultivo. Cepa Choachí (gráficos azuis), cepa SC58 gráficos laranja. Linhagens com indicação “B” mantidas com 1 mg/ml Hyg (cepa Choachí); 2mg/ml Hyg (cepa SC58). Linhagens com indicação “C” mantida em 0,5 mg/ml Hyg (Choachí). Gráficos de cor escura: Tratados com HU antes da transfecção; gráficos de cor clara: Sem tratamento prévio com HU. Todos histogramas normalizados pelo eixo Y. Median:FITC-A: indica intensidade da fluorescência calculada pela mediana do eixo X. FITC-A+::Freq of Parent: indica porcentagem da população fluorescente. Count: indica contagem de eventos celulares analisados.



B



Workspace Annotation	Median : FITC-A	FITC-A+ :: Freq. of Parent	Count
Choachí WT	90,2	1,07	18495
Choachí B2	5909	97,8	9711
Choachí B2 HU	9417	85,2	9561
Choachí B3 HU	10349	99,6	9633
Choachí C4 HU	5731	99,3	9754



Workspace Annotation	Median : FITC-A	FITC-A+ :: Freq. of Parent	Count
SC58 WT	63,7	0,98	18356
SC58 B1	10193	96,5	8774
SC58 B2 HU	6494	97,7	9222
SC58 B3 HU	5784	98,7	9255
SC58 B4 HU	6223	98,5	9233

Fonte: Autora.

APÊNDICE B

Esse apêndice é dedicado aos resultados complementares das análises *in silico* da caracterização das mucinas de *T. rangeli*.

Tabela 10 – Sequências homólogas à *TrMUCg* em *T. cruzi*.

<i>Query</i>	Gene ID	Produto gênico	E-Value	Identidade (%)	Cobertura (%)
<i>TrMUCg1</i>	TcCLB.506765.80	mucin TcMUCII	1.71e-4	27.03	58.26
<i>TrMUCg1</i>	TcCLB.509699.150	mucin TcMUCII	2.03e-4	42.61	50.00
<i>TrMUCg1</i>	TcCLB.507237.89	mucin TcMUCII	6.46e-4	31.25	48.26
<i>TrMUCg3</i>	TcCLB.507699.10	mucin TcMUCII	3.32e-6	37.68	93.62
<i>TrMUCg3</i>	TcCLB.506765.80	mucin TcMUCII	3.90e-6	26.11	93.62
<i>TrMUCg3</i>	TcCLB.507237.89	mucin TcMUCII	2.17e-5	30.36	79.43
<i>TrMUCg4</i>	TcCLB.508097.81	mucin TcMUCII	7.61e-5	41.67	63.16
<i>TrMUCg6</i>	TcCLB.508097.81	mucin TcMUCII	1.43e-4	41.67	63.16

* Genoma *T. cruzi* cepa CL Brener Esmeraldo-like (versão 2015).

Fonte: Autora.

Tabela 11 – Descrição dos membros e subclassificação do grupo *TrMUCp*

ID	posição no genoma			Proteína (aa)	elementos canônicos			Sub grupo
	Scaffold	Início	Fim		O-glicos. (%)	Peptídeo Sinal (Sítio)*	Âncora GPI (Sítio Ω)	
<i>TrMUCp5_3375</i>	5	100199	99468	244	14,75	30-31	213	H
<i>TrMUCp7_1510</i>	7	816868	817473	202	3,96	29-30	178	G
<i>TrMUCp8_2860</i>	8	162345	161188	386	13,21	35-36	357	F
<i>TrMUCp9_1729</i>	9	600519	599101	473	12,26	29-30	450	E
<i>TrMUCp17_1988</i>	17	6926	6321	202	4,46	29-30	179	G
<i>TrMUCp35</i>	18	85843	84863	327	11,01	31-32	301	H
<i>TrMUCp20_1225</i>	20	306505	305501	335	16,72	34-35	304	D
<i>TrMUCp20_1237</i>	20	300386	299388	333	18,92	32-33	302	D
<i>TrMUCp20_1279</i>	20	277999	277004	332	15,96	32-33	301	D
<i>TrMUCp20_1316</i>	20	254216	253221	332	17,77	32-33	301	D
<i>TrMUCp20_1328</i>	20	248139	247144	332	19,28	32-33	301	D
<i>TrMUCp20_1536</i>	20	135725	134763	321	15,89	29-30	297	D
<i>TrMUCp21_1565</i>	21	23578	22973	202	4,46	29-30	179	G
<i>TrMUCp24_831</i>	24	295654	294677	326	12,27	32-33	300	D
<i>TrMUCp24_647</i>	24	309031	310203	391	13,30	26-27	364	G
<i>TrMUCp24_652</i>	24	312711	313622	304	12,83	29-30	278	G
<i>TrMUCp24_673</i>	24	324580	325554	325	12,31	30-31	299	H
<i>TrMUCp36_499</i>	36	245571	246557	329	13,98	26-27	303	C
<i>TrMUCp36_409</i>	36	201945	203204	420	9,29	24-25	390	F

