



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa Interunidades de

Pós-graduação em Bioinformática



Thaiane Gomes Nascimento

**ANÁLISE DE ALTERAÇÕES DA EXPRESSÃO GÊNICA NO *TRYPANOSOMA*
CRUZI ASSOCIADAS À INFECÇÃO EM DIFERENTES TIPOS CELULARES:
PAPEL DAS PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE**

Belo Horizonte, Minas Gerais.

2025

Thaiane Gomes Nascimento

**ANÁLISE DE ALTERAÇÕES DA EXPRESSÃO GÊNICA NO *TRYPANOSOMA*
CRUZI ASSOCIADAS À INFECÇÃO EM DIFERENTES TIPOS CELULARES:
PAPEL DAS PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação em Bioinformática, da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de Mestre em Bioinformática.

Orientadora: Profa. Dra. Santuza M. Teixeira

Coorientadora: Profa. Dra. Daniella C. Bartholomeu

Belo Horizonte, Minas Gerais.

2025

043 Nascimento, Thaiane Gomes.
Análise de alterações da expressão gênica no Trypanosoma cruzi associadas à infecção em diferentes tipos celulares: papel das proteínas de superfície [manuscrito] / Thaiane Gomes Nascimento. – 2025.
114 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Santuza M. Teixeira. Coorientadora: Profa. Dra. Daniella C. Bartholomeu.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática.

1. Bioinformática. 2. Trypanosoma cruzi. 3. Proteínas de Membrana. I. Teixeira, Santuza Maria Ribeiro. II. Bartholomeu, Daniella Castanheira. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 573:004



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática da UFMG
Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
31270-901 - Belo Horizonte – MG
Endereço eletrônico: bioinfo@icb.ufmg.br 55 31 3409-2554



"Análise de Alterações da Expressão Gênica no *Trypanosoma cruzi* Associadas à Infecção em Diferentes Tipos Celulares: Papel das Proteínas de Superfície"

Thaiane Gomes Nascimento

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profª Santuza Maria Ribeiro Teixeira - Orientadora
Universidade Federal de Minas Gerais

Profª Daniella Castanheira Bartholomeu - Coorientadora
Universidade Federal de Minas Gerais

Profª Diana Bahia
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Gabriel da Rocha Fernandes
Fiocruz Minas - Instituto Rene Rachou

Belo Horizonte, 28 de agosto de 2025.



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática da UFMG

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Thaiane Gomes Nascimento

142/2025
entrada
2º/2023
CPF:
030.871.870-46

Às onze horas do dia **28 de agosto de 2025**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**Análise de Alterações da Expressão Gênica no *Trypanosoma cruzi* Associadas à Infecção em Diferentes Tipos Celulares: Papel das Proteínas de Superfície**", requisito para obtenção do grau de Mestre em **Bioinformática**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira	Universidade Federal de Minas Gerais	
Dra. Daniella Castanheira Bartholomeu	Universidade Federal de Minas Gerais	
Dra. Diana Bahia	Universidade Federal de Minas Gerais	
Dr. Gabriel da Rocha Fernandes	Fiocruz Minas - Instituto Rene Rachou	

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 28 de agosto de 2025.

Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira - Orientadora [Assinatura]

Dra. Daniella Castanheira Bartholomeu - Coorientadora [Assinatura]

Dr. Gabriel da Rocha Fernandes [Assinatura]

Dra. Diana Bahia [Assinatura]

AGRADECIMENTOS

Às professoras Santuza Teixeira e Daniella Bartholomeu pela oportunidade de trabalhar em seus laboratórios, pelos ensinamentos e confiança.

Ao Professor Sergio Schenkman e ao técnico Claudio Oliveira pelo fornecimento e ensinamentos sobre a linhagem de cardiomiócitos;

Ao técnico Seu Afonso Vianna pelos aprendizados e ajuda com experimentos com modelo animal.

Às colegas e colaboradoras Marina Batista e Amanda Albanaz que apoiaram e contribuíram com as suas experiências nos experimentos de bancada e análises de bioinformática.

Aos meus colegas do laboratório da professora Santuza pelo auxílio quando precisei, companheirismo, momentos de alegrias e descontração: Nailma Aprigio, Carlos Almeida, Renata Peixoto, Felipe Paladino, Ana Meira, Eduarda Carvalho, Kaio Rodrigues, Barbara Abreu e Marcelle.

Aos animais, que com respeito e gratidão, reconheço as suas contribuições e os seus valores.

Ao meu parceiro Luis Contreras por todo o suporte incondicional, amor, carinho, compreensão e companheirismo durante todo este período de mestrado.

A minha pet Luna por me fazer feliz e por sempre compartilhar a sua felicidade.

A minha família, minha mãe Angela Gomes, meu pai Edison Nascimento, minha tia Bete Nascimento por todo amor e por sempre me apoiarem em tudo.

Aos amigos de longa data e aos que fiz ao longo dessa caminhada, com os quais compartilhei alegrias e foram ombro amigo nos momentos mais difíceis

A todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho;

Ao programa de Pós-Graduação em Bioinformática da UFMG, em especial ao Tiago, pela disponibilidade e esforço para solucionar todos os problemas que apareceram durante o período do Mestrado.

As agências de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro e realização deste trabalho.