ID	Scaffold	Início	Fim	Proteína (aa)	O-glicos. (%)	Peptídeo Sinal (Sítio)*	Âncora GPI (Sítio Ω)	Sub grupo
TrMUCp36_1065	36	6954	5704	417	12,23	29-30	392	G
TrMUCp36_357	36	180912	182084	391	12,53	26-27	364	G
TrMUCp36_367	36	184526	185699	391	12,02	26-27	363	G
TrMUCp36_426	36	209526	211028	501	13,77	32-33	473	G
TrMUCp36_464	36	225763	227052	430	14,19	30-31	402	G
TrMUCp36_472	36	229582	230871	430	14,19	29-30	402	G
TrMUCp39_904	39	41749	40730	340	9,41	27-28	315	I
TrMUCp44_519	44	169434	168172	421	11,64	29-30	390	F
TrMUCp50_278	50	123154	125016	621	15,78	32-33	590	E
TrMUCp50_260	50	116806	117627	274	5,11	26-27	250	I
TrMUCp52_422	52	145427	144435	331	18,13	26-27	305	C
TrMUCp52_575	52	72170	70905	422	11,61	26-27	392	F
TrMUCp52_710	52	15376	13754	541	14,79	29-30	515	E
TrMUCp52_438	52	137930	136689	414	12,56	30-31	387	G
TrMUCp52_447	52	133488	132601	296	8,78	29-30	269	G
TrMUCp52_461	52	124707	123793	305	7,54	29-30	274	G
TrMUCp52_674	52	27895	26396	500	14,40	32-33	472	G
TrMUCp57_241	57	76526	75546	327	18,35	29-30	302	C
TrMUCp57_274	57	61490	60507	328	15,55	26-27	298	C
TrMUCp57_359	57	20388	19405	328	18,90	26-27	303	C
TrMUCp57_295	57	51443	50055	463	12,31	22-23	436	G
TrMUCp57_373	57	13048	11681	456	9,65	56-57	429	G
TrMUCp57_286	57	54744	53677	356	9,83	18-19	330	H
TrMUCp57_381	57	8979	8002	326	8,28	30-31	300	H
TrMUCp59_319	59	29056	28235	274	0,73	26-27	250	I
TrMUCp60_222	60	68725	67943	261	6,90	30-31	235	I
TrMUCp60_227	60	66432	65650	261	6,51	30-31	235	I
TrMUCp60_274	60	47719	46937	261	6,51	30-31	235	I
TrMUCp60_279	60	45428	44646	261	6,90	30-31	235	I
TrMUCp60_285	60	43133	42351	261	6,51	30-31	235	I
TrMUCp61_8	61	4133	5131	333	15,62	29-30	308	A
TrMUCp61_54	61	24444	25049	202	4,46	29-30	179	G
TrMUCp62_214	62	29176	28334	281	1,07	30-31	252	F
TrMUCp62_228	62	22518	21676	279	6,45	30-31	254	F
TrMUCp62_239	62	15434	14421	338	14,79	38-39	309	D
TrMUCp62_231	62	20530	19748	261	6,90	30-31	235	I
TrMUCp62_246	62	11209	10277	311	6,75	35-36	286	I
TrMUCp63_251	63	51640	50636	335	20,00	29-30	310	B
TrMUCp65_262	65	18108	16474	545	14,50	33-34	519	E
TrMUCp68_122	68	55780	56760	327	14,07	29-30	302	A
TrMUCp68_35	68	12649	13671	341	16,72	29-30	315	A
TrMUCp68_64	68	28563	29576	338	13,61	31-32	313	A
TrMUCp68_74	68	34390	35388	333	16,52	31-32	308	A
TrMUCp72_27	72	8415	9431	339	13,86	29-30	313	A

ID	Scaffold	Início	Fim	Proteína (aa)	O-glicos. (%)	Peptídeo Sinal (Sítio)*	Âncora GPI (Sítio Ω)	Sub grupo
<i>TrMUCp72_76</i>	72	28387	28992	202	3,96	29-30	178	G
<i>TrMUCp75_194</i>	75	20435	19428	336	19,05	29-30	311	A
<i>TrMUCp75_175</i>	75	27689	26994	232	9,91	29-30	207	B
<i>TrMUCp80_32</i>	80	12862	13875	338	17,46	29-30	313	A
<i>TrMUCp80_82</i>	80	35848	36540	231	7,79	29-30	206	B
<i>TrMUCp82_17</i>	82	7651	8661	337	14,84	29-30	311	A
<i>TrMUCp85_50</i>	85	26443	27441	333	16,22	29-30	308	A
<i>TrMUCp85_69</i>	85	37361	38347	329	17,02	31-32	304	A
<i>TrMUCp85_9</i>	85	4468	5160	231	6,93	29-30	206	B
<i>TrMUCp86_42</i>	86	16172	17647	492	13,62	32-33	462	G
<i>TrMUCp88_134</i>	88	16307	15285	341	15,84	29-30	315	A
<i>TrMUCp88_101</i>	88	31020	30007	338	10,65	30-31	309	H
<i>TrMUCp94_129</i>	94	19051	18053	333	15,32	31-32	308	A
<i>TrMUCp94_153</i>	94	8066	7050	339	16,52	29-30	314	A
<i>TrMUCp94_113</i>	94	25539	24526	338	11,54	30-31	309	H
<i>TrMUCp109_109</i>	109	9339	8425	305	6,89	29-30	280	I
<i>TrMUCp109_128</i>	109	1051	269	261	6,90	30-31	232	I
<i>TrMUCp109_68</i>	109	26869	25937	311	6,75	35-36	286	I
<i>TrMUCp115_20</i>	115	9972	10967	332	15,06	31-32	306	A
<i>TrMUCp115_14</i>	115	6932	7624	231	8,66	29-30	206	B
<i>TrMUCp125_31</i>	125	12929	13936	336	14,58	29-30	311	A
<i>TrMUCp125_37</i>	125	16632	17327	232	8,19	29-30	206	B
<i>TrMUCp134_12</i>	134	4206	5120	305	6,23	29-30	280	I
<i>TrMUCp134_18</i>	134	6640	7422	261	7,66	30-31	235	I
<i>TrMUCp134_35</i>	134	14784	15566	261	7,28	30-31	235	I

* Sítio de clivagem predito pela ferramenta SignalP v5.

Fonte: Autora.

Tabela 12 – Sequências homólogas à *TrMUCp* em *T. cruzi*

Query	Sub grupo	Gene ID	Produto gênico	E-Value	Identidade (%)	Cobertura (%)
<i>TrMUCp115_20</i>	A	<i>TcCLB.509147.40</i>	TcTASV, subfamily C	1,54E-07	26,81	99,40
<i>TrMUCp125_31</i>	A	<i>TcCLB.506289.130</i>	hypothetical protein	2,11E-08	31,86	80,06
<i>TrMUCp61_8</i>	A	<i>TcCLB.506289.130</i>	hypothetical protein	9,97E-10	30,38	79,88
<i>TrMUCp68_122</i>	A	<i>TcCLB.510717.20</i>	TcTASV, subfamily A	9,13E-13	37,60	35,47
<i>TrMUCp68_35</i>	A	<i>TcCLB.504127.20</i>	hypothetical protein	3,34E-09	27,27	80,65
<i>TrMUCp68_64</i>	A	<i>TcCLB.506289.130</i>	hypothetical protein	8,23E-08	33,90	61,83
<i>TrMUCp68_74</i>	A	<i>TcCLB.510717.20</i>	TcTASV, subfamily A	3,48E-06	31,33	42,04
<i>TrMUCp72_27</i>	A	<i>TcCLB.504127.20</i>	hypothetical protein	4,11E-11	29,70	40,71
<i>TrMUCp75_194</i>	A	<i>TcCLB.510717.20</i>	TcTASV, subfamily A	2,33E-07	30,77	57,14
<i>TrMUCp80_32</i>	A	<i>TcCLB.510717.20</i>	TcTASV, subfamily A	9,33E-10	33,81	38,46
<i>TrMUCp82_17</i>	A	<i>TcCLB.506289.200</i>	hypothetical protein	4,80E-08	35,86	38,28