*“Você não é quem você pensa que é,
você é quem prática ser - Desconhecido”*

RESUMO

As proteínas de superfície de *Trypanosoma cruzi*, especialmente aquelas codificadas por famílias multigênicas denominadas Trans-sialidases (TS), MASP e Mucinas, são fundamentais para os processos de invasão, adesão, evasão do sistema imune e adaptação do parasito aos diferentes ambientes que enfrenta ao longo de seu ciclo de vida. As TS representam a maior dessas famílias, com mais de 1.400 cópias, das quais cerca de 16 sequências codificam TS com atividade enzimática (aTS), classificadas como TS-grupo I. Essas moléculas são expressas predominantemente na forma tripomastigota infectiva, constituem um dos principais mecanismos de interação com o hospedeiro e são alvos centrais para o entendimento da virulência e do tropismo tecidual de *T. cruzi*. Neste trabalho, foram conduzidos dois estudos complementares com o objetivo de investigar, sob diferentes abordagens, o papel dessas proteínas de superfície na infecção e adaptação de *T. cruzi*. No primeiro estudo, buscou-se compreender o impacto do nocaute de genes de TS por meio da análise transcriptômica comparativa entre parasitos da cepa CL Brener selvagem e nocaute para TS, visando identificar alterações na expressão gênica associadas à perda dessas proteínas. Os resultados revelaram que o nocaute para TS não causou alterações relevantes para o metabolismo do parasito (genes presentes no compartimento *core* do genoma), mas afetou genes do compartimento disruptivo, especialmente das famílias MASP e TS, sugerindo um possível mecanismo compensatório. Esses resultados evidenciam a capacidade que *T. cruzi* possui de remodelar o repertório de moléculas de superfície em resposta a diferentes alterações no ambiente e no genoma do parasito. No segundo estudo, buscou-se compreender se uma população de parasitos da cepa Y expressando Luciferase e mantida por consecutivas passagens em uma mesma linhagem celular teria alterada sua capacidade infectiva em outros tipos celulares e se isso ocorrer, quais seriam as alterações na expressão gênica. Para isso formas tripomastigotas derivadas de uma população cultivada em células MEF (fibroblasto) foram utilizadas na infecção de células LLCMK2 (epitelial) e AC16 (cardiomiócitos) por quinze passagens. Os resultados indicaram maior tropismo e eficiência invasiva da cepa Y em cardiomiócitos, além de uma tendência à adaptação progressiva ao tipo celular em que o parasito foi mantido. Em infecções *in vivo*, a cepa manteve sua capacidade infectiva independentemente da linhagem celular de origem. Em conjunto, os resultados destes estudos reforçam o papel central das proteínas de superfície na biologia de *T. cruzi*, não apenas como elementos estruturais de adesão ou invasão, mas como componentes cuja expressão regulável responde a pressões ambientais, participando ativamente dos mecanismos que garantem a sobrevivência, disseminação e patogenicidade do parasito nos diferentes contextos celulares e hospedeiros.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, proteínas de superfície, Trans-sialidases, tropismo e adaptação.

ABSTRACT

The surface proteins of *Trypanosoma cruzi*, especially those encoded by multigene families called Trans-sialidases (TS), MASPs, and Mucins, are essential for the parasite's invasion, adhesion, immune system evasion, and adaptation to the diverse environments that it encounters throughout its life cycle. TS represent the largest multigenic family in the *T. cruzi* genome with over 1400 gene copies, in which around 16 sequences encode enzymatically active TS (aTS), classified as group I-TS. These molecules are expressed predominantly in the infective trypomastigote form, constitute one of the main mechanisms of host interaction and are central targets for understanding the virulence and tissue tropism of *T. cruzi*. In this work, two complementary studies were conducted to investigate, using different approaches, the role of these surface proteins in *T. cruzi* infection and adaptation. The first study was intended to understand the impact of Trans-sialidase gene knockout through comparative transcriptomic analysis between *wild-type* and TS-knockout CL Brener parasites, aiming to identify changes in gene expression associated with the loss of these proteins. The results revealed that the TS knockout did not cause significant changes in the parasite's metabolism (genes present in the core compartment of the genome), but affected genes in the disruptive compartment, especially the MASP and TS families, suggesting a possible compensatory mechanism. These results highlight *T. cruzi*'s ability to remodel its repertoire of surface molecules in response to various changes in the environment and the parasite's genome. The second study aimed to understand whether a population of Y strain parasites expressing Luciferase and maintained for consecutive passages in the same cell line would have altered its infectivity in other cell types, and if so, what the changes in gene expression would be. To this end, trypomastigote forms derived from a population cultured in MEF (fibroblast) cells were used to infect LLCMK2 (epithelial) and AC16 (cardiomyocyte) cells for fifteen passages. The results indicated greater tropism and invasive efficiency of the Y strain in cardiomyocytes, in addition to a tendency toward progressive adaptation to the cell type in which the parasite was maintained. In *in vivo* infections, the strain maintained its infective capacity regardless of the cell lineage of origin. Taken together, the results of these studies reinforce the central role of surface proteins in the biology of *T. cruzi*, not only as structural elements of adhesion or invasion, but also as components whose regulatable expression responds to environmental pressures, actively participating in the mechanisms that ensure the survival, dissemination, and pathogenicity of the parasite in different cellular contexts and hosts.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, surface proteins, Trans-sialidases, tropism, and adaptation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Visão geral da distribuição geográfica das DTUs de <i>Trypanosoma cruzi</i> . .	19
Figura 2. Esquema representativo do ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
Figura 3. Transcrição e processamento de mRNA.	23
Figura 4. Representação da compartimentalização do genoma de <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
Figura 5. Alteração na expressão de genes de proteínas de superfície MASP's	29
Figura 6. Classificação funcional e estrutural dos grupos de <i>trans</i> -sialidases de <i>Trypanosoma cruzi</i>	31
Figura 7. Expressão das <i>trans</i> -sialidases e capacidade de infecção dos parasitos <i>knockout</i> de aTS.	33
Figura 8. Fluxograma representativo da técnica de RNA-Seq.	36
Figura 9. Representação esquemática da técnica para nocaute e os genes aTS alvos.	45
Figura 10. Fluxograma do processo de clonagem para obtenção de parasitos expressando Luciferase.	51
Figura 11. Representação microscópica das células MEF, LLCMK2 e AC16 utilizadas neste estudo.	53
Figura 12. Esquema experimental do cultivo e coleta de parasitos da cepa Y Luciferase de <i>Trypanosoma cruzi</i> infectando diferentes linhagens celulares.	54
Figura 13. Mapa de calor Q-score da qualidade das reads produzidas pelo sequenciamento.	60
Figura 14. Gráficos de qualidade por base de <i>reads</i> brutas oriundos de bibliotecas de cDNA de tripomastigotas WT.	63
Figura 15. Gráficos de qualidade por base de reads brutas oriundos de bibliotecas de cDNA de tripomastigotas aTS-KØ (KO7).	65
Figura 16. Análise de Componente Principal (PCA).	68
Figura 17. Visualização de <i>reads</i> mapeadas em genes aTS alvos para nocaute.	75
Figura 18. Gráfico de vulcão dos genes diferencialmente expressos entre os grupos tripomastigotas KO7 e WT para análise do compartimento <i>core</i>	77
Figura 19. Gráfico de vulcão dos genes diferencialmente expressos entre os grupos tripomastigotas KO7 e WT para análise do compartimento disruptivo.	79
Figura 20. Histograma representando o número de genes diferencialmente expressos aumentados nas principais famílias multigênicas em tripomastigotas nocautes para aTS (KO7) quando comparado ao grupo de tripomastigotas WT.	81
Figura 21. Mapa representativo do vetor pROCK.	87
Figura 22. Geração e seleção de parasitos cepa Y <i>Trypanosoma cruzi</i> transfectados com o vetor pROCK Red-Shifted Luciferase.	89
Figura 23. Caracterização dos parasitos cepa Y expressando Luciferase.	90
Figura 24. Ensaio de liberação de tripomastigotas de células infectadas ao longo do tempo.	91
Figura 25. Taxa de infecção e multiplicação de amastigotas em células MEF com diferentes MOIs.	92
Figura 26. Comparação dos ensaios de invasão <i>in vitro</i> entre os dois grupos tripomastigotas da cepa Y de <i>T. cruzi</i> expressando Luciferase mantidos em duas diferentes linhagens celulares por passagens consecutivas.	93