Query	Sub grupo	Gene ID	Produto gênico	E-Value	Identidade (%)	Cobertura (%)
<i>TrMUCp85_50</i>	A	<i>TcCLB.506289.200</i>	hypothetical protein	1,95E-08	29,72	59,76
<i>TrMUCp85_69</i>	A	<i>TcCLB.509147.40</i>	TcTASV, subfamily C	2,37E-08	27,32	99,39
<i>TrMUCp88_134</i>	A	<i>TcCLB.510717.20</i>	TcTASV, subfamily A	1,80E-04	28,48	43,40
<i>TrMUCp94_129</i>	A	<i>TcCLB.510717.20</i>	TcTASV, subfamily A	1,35E-05	32,84	37,54
<i>TrMUCp94_153</i>	A	<i>TcCLB.510717.20</i>	TcTASV, subfamily A	1,77E-08	35,06	39,23
<i>TrMUCp115_14</i>	B	<i>TcCLB.510717.20</i>	TcTASV, subfamily A	1,35E-06	30,56	51,08
<i>TrMUCp125_37</i>	B	<i>TcCLB.506799.30</i>	mucin-like glycoprotein	2,45E-07	27,06	56,47
<i>TrMUCp63_251</i>	B	<i>TcCLB.504127.20</i>	hypothetical protein	5,68E-11	27,22	88,66
<i>TrMUCp75_175</i>	B	<i>TcCLB.506799.30</i>	mucin-like glycoprotein	1,18E-06	27,91	57,33
<i>TrMUCp80_82</i>	B	<i>TcCLB.506799.30</i>	mucin-like glycoprotein	8,20E-08	28,57	56,71
<i>TrMUCp85_9</i>	B	<i>TcCLB.510717.20</i>	TcTASV, subfamily A	1,66E-06	44,16	28,14
<i>TrMUCp36_499</i>	C	<i>TcCLB.506289.94</i>	mucin-like glycoprotein	2,38E-09	30,63	93,01
<i>TrMUCp52_422</i>	C	<i>TcCLB.506289.94</i>	mucin-like glycoprotein	5,43E-07	26,48	82,78
<i>TrMUCp57_241</i>	C	<i>TcCLB.506289.94</i>	mucin-like glycoprotein	3,44E-08	27,63	93,27
<i>TrMUCp57_274</i>	C	<i>TcCLB.510717.20</i>	TcTASV, subfamily A	2,10E-10	31,09	67,68
<i>TrMUCp57_359</i>	C	<i>TcCLB.506289.200</i>	hypothetical protein	1,75E-11	39,74	41,46
<i>TrMUCp20_1225</i>	D	<i>TcCLB.510717.20</i>	TcTASV, subfamily A	1,33E-13	38,30	38,81
<i>TrMUCp20_1237</i>	D	<i>TcCLB.510717.20</i>	TcTASV, subfamily A	1,47E-13	37,23	38,74
<i>TrMUCp20_1279</i>	D	<i>TcCLB.510717.20</i>	TcTASV, subfamily A	3,96E-13	38,30	39,16
<i>TrMUCp20_1316</i>	D	<i>TcCLB.510717.20</i>	TcTASV, subfamily A	1,91E-12	35,56	36,75
<i>TrMUCp20_1328</i>	D	<i>TcCLB.510717.20</i>	TcTASV, subfamily A	6,42E-11	36,43	39,46
<i>TrMUCp20_1536</i>	D	<i>TcCLB.510717.20</i>	TcTASV, subfamily A	3,32E-09	33,09	38,32
<i>TrMUCp24_831</i>	D	<i>TcCLB.510717.20</i>	TcTASV, subfamily A	3,72E-10	48,00	20,55
<i>TrMUCp62_239</i>	D	<i>TcCLB.510717.20</i>	TcTASV, subfamily A	2,85E-09	33,10	39,05
<i>TrMUCp50_278</i>	E	<i>TcCLB.506759.80</i>	MASP	6,95E-04	57,50	6,44
<i>TrMUCp9_1729</i>	E	<i>TcCLB.508165.425</i>	mucin TcMUC (pseudo)	9,76E-06	61,29	6,55
<i>TrMUCp62_214</i>	F	<i>TcCLB.510717.20</i>	TcTASV, subfamily A	2,55E-07	37,76	30,60
<i>TrMUCp62_228</i>	F	<i>TcCLB.510717.20</i>	TcTASV, subfamily A	2,16E-07	37,76	30,82
<i>TrMUCp36_409</i>	F	<i>TcCLB.510717.20</i>	TcTASV, subfamily A	1,85E-07	34,62	23,57
<i>TrMUCp52_575</i>	F	<i>TcCLB.510717.20</i>	TcTASV, subfamily A	9,35E-13	38,39	24,41
<i>TrMUCp44_519</i>	F	<i>TcCLB.510717.20</i>	TcTASV, subfamily A	1,32E-18	40,58	31,83
<i>TrMUCp8_2860</i>	F	<i>TcCLB.510717.20</i>	TcTASV, subfamily A	4,62E-24	48,06	32,64
<i>TrMUCp24_647</i>	G	<i>TcCLB.511911.60</i>	trans-sialidase, Group III	5,05E-10	37,50	37,08
<i>TrMUCp36_1065</i>	G	<i>TcCLB.511911.60</i>	trans-sialidase, Group III	5,78E-08	34,32	34,77
<i>TrMUCp36_357</i>	G	<i>TcCLB.511911.60</i>	trans-sialidase, Group III	4,71E-10	33,93	37,08
<i>TrMUCp36_367</i>	G	<i>TcCLB.511911.60</i>	trans-sialidase, Group III	4,75E-10	33,93	37,08
<i>TrMUCp36_426</i>	G	<i>TcCLB.511911.60</i>	trans-sialidase, Group III	2,21E-07	33,54	28,14
<i>TrMUCp36_464</i>	G	<i>TcCLB.511911.60</i>	trans-sialidase, Group III	2,79E-08	32,93	32,79
<i>TrMUCp36_472</i>	G	<i>TcCLB.511911.60</i>	trans-sialidase, Group III	3,26E-08	33,54	32,79
<i>TrMUCp52_438</i>	G	<i>TcCLB.511911.60</i>	trans-sialidase, Group III	7,30E-09	34,15	34,06
<i>TrMUCp57_295</i>	G	<i>TcCLB.511911.60</i>	trans-sialidase, Group III	3,11E-09	34,15	30,45
<i>TrMUCp57_373</i>	G	<i>TcCLB.511911.60</i>	trans-sialidase, Group III	1,68E-08	33,93	31,80
<i>TrMUCp86_42</i>	G	<i>TcCLB.511911.60</i>	trans-sialidase, Group III	7,54E-09	34,76	28,66
<i>TrMUCp52_447</i>	G	<i>TcCLB.510717.20</i>	TcTASV, subfamily A	2,48E-07	31,75	39,86