Figura 27. Ensaaios de invasão <i>in vitro</i> com tripomastigotas da cepa Y de <i>T. cruzi</i> expressando Luciferase, liberados das passagens P5 e P15.	94
Figura 28. Curva de parasitemia dos camundongos infectados com tripomastigotas de cepa Y e adaptados nas células LLCMK2 e AC16.	95
Figura 29. Infecção experimental em modelo animal.	96
Figura 30. Eletroferogramas e valores de RNI obtidos pelo Bionalyzer.	97
Figura 31. Análise da ausência de DNA nas amostras de RNA extraídos pós-tratamento	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo da classificação e suas principais características das famílias TcMUC e TcSMUG.....	28
Tabela 2. Planejamento para análises de expressão diferencial dos compartimentos core e disruptivo da cepa CL Brener de <i>T. cruzi</i>	47
Tabela 3. Condições estabelecidas para Reação em Cadeira da Polimerase (PCR) para confirmar a ausência de DNA nas amostras.	58
Tabela 4. Rendimento das extrações de RNA para estudo do perfil da expressão gênica em parasitos nocautes para aTS.....	59
Tabela 5. Resultado da filtragem das <i>reads</i> por qualidade efetuado pela ferramenta Fastp	60
Tabela 6. Resultado dos dois mapeamentos das bibliotecas.....	67
Tabela 7. Mapeamento de reads nas regiões catalíticas dos genes de <i>Trans-sialidases</i> ativas (aTS) alvos de nocaute em <i>Trypanosoma cruzi</i>	69
Tabela 8. Gene com expressão aumentada em tripomastigotas nocaute para aTS em comparação com tripomastigotas <i>wild-type</i>	77
Tabela 9. Genes com expressão diminuída em tripomastigotas nocaute para aTS em comparação com tripomastigotas <i>wild-type</i>	78
Tabela 10. Quantidade de genes das principais famílias multigênicas com expressão aumentada e diminuída em tripomastigotas nocaute para aTS em comparação com tripomastigotas <i>wild-type</i>	80
Tabela 11. Genes com expressão aumentada em tripomastigotas nocaute para aTS em comparação com tripomastigotas <i>wild-type</i>	82
Tabela 12. Genes com expressão diminuída em tripomastigotas nocaute para aTS em comparação com tripomastigotas <i>wild-type</i>	86
Tabela 13. Ensaio de multiplicação de amastigotas em células MEF.	92
Tabela 14. Rendimento das extrações de RNA para estudo da adaptação da cepa Y de <i>T. cruzi</i> expressando Luciferase.	97
Tabela 15. Rendimento das extrações de DNA para estudo da adaptação da cepa Y de <i>T. cruzi</i> expressando Luciferase.	99

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AC16 - Linhagem celular de cardiomiócitos humanos
aTS - Trans-sialidases ativas
B.O.D - do inglês, *Biochemical Oxygen Demand*
BAM - do inglês, *Binary Alignment/Map*
BSA - Albumina de soro bovino
cDNA - DNA complementar
CRISPR - do inglês, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*
DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole
DGF-1 - do inglês, *Disperse Gene Family*
DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA - Ácido desoxirribonucléico
DTU - do inglês, *Discret typing units*
EPI - Epimastigotas
GFF - do inglês, *General Feature Format*
GPI - Glicosilfosfatidilinositol
Esmo - Haplótipo Esmeraldo-like
HeLa - Henrietta Lacks
HEPES - ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanossulfônico
HTML - do inglês, Hypertext Markup Language
LIT - do inglês, *Liver Infusion Tryptose*
LLCMK2 - Linhagem celular de células epiteliais do rim de macaco Rhesus
Log2FC - Log2FoldChange
MASP - do inglês, *Mucin-associated surface protein*
MEF - do inglês, *Mouse embryonic fibroblasts*
mL - Mililitro
mM - Milimolar
MOI - do inglês, *Multiplicity of infection*
mRNA - RNA mensageiro
NCBI - National Center for Biotechnology Information
ng - Nanogramas
NGS - Sequenciamento de nova geração

Non-Esmo - haplótipo não-Esmeraldo like

pb - pares de base

PBS +/- - do inglês, *Phosphate Buffered Saline with Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺*

PCA - do inglês, *Principal Component Analysis*

PCR - Reação em cadeia da polimerase

pH - Potencial hidrogeniônico

RHS - do inglês, *Retrotransposon hot spot*

RNA - Ácido ribonucleico

RNI - Valores de integridade de RNA

rpm - rotações por minuto

RPMI - Roswell Park Memorial Institute

SAM - do inglês, *Sequence Alignment/Map*

SAPA - do inglês, *Shed Acute Phase Antigen*

SFB - Soro fetal bovino

SL - do inglês, *Spliced Leader*

TCT - Tripomastigotas de cultura de tecidos

TritypDB - TritypDataBase

TS - Trans-sialidases

uL - Microlitro

UTR - do inglês, *Untranslated Regions*

WGS - do inglês, *Whole-Genome Shotgun*

WT - do inglês, *Wild-type*

Y Luciferase - cepa Y de *Trypanosoma cruzi* expressando Luciferase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i> e a Doença de Chagas	18
1.2. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> , transmissão e estágios da doença	19
1.3. Estudos de genômica em <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
1.4. O processo de expressão gênica em <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
1.5. As superfamílias multigênicas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	24
1.5.1. A Família das Mucinas em <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
1.5.2. A Família das MASPs em <i>Trypanosoma cruzi</i>	28
1.5.3. A Família das <i>trans</i> -sialidases em <i>Trypanosoma cruzi</i>	30
2. OBJETIVOS	34
2.1. Objetivo geral	34
2.2. Objetivos específicos	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1. MATERIAIS E MÉTODOS PARA ESTUDO DAS ALTERAÇÕES NO PERFIL DA EXPRESSÃO GÊNICA EM PARASITOS NOCAUTES PARA UMA FAMÍLIA DE SUPERFÍCIE	35
3.1.1. Preparo do RNA de tripomastigotas da cepa CL Brener de <i>Trypanosoma cruzi</i> para sequenciamento	35
3.1.2. Construção de bibliotecas e Sequenciamento	35
3.1.3. Análise da qualidade das <i>reads</i>	37
3.1.4. Trimagem e filtragem de <i>reads</i> com bases de baixa qualidade	37
3.1.5. Mapeamento das <i>reads</i>	38
3.1.6. Verificação de genes alvos nocaute para aTS	40
3.1.7. Contagem das <i>reads</i> por gene	45
3.1.8. Análise das contagens e expressão diferencial	46
3.2. MATERIAIS E MÉTODOS PARA ESTUDO DA ADAPTAÇÃO À DIFERENTES TIPOS CELULARES DA CEPA Y DE <i>Trypanosoma cruzi</i> EXPRESSANDO LUCIFERASE	48
3.2.1. Obtenção dos parasitos cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> - Coleta e hemocultura	48
3.2.2. Obtenção de uma linhagem de parasitos cepa Y expressando Luciferase	48
3.2.3. Transformação de bactérias	49
3.2.4. PCR de colônia	49
3.2.5. Digestões enzimáticas	49
3.2.6. Transfecção de formas epimastigotas cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> e seleção dos parasitos transfectados	50

3.2.7. Curva de crescimento das formas epimastigotas cepa Y	51
3.2.8. Ensaio de liberação de tripomastigotas cepa Y expressando Luciferase no sobrenadante (meio de cultura)	51
3.2.9. Ensaio de multiplicação de amastigotas intracelular cepa Y expressando Luciferase	52
3.2.10. Linhagens celulares e cultivo de células utilizadas neste estudo	52
3.2.11. Manutenção das células cultivadas <i>in vitro</i>	53
3.2.12. Infecções experimentais <i>in vitro</i> e realização das passagens com tripomastigotas da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> expressando Luciferase	53
3.2.13. Infecções experimentais <i>in vivo</i> com tripomastigotas da cepa Y expressando Luciferase	55
3.2.14. Ensaios de invasão com dois grupos parasitos formas tripomastigotas da cepa Y expressando Luciferase	55
3.2.15. Análises de resultados e construção de gráficos para estudo das proteínas de superfície no processo de adaptação dos parasitos cepa Y expressando Luciferase	56
3.2.16. Obtenção de ácidos nucleicos de parasitos cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> expressando Luciferase	57
3.2.17. PCR das amostras de RNA extraído pós-tratamento com o kit TURBO DNA-free	57
4. RESULTADOS	59
4.1. ALTERAÇÕES NO PERFIL DA EXPRESSÃO GÊNICA EM PARASITOS NOCAUTES PARA UMA FAMÍLIA DE SUPERFÍCIE	59
4.1.1. Preparo do RNA para construção de bibliotecas para sequenciamento do transcriptoma	59
4.1.2. Sequenciamento: Qualidade e número de <i>reads</i>	59
4.1.3. Mapeamentos e contagem de <i>reads</i> mapeadas no genoma do clone CL Brener de <i>Trypanosoma cruzi</i> – haplótipo Esmeraldo e genoma completo	66
4.1.4. Análise da heterogeneidade entre as bibliotecas sequenciadas	67
4.1.5. Análise dos genes da família <i>trans</i> -sialidases (grupo I) alvos do nocaute	68
4.1.6. Análise de expressão diferencial dos genes	76
4.1.7. Análises realizadas para o compartimento <i>core</i>	76
4.1.8. Análises realizadas para o compartimento disruptivo	78
4.2 ADAPTAÇÃO À DIFERENTES TIPOS CELULARES DA CEPA Y DE <i>Trypanosoma cruzi</i> EXPRESSANDO LUCIFERASE	87
4.2.1. Preparo do vetor pROCK e geração de uma linhagem de parasitos cepa Y expressando Luciferase	87
4.2.2. Definição do modelo experimental para infecção com parasitos cepa Y Luciferase em diferentes linhagens celulares	90
4.2.3. Ensaios de invasão para estudo da adaptação da cepa Y Luciferase em diferentes linhagens celulares <i>in vitro</i>	92

4.2.4. Ensaios de infecção <i>in vivo</i> utilizando tripomastigotas da cepa Y Luciferase derivadas de passagens sucessivas <i>in vitro</i> em diferentes células hospedeiras.....	94
4.2.5. Preparo do RNA para construção de bibliotecas para sequenciamento do transcriptoma	96
4.2.6. Preparo do DNA para construção de bibliotecas para sequenciamento do genoma.....	98
5. DISCUSSÃO	100
6. CONCLUSÕES.....	106
7. PERSPECTIVAS.....	107
7.1. Perspectivas para o estudo das alterações no perfil da expressão gênica em parasitos nocautes para uma família de superfície	107
7.2. Perspectivas para o estudo da adaptação à diferentes tipos celulares da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> expressando Luciferase	107
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	108

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas

Trypanosoma cruzi é um protozoário flagelado pertencente à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae. Apresenta distintas formas evolutivas e é caracterizado pela presença do cinetoplasto, uma estrutura mitocondrial composta por moléculas DNA denominada maxicírculos e minicírculos. Este parasito é o agente etiológico da doença de Chagas, uma enfermidade negligenciada e endêmica na América Latina. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a doença afeta aproximadamente 6-7 milhões de pessoas no mundo, com cerca de 75 milhões em risco de contrair a infecção e mais de 10 mil mortes registradas por ano (Brener, 1973; “World Health Organization (WHO)”, 2024).

Esta espécie apresenta elevada plasticidade genética o que a torna capaz de se adaptar a diferentes ambientes durante seu ciclo de vida (por exemplo, triatomíneos e diferentes hospedeiros vertebrados) (Marcili et al., 2009). Além disso, alguns estudos indicam que essa alta variabilidade pode conferir ao parasito a capacidade de invadir uma ampla gama de tipos celulares, bem como de apresentar diferentes tropismos teciduais, comprometendo diferentes tecidos e causando megas-síndromes em decorrência da doença (Tonelli et al., 2010, De Pablos; Osuna, 2012 e Zingales; Bartholomeu, 2022). Com o objetivo de agrupar os parasitos por diferentes marcadores genéticos e possivelmente distintas características fenotípicas, tais como: virulência, tropismo tecidual, resistência a drogas e adaptação a diferentes espécies de vetores (Zingales, 2018), as cepas de *T. cruzi* foram classificadas em 6 subgrupos ou DTUs (*discrete typing units*), denominados de *T. cruzi* I (TcI) a *T. cruzi* VI (TcVI), sendo os subgrupos TcV e TcVI compostos por cepas híbridas oriundas das cepas parentais TcII e TcIII (Silvestrini et al., 2024a; Zingales et al., 2012) (Figura 1).