<i>Query</i>	Sub grupo	Gene ID	Produto gênico	E-Value	Identidade (%)	Cobertura (%)
<i>TrMUCp52_674</i>	G	<i>TcCLB.510717.20</i>	TcTASV, subfamily A	2,40E-10	36,61	21,00
<i>TrMUCp24_652</i>	G	<i>TcCLB.504127.20</i>	hypothetical protein	3,88E-09	26,71	82,89
<i>TrMUCp52_461</i>	G	<i>TcCLB.504127.20</i>	hypothetical protein	3,68E-08	27,56	31,48
<i>TrMUCp35</i>	H	<i>TcCLB.511047.20</i>	mucin-like glycoprotein	1,21E-23	38,64	47,09
<i>TrMUCp24_673</i>	H	<i>TcCLB.506799.100</i>	mucin-like glycoprotein	1,95E-26	37,97	52,62
<i>TrMUCp5_3375</i>	H	<i>TcCLB.506799.100</i>	mucin-like glycoprotein	1,59E-06	26,09	40,16
<i>TrMUCp57_286</i>	H	<i>TcCLB.506799.30</i>	mucin-like glycoprotein	7,32E-26	36,98	47,47
<i>TrMUCp57_381</i>	H	<i>TcCLB.506799.30</i>	mucin-like glycoprotein	3,83E-27	38,33	48,16
<i>TrMUCp88_101</i>	H	<i>TcCLB.506799.20</i>	mucin-like glycoprotein	1,13E-26	39,29	45,56
<i>TrMUCp94_113</i>	H	<i>TcCLB.506799.20</i>	mucin-like glycoprotein	1,28E-26	39,13	50,00
<i>TrMUCp109_109</i>	I	<i>TcCLB.506289.130</i>	hypothetical protein	1,53E-21	33,19	76,07
<i>TrMUCp109_128</i>	I	<i>TcCLB.506289.200</i>	hypothetical protein	1,75E-14	36,73	84,29
<i>TrMUCp109_68</i>	I	<i>TcCLB.506289.130</i>	hypothetical protein	6,55E-25	35,32	74,92
<i>TrMUCp134_12</i>	I	<i>TcCLB.506289.130</i>	hypothetical protein	8,91E-23	33,62	76,07
<i>TrMUCp134_18</i>	I	<i>TcCLB.506289.200</i>	hypothetical protein	1,16E-13	36,73	84,29
<i>TrMUCp134_35</i>	I	<i>TcCLB.506289.200</i>	hypothetical protein	1,37E-13	35,84	84,29
<i>TrMUCp39_904</i>	I	<i>TcCLB.506289.240</i>	hypothetical protein	2,78E-26	38,35	60,29
<i>TrMUCp50_260</i>	I	<i>TcCLB.506291.20</i>	hypothetical protein	6,79E-18	30,61	83,94
<i>TrMUCp59_319</i>	I	<i>TcCLB.506291.20</i>	hypothetical protein	4,65E-19	30,26	92,70
<i>TrMUCp60_222</i>	I	<i>TcCLB.506289.200</i>	hypothetical protein	2,34E-14	36,73	84,29
<i>TrMUCp60_227</i>	I	<i>TcCLB.506289.200</i>	hypothetical protein	1,15E-13	36,28	84,29
<i>TrMUCp60_274</i>	I	<i>TcCLB.506289.200</i>	hypothetical protein	5,68E-15	36,73	84,29
<i>TrMUCp60_279</i>	I	<i>TcCLB.506289.200</i>	hypothetical protein	2,99E-13	36,28	84,29
<i>TrMUCp60_285</i>	I	<i>TcCLB.506289.200</i>	hypothetical protein	1,15E-13	36,28	84,29
<i>TrMUCp62_231</i>	I	<i>TcCLB.506289.200</i>	hypothetical protein	2,58E-14	36,28	84,29
<i>TrMUCp62_246</i>	I	<i>TcCLB.506289.130</i>	hypothetical protein	6,55E-25	35,32	74,92
<i>TrMUCp72_76</i>	G	sem resultados*				
<i>TrMUCp7_1510</i>	G	sem resultados*				
<i>TrMUCp61_54</i>	G	sem resultados*				
<i>TrMUCp21_1565</i>	G	sem resultados*				
<i>TrMUCp17_1988</i>	G	sem resultados*				
<i>TrMUCp65_262</i>	E	sem resultados*				
<i>TrMUCp52_710</i>	E	sem resultados*				
<i>TrMUCp72_76</i>	G	sem resultados*				
<i>TrMUCp7_1510</i>	G	sem resultados*				
<i>TrMUCp61_54</i>	G	sem resultados*				
<i>TrMUCp21_1565</i>	G	sem resultados*				