As cepas Y, pertencente à linhagem TcII (Nussenzweig, 1953), e CL Brener, da linhagem híbrida TcVI (Brener, 1963), estão entre as cepas mais empregadas em estudos sobre a Doença de Chagas. Isso se deve à sua capacidade de representar distintos aspectos biológicos e patogênicos de *T. cruzi*, permitindo a análise de processos como invasão celular, virulência, manifestações clínicas e tropismo tecidual (Silvestrini et al., 2024b).

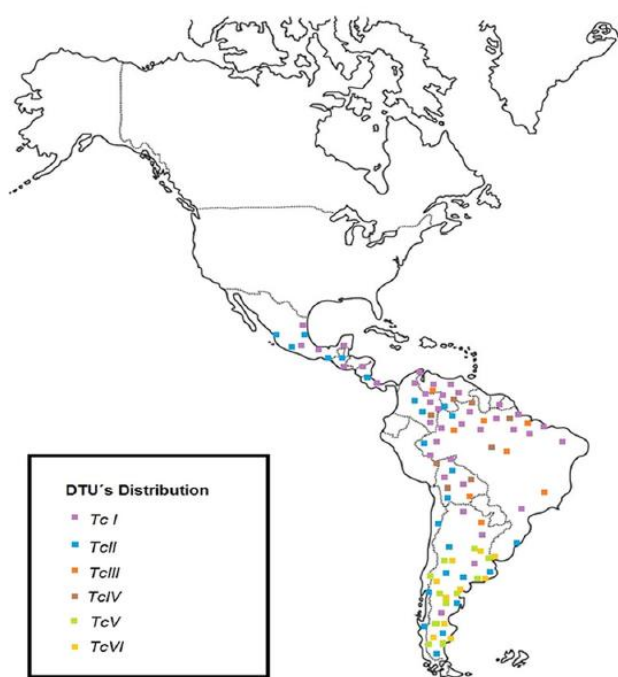


Figura 1. Visão geral da distribuição geográfica das DTUs de *Trypanosoma cruzi*.
Retirado de: Jiménez et al., 2019.

1.2. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*, transmissão e estágios da doença

O ciclo de vida de *T. cruzi* envolve múltiplas transformações morfológicas envolvendo hospedeiros vertebrados e invertebrados. É caracterizado por quatro principais formas evolutivas: epimastigota, tripomastigota metacíclica, amastigota e tripomastigota sanguínea (Figura 2). Essas formas ocorrem em diferentes estágios do ciclo, que alternam entre fases replicativas e infectivas. As formas epimastigota (no intestino do vetor) e amastigota (intracelular no hospedeiro vertebrado) são replicativas. Já a forma tripomastigota é infectiva, mas não se replica, e pode estar presente em dois momentos distintos do ciclo: como tripomastigota metacíclica, presente no intestino posterior do inseto vetor, e como tripomastigota sanguínea, circulando no sangue do hospedeiro vertebrado (Brenner, 1963). Se considerar que o ciclo começa com o inseto triatomíneo realizando o repasto sanguíneo do hospedeiro mamífero infectado com tripomastigotas da corrente sanguínea, as tripomastigotas sanguíneas ingeridas transformam-se em epimastigotas no intestino médio do inseto, onde se replicam intensamente. Depois disso, no intestino posterior do inseto hospedeiro, as epimastigotas diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicas que são eliminadas com as fezes. Quando o inseto vetor se alimentar de sangue de um novo hospedeiro não infectado, ele defeca numa área próxima ao ponto de introdução da

peça bucal. A infecção geralmente ocorre por internalização de tripomastigotas metacíclicas excretadas no ponto de ruptura da pele. Uma vez dentro do hospedeiro mamífero, as formas tripomastigotas metacíclicas invadem as células do hospedeiro no local da internalização e se transformam na forma amastigota. Após a conclusão de um ciclo replicativo como amastigotas intracelulares, elas diferenciam-se novamente em tripomastigotas sanguíneas, que rompem a célula do hospedeiro mamífero e são capazes de infectar outras células ou permanecer na corrente sanguínea (Figura 2) (Brener, 1973, 1963).

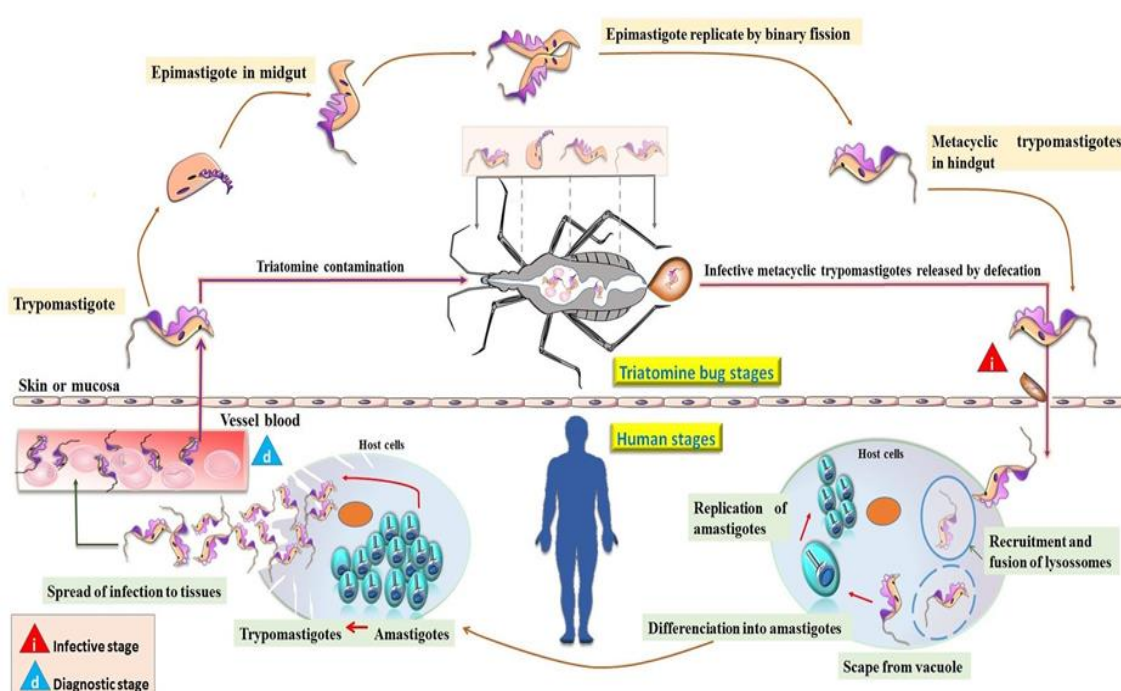


Figura 2. Esquema representativo do ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.

Retirado de: Lidani et al., 2017.

A transmissão de *T. cruzi* é iniciada por insetos vetores (triatomíneos) que defecam próximo à ferida após o repasto sanguíneo, liberando tripomastigotas metacíclicas que penetram na pele e alcançam a corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado. Esses parasitos invadem diferentes tipos celulares, formam o vacúolo parasitóforo, do qual escapam para diferenciar-se em amastigotas que se replicam no citosol por fissão binária. Após a ruptura da célula, as formas amastigotas se transformam novamente em tripomastigotas, disseminando a infecção para outros tecidos ou sendo ingeridos por novos vetores durante o repasto sanguíneo. No intestino médio do inseto, as formas tripomastigotas se transformam em epimastigotas, que se multiplicam e migram para o intestino posterior, onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas, completando o ciclo de vida do parasito.

Após a infecção por *T. cruzi*, a transmissão da doença de Chagas ainda pode ocorrer por diversas vias, como na gestação, por transfusão de sangue, transplante de órgãos, acidentes de laboratório, ingestão de comidas e bebidas contaminadas com o inseto vetor ou com as fezes de triatomíneos contaminados (Pereira et al.,

2009). Clinicamente, a doença pode ser dividida em duas fases, aguda e crônica. A fase aguda tem início, aproximadamente, de 2 a 3 semanas após a infecção por *T. cruzi* e costuma ser assintomática podendo haver sintomas parecidos aos de uma gripe como: febre, mialgia e cefaleia. Esta fase é caracterizada por elevada parasitemia e em casos de transmissão vetorial, em que a porta de entrada do parasito no hospedeiro vertebrado ocorre pela conjuntiva, geralmente é encontrado o sinal de Romanã, e quando a infecção inicia-se pela pele, é possível observar o chagoma de inoculação. Dois ou três meses após a infecção, a infecção evolui para a fase crônica da doença que é representada pelo baixo número de parasitos na corrente sanguínea e baixos níveis de parasitismo tecidual. Cerca de 30% a 40% dos indivíduos infectados apresentam sintomas como manifestações cardíacas ou gastrointestinais, enquanto a maioria permanece assintomática (Coura, 2014; Pérez-Molina; Molina, 2018). As razões pelas quais apenas parte dos infectados evolui para a forma clínica da doença ainda não estão totalmente esclarecidas (Junqueira et al., 2010), mas fatores genéticos do parasito e do hospedeiro certamente desempenham um papel relevante.

1.3. Estudos de genômica em *Trypanosoma cruzi*

O primeiro projeto genoma de *T. cruzi* faz parte de uma grande iniciativa conhecida como “os TriTryp” e CL Brener foi a cepa referência, tendo seu genoma comparado com outros dois tripamanossomatídeos de relevância clínica, *Leishmania major* e *Trypanosoma brucei*, agentes etiológicos das doenças Leishmaniose e doença do sono, respectivamente (El-Sayed et al., 2005a). Estes sequenciamentos foram realizados por meio da técnica *Whole Genome Shotgun* (WGS) e possibilitou a identificação de dois haplótipos parentais no genoma de *T. cruzi*, onde foram encontrados mais de 10mil genes em cada haplótipo. Estes haplótipos receberam o nome de Esmeraldo-like (oriundo da linhagem parental TcII) e Non-Esmeraldo like (oriundo da linhagem parental TcIII). Além disso, foram descritos um total de 22.570 genes codificadores de proteínas para os dois haplótipos, nos quais 6.159 genes correspondem ao haplótipo Non-Esmeraldo e 6.043 ao outro haplótipo. Outras 10.368 sequências analisadas não puderam ser atribuídas a nenhum dos dois haplótipos. (El-Sayed et al., 2005a).

Os dois haplótipos apresentam um alto nível de sintonia e conservação, principalmente em clusters gênicos que codificam genes “*housekeeping*”, alcançando

uma similaridade de sequência de até 97,8%. Contudo, em clusters gênicos que codificam proteínas de superfície e retroelementos, os quais superam quase 50% do genoma do parasito (El-Sayed et al., 2005a), há perda de sintenia entre os haplótipos, sugerindo que estas regiões estão sujeitas a intensa pressão para diversificação (Bartholomeu et al., 2009a). Entre os isolados de *T. cruzi*, observam-se variações genômicas significativas, como diferenças no número de cromossomos, na quantidade de cópias gênicas e em regiões cromossômicas específicas. Muitas dessas alterações resultam de expansões gênicas e podem impactar diretamente o perfil de expressão gênica do parasito (Reis-Cunha; Valdivia; Bartholomeu, 2018). Estudos recentes com comparações entre linhagens filogeneticamente distantes de *T. cruzi* confirmaram essa expressiva variação no número de cópias gênicas, especialmente em regiões complexas e altamente repetitivas, como as famílias multigênicas (Callejas-Hernández et al., 2018; De Pablos; Osuna, 2012b). Essas diferenças genômicas podem explicar a notável variabilidade fenotípica observada entre as linhagens de *T. cruzi*, que se refletem em diferentes comportamentos *in vitro* e *in vivo* (Jiménez et al., 2019; Lewis et al., 2015; Silvestrini et al., 2024b; Zingales; Bartholomeu, 2022).

Essa alta heterogeneidade representa um grande desafio para o desenvolvimento de vacinas, novos medicamentos e completa compreensão da doença. Apesar dessas dificuldades, o sequenciamento de diferentes genomas de *T. cruzi* tem sido um avanço importante para a compreensão da biologia e complexidade do parasito (Callejas-Hernández et al., 2018). Atualmente, estão disponíveis os genomas completos das linhagens Dm28c, JRC14, Sylvio X10, B7 e G (TcI), Esmeraldo e Y (TcII), 231 (TcIII), Bug2148 (TcV), Tulahuen e CL Brener Esmeraldo-like e Non-Esmeraldo-like (TcVI), mas ainda não há genomas completos da linhagem TcIV. No entanto, limitações tecnológicas ainda impedem o sequenciamento direto de cromossomos inteiros, sendo necessário montar milhões de fragmentos relativamente curtos em *contigs* e, quando possível, em *scaffolds*. Além disso, persistem questões genômicas não totalmente resolvidas, como as causas das diferenças no tamanho do genoma entre cepas, o polimorfismo de cariótipo mesmo dentro da mesma DTU, e a abundância de repetições em *tandem*, aspectos que podem estar relacionados com a fisiopatologia da doença.