* Resultados por BLASTp não atendem aos requisitos mínimos de e-value < 1x10⁻⁴.

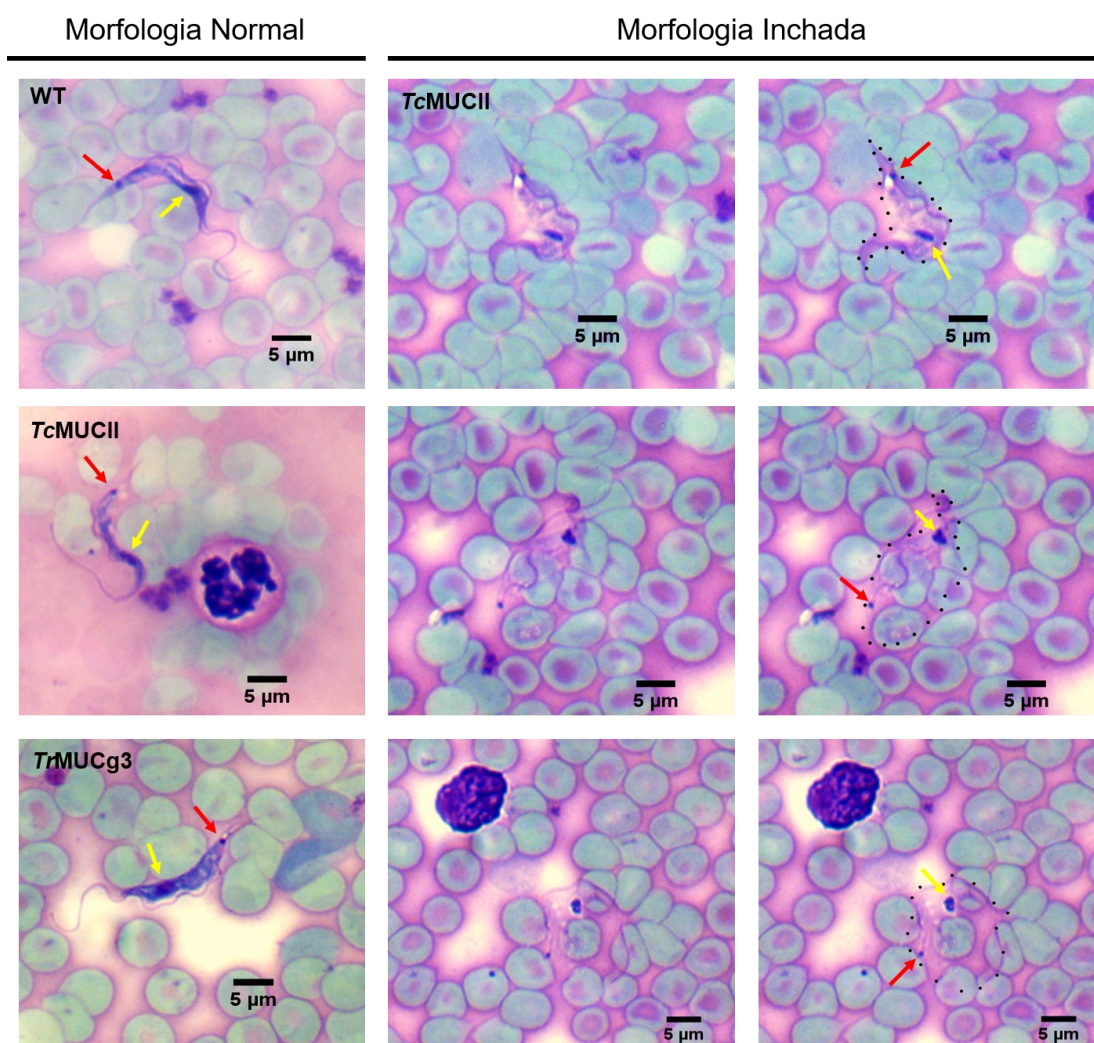
Fonte: Autora.