1.4. O processo de expressão gênica em *Trypanosoma cruzi*

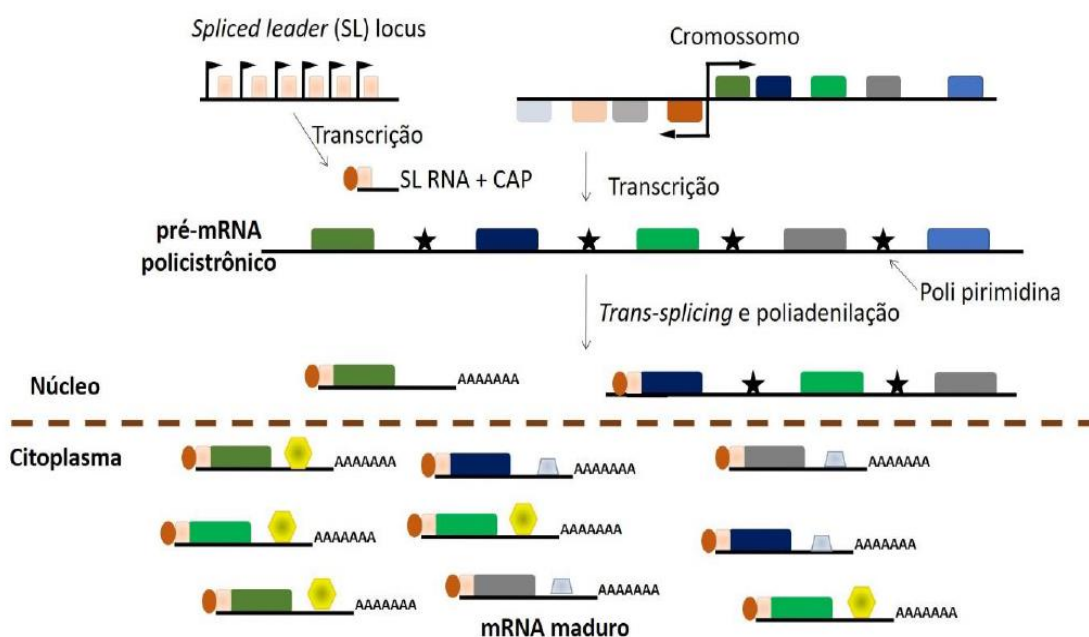


Figura 3. Transcrição e processamento de mRNA.

Retirado de: Araújo; Teixeira, 2011.

Diferentemente da maioria dos eucariotos, a transcrição gênica nos tripanossomatídeos ocorre de forma policistônica (Teixeira; DaRocha, 2003), com genes codificadores de proteínas organizados em longas unidades transcritas pela RNA Pol II (Caro et al., 2006).

Os genes não possuem regiões promotoras para regular sua expressão, sendo essa regulação feita principalmente em nível pós-transcricional, com um papel fundamental das regiões 3' UTR. Os principais mecanismos envolvidos na regulação incluem: a estabilidade ou degradação dos transcritos, duplicação gênica, modulação de histonas e eficiência na tradução (Palenchar; Bellofatto, 2006). Assim, embora os genes de um mesmo policistron sejam cotranscritos, observam-se diferenças em sua expressão nos diferentes estágios do ciclo de vida ou em diferentes condições de crescimento (Kolev et al., 2010; Minning et al., 2009). Devido à ausência de íntrons nos tripanossomatídeos, os pré-RNAs mensageiros (pré-mRNAs) policistônicos são formados pelas sequências codificadoras dos genes, com suas respectivas regiões não traduzidas 5' e 3' (UTR), que se separam de outros genes através de pequenas sequências intergênicas (Caro et al., 2005).

Depois de transcritos, os RNA mensageiros (mRNAs) policistônicos são clivados no núcleo, para produção dos mRNAs monocistônicos. Associada a essa

clivagem, ocorre o processamento destes mRNAs por meio de dois processos: *trans-splicing* e poliadenilação: *Trans-splicing* adiciona uma sequência com cerca de 40-50 nucleotídeos (denominada de mini-éxon ou *splice leader* (SL) capeada de 7-metilguanosina na extremidade 5' de praticamente todos os mRNAs. Já na extremidade 3' é adicionada uma sequência poli(A), por um processo denominado poliadenilação (HUMMEL et al., 2000; Araújo; Teixeira, 2011). Esse processo consiste na adição de vários nucleotídeos de adenina, conhecido como cauda poli-A que são adicionados à extremidade 3' dando origem aos mRNAs maduros. Contudo, o tradicional sinal de poliadenilação AAUAAA presente em eucariotos, não é encontrado em tripanossomatídeos, que se caracteriza por conter apenas a região SL e a cauda poli-A. Em particular, em *T. cruzi*, o que parece ser o sinal mais provável de início da poliadenilação, é o aparecimento de um único nucleotídeo, a citosina (Figura 3) (Callejas-Hernández et al., 2019; Hendriks; Matthews, 2005).

Os dois processos (*trans-splicing* e poliadenilação) não ocorrem de forma independente, ou seja, estudos indicam que a adição da cauda poli A é comandada pela posição do sítio aceptor da sequência SL *downstream* (LeBowitz et al., 1993). Após o processamento, os mRNAs maduros se acumulam em diferentes níveis no citoplasma que, uma vez estando lá, podem ser sequestrados para a maquinaria de tradução para síntese de proteínas ou armazenados em grânulos de RNA, onde serão mantidos em silêncio ou direcionados para degradação (Björk; Wieslander, 2017; Gerstberger; Hafner; Tuschl, 2014).

1.5. As superfamílias multigênicas de *Trypanosoma cruzi*

Com o sequenciamento do genoma dos *Trityps* foi observado que a sintonia entre esses genomas em certos pontos é inconsistente, sugerindo a existência de genes e sequências espécie-específicas que, em *T. cruzi* podem estar presentes nas grandes ilhas não sintênicas (> 600 kb) de genes que codificam proteínas de superfície. A partir dessa constatação, surgiu a proposta de que o genoma de *T. cruzi* seja compartimentalizado em duas regiões, designadas de regiões *core* e disruptiva (Berná et al., 2018) (Figura 4). No compartimento *core* encontram-se os genes hipotéticos e genes conservados, os quais são sintênicos com os genomas dos demais tripanossomatídeos. Já o compartimento disruptivo engloba as grandes famílias multigênicas codificadoras de proteínas de superfície MASPs, *trans-*

sialidases (TS), mucinas e proteases gp63, Retrotransposon hot spot (RHS), proteína *Disperse Gene Family* (DGF-1) e retroelementos (Bianca Zingales, 2022). Outra característica comum dessas superfamílias é a presença de muitos pseudogenes que podem contribuir para a diversidade do repertório de sequências por meio de eventos de recombinação (Martin P. Vazquez, 2007).