APÊNDICE C

Neste apêndice, são descritos resultados detalhados das análises de infecção de *T. rangeli* expressando as mucinas fusionadas à FlagGPI.

Figura 48 – Observação de morfologia lítica em tripomastigotas de *T. rangeli* durante a infecção em camundongos

Fotomicrografia de esfregaço sanguíneo de camundongo BALB/c infectado pelas linhagens Choachí expressando as mucinas fusionadas à FlagGPI em 4 d.p.i. Coloração de panótico. Morfologia normal: demonstra tripomastigotas sanguíneos das diferentes linhagens com forma filiforme e citoplasma basofílico intensamente corado semelhante à observada *in vitro*. Morfologia inchada: Tripomastigotas com citoplasma translúcido e distensão celular com preservação de flagelo, cinetoplasto (seta vermelha) e núcleo (seta amarela). Coluna à direita reprodução da imagem da coluna central com indicação da e organelas citadas e delimitação da membrana (pontilhado preto). O registro de tripomastigotas em processo de lise foi obtido de amostras da linhagem TcMUCII, entretanto não foi analisada a proporção da ocorrência entre as linhagens.



Fonte: Autora.

Tabela 13 – Análise leucocitária periférica em camundongos infectados por *T. rangeli* expressando mucinas fusionadas

4 d.p.i.	Controle		<i>Wild Type</i>		FlagGPI		TcMUCI		TcMUCII		TrMUCg3		TrMUCp35		Referência	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Linfócito	67,50	7,94	80,50	4,37	80,57	6,55	74,57	6,55	77,00	4,97	80,14	6,41	72,83	14,43	74,2	2,4
Monócito	7,25	4,57	6,17	1,17	4,29	2,29	6,57	2,94	6,86	4,38	4,86	2,73	5,33	1,75	3,10	0,6
Neutrófilo	24,50	4,51	13,33	4,97	14,71	7,16	18,14	6,34	15,14	3,53	14,86	5,79	21,50	14,32	21,6	1,7
Neutrófilo Bastão	0,25	0,50	0,00	0,00	0,43	0,79	0,57	0,79	0,43	0,79	0,14	0,38	0,33	0,82	ND	
Eosinófilo	0,50	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,14	0,38	0,57	0,53	0,00	0,00	0,00	0,00	0,7	0,4
Basófilo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,1	0,1

14 d.p.i.	Controle		<i>Wild Type</i>		FlagGPI		TcMUCI		TcMUCII		TrMUCg3		TrMUCp35		Referência	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Linfócito	69,50	9,19	69,50	6,56	64,00	6,32	55,40	13,15	58,40	8,65	66,20	7,12	59,50	8,70	74,2	2,4
Monócito	7,00	2,83	5,50	1,91	5,60	2,41	7,20	2,59	5,00	2,83	5,60	3,78	3,75	1,71	3,10	0,6
Neutrófilo	22,50	4,95	23,50	6,45	29,00	7,04	35,80	11,69	36,00	8,97	28,20	7,19	35,50	8,35	21,6	1,7
Neutrófilo Bastão	0,00	0,00	0,00	0,00	0,40	0,55	0,40	0,89	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,50	ND	
Eosinófilo	1,00	1,41	1,50	1,73	1,00	1,22	1,20	1,30	0,60	0,55	0,00	0,00	1,00	0,82	0,7	0,4
Basófilo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,1	0,1

Valores referência obtidos de Santos *et al.* (2016).

Fonte: Autora.

Tabela 14 – Resultados sumarizados da análise de histopatológica de camundongos infectados por *Trypanosoma rangeli* expressando mucinas fusionadas

		4 d.p.i.	14 d.p.i.
Adip. Escapular	Controle	Ausente*	Ausente
	<i>Wild Type</i>	Ausente*	Ausente
	TcMUCI	Ausente	Ausente
	TcMUCII	Infiltrado mononuclear multifocal leve ¹²	Ausente
	TrMUCg3	Ausente*	Ausente*
	TrMUCp35	Ausente	Ausente
	FlagGPI	Ausente*	Ausente*
Adip. Gonadal	Controle	Ausente*	Ausente
	<i>Wild Type</i>	Ausente	Ausente
	TcMUCI	Ausente	Ausente
	TcMUCII	Ausente	Ausente
	TrMUCg3	Ausente	Ausente
	TrMUCp35	Ausente*	Ausente*
	FlagGPI	Ausente	Ausente
Adip. Inguinal	Controle	Ausente*	Ausente
	<i>Wild Type</i>	Infiltrado misto, multifocal, leve*	Infiltrado mononuclear multifocal leve*
	TcMUCI	Infiltrado perivascular mononuclear, multifocal, moderado*	Infiltrado perivascular mononuclear, multifocal, moderado.
	TcMUCII	Infiltrado mononuclear, multifocal, leve ¹	Infiltrado mononuclear, multifocal, leve*
	TrMUCg3	Ausente	Infiltrado perivascular mononuclear multifocal
	TrMUCp35	Ausente	Ausente
FlagGPI	Infiltrado mononuclear multifocal leve ¹	Infiltrado mononuclear multifocal leve ¹	
Baço	Controle	Ausente	Ausente
	<i>Wild Type</i>	Hiperplasia polpa branca leve	Hiperplasia polpa branca leve
	TcMUCI	Ausente	Ausente
	TcMUCII	Ausente	Ausente
	TrMUCg3	Ausente	Hiperplasia polpa branca moderada
	TrMUCp35	Hiperplasia polpa branca leve	Hiperplasia polpa branca moderada
	FlagGPI	Hiperplasia polpa branca leve.	Hiperplasia polpa branca moderada
Esterno	Controle	Ausente	Ausente
	<i>Wild Type</i>	Ausente	Ausente
	TcMUCI	Infiltrado misto com predomínio de mononucleares, multifocal, leve	Infiltrado mononuclear, focal, leve*
	TcMUCII	Ausente	Ausente
	TrMUCg3	Infiltrado mononuclear multifocal leve	Infiltrado perivascular mononuclear multifocal leve*
	TrMUCp35	Infiltrado mononuclear multifocal moderado	Ausente
FlagGPI	Ausente*	Ausente*	

Mesentério	Controle	Ausente	Ausente
	<i>Wild Type</i>	Infiltrado mononuclear multifocal leve*	Ausente*
	TcMUCI	Infiltrado mononuclear multifocal leve*	Ausente*
	TcMUCII	Infiltrado mononuclear, focal, leve ¹²	Ausente
	TrMUCg3	Infiltrado mononuclear multifocal moderado	Ausente
	TrMUCp35	Ausente	Infiltrado mononuclear multifocal leve*
	FlagGPI	Infiltrado mononuclear multifocal leve.	Ausente
Pulmão	Controle	<i>Pleurite</i>	Ausente
	<i>Wild Type</i>	Ausente*	Ausente
	TcMUCI	Ausente*	Infiltrado mononuclear, multifocal, leve&
	TcMUCII	Infiltrado misto, multifocal, leve e pleurite supurativa leve*	Infiltrado mononuclear, multifocal, leve*
	TrMUCg3	Infiltrado misto, multifocal, leve e pleurite supurativa leve*	Ausente
	TrMUCp35	Ausente	Ausente
	FlagGPI	Ausente	Infiltrado mononuclear focal leve
Timo	Controle	Ausente	Ausente
	<i>Wild Type</i>	Ausente	Ausente
	TcMUCI	Infiltrado mononuclear, focal, leve*	Infiltrado mononuclear, focal, leve*
	TcMUCII	Ausente	Ausente
	TrMUCg3	Infiltrado linfocítico multifocal e interlobular, multifocal, leve	Infiltrado mononuclear multifocal leve
	TrMUCp35	Infiltrado mononuclear multifocal moderado	Ausente
	FlagGPI	Ausente	Ausente*

Indicações de discordância entre amostras de mesmo grupo: *variação entre ausência e qualquer tipo de avaliação de foco inflamatório; 1: variação entre infiltrado perivascular e intersticial; 2 – Variação entre classificação focal e multifocal.

Fonte: Autora.