Diversos estudos apontam que estas moléculas de superfície são o resultado do ambiente ao qual os parasitos são expostos durante o seu ciclo de vida. Portanto, evidências mostram que *T. cruzi* exibe várias modificações ao se mover de um hospedeiro para outro (Pech-Canul; Monteón; Solís-Oviedo, 2017). Entretanto, este comportamento não parece ser exclusivo apenas desta espécie, outros parasitos, como *Plasmodium* e *Trypanosoma brucei*, que para escapar do sistema imunológico do hospedeiro e se adaptar ao ambiente hostil ao qual lhes é imposto, desenvolveram mecanismos sofisticados de evasão do sistema imune, expondo uma quantidade variável de antígenos de superfície. Ao contrário de *T. cruzi*, em que os genes que codificam antígenos de superfície podem ser internos nos cromossomos, nesses outros organismos estão localizados em regiões subteloméricas dos megacromossomos, e parece indicar que essa localização específica, facilita a troca e a expressão de genes, bem como a geração de novas variantes (Cano, 2001, Barry et al., 2003).

Recentemente, o estudo de (Oliveira et al., 2022a), utilizou *T. cruzi* e células deficientes para LAMP (proteínas de membranas de lisossomos) e demonstrou que, depois de realizar apenas uma passagem por células de tecido *in vitro*, o parasito apresentou alterações nas moléculas de superfície. Isso indica que o ambiente intracelular pode ter relação com a adaptação de *T. cruzi* em invadir diferentes tipos celulares. Este resultado sugere que o estágio tripomastigota de *T. cruzi* é rico em fatores de virulência e a diversidade de expressão de isoformas desses fatores desempenham um papel central durante o processo de invasão da célula hospedeira e imunomodulação pelo parasito (Nakayasu et al., 2012).

Atualmente, a pesquisa sobre genes do compartimento disruptivo e sobre moléculas de superfície tem registrado avanços significativos, impulsionada pelo uso de tecnologias de alto rendimento. Essas ferramentas são essenciais para esclarecer o desenvolvimento e a evolução das famílias multigênicas no complexo genoma de *T. cruzi*. Nesse contexto, este trabalho tem como objetivo investigar os mecanismos moleculares do parasito relacionados a interação parasito-hospedeiro e ao tropismo

tecidual, por meio de infecções *in vitro* com duas populações de parasitos cepa Y expressando Luciferase mantidas por consecutivas passagens em diferentes linhagens celulares e de monitoramentos da infecção *in vivo* através de ensaios de bioluminescência.

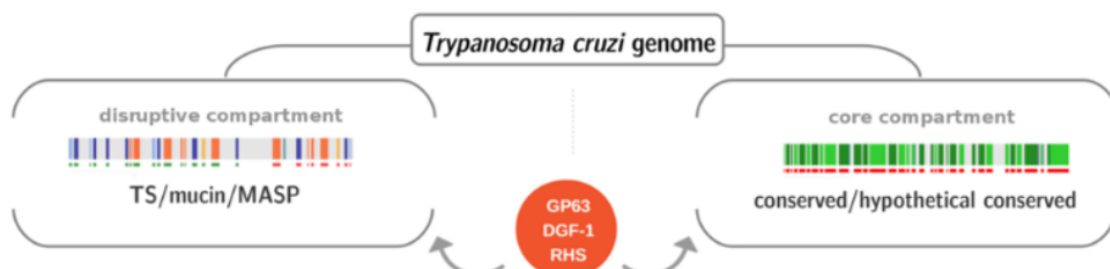


Figura 4. Representação da compartimentalização do genoma de *Trypanosoma cruzi*.
Retirado de: BERNÁ et al., 2018.

Dentre as famílias de proteínas de superfície mais abundantes, estão:

1.5.1. A Família das Mucinas em *Trypanosoma cruzi*

A superfície de *T. cruzi* é revestida por uma densa camada de glicoproteínas do tipo mucina (TcMUC), as quais representam os componentes mais abundantes em sua superfície, com cerca de 2×10^6 cópias por parasito. Na cepa CL Brener constituem a terceira família de genes mais expandida em seu genoma, com aproximadamente 863 genes identificados (incluindo 201 pseudogenes) (Acosta-Serrano, 2001; El-Sayed et al., 2005a)

As mucinas desempenham funções essenciais na proteção do parasito contra os mecanismos de defesa do vetor e do hospedeiro, além de mediar a ancoragem e invasão de células e tecidos específicos (Buscaglia et al., 2006a).

Evidências mostram que quando na forma epimastigota, são as mucinas que formam uma barreira protetora contra enzimas digestivas e seus resíduos de ácido siálico são biologicamente insignificantes, sendo removidos no intestino do vetor (Buscaglia et al., 2006). Em contrapartida, nos estágios tripomastigota e amastigota, estudos indicam que a sialilação das mucinas confere carga negativa ao parasito, protegendo-o contra a resposta imune humoral (Acosta-Serrano, 2001). Além disso, a exposição de epítomos Gal(α 1,3)Gal nas mucinas também pode ativar a resposta imune, mas a carga negativa do ácido siálico neutraliza a lise mediada por

complemento, o protegendo assim, da resposta imune do hospedeiro (Almeida et al., 1994).

As TcMUC de *T. cruzi* são caracterizadas por sua alta taxa de O-glicosilação (representando até 60% do peso molecular total) e por estarem ancoradas à membrana plasmática por meio de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Buscaglia et al., 2006a). Todos os genes TcMUC codificam proteínas com um peptídeo sinal, sítios de ligação para âncoras GPI e uma região central hipervariável (HV) rica em resíduos de serina/treonina (Ser/Thr), que servem como sítios de ligação para N-acetilglucosamina (GlcNAc) (Buscaglia et al., 2006a).

Essas proteínas são classificadas em duas principais famílias: TcMUC (subdividida em grupos TcMUC I, TcMUC II e TcMUC III) e TcSMUG (subdividida em (S), do inglês *small*, e (L) do inglês, *large*) (Buscaglia et al., 2006a) (Buscaglia et al., 2006a; Di Noia et al., 2000). A classificação dessa família e suas principais características podem ser visualizadas na Tabela 1.

Classe	Característica	Referência
TcMUC I	Apresenta repetições em tandem com uma sequência consenso de aminoácidos (motivo) T ₈ KP ₂ , torna um alvo suscetível para a via de glicosilação em <i>T. cruzi</i> . Os membros deste grupo estão majoritariamente presentes na forma amastigota do parasito.	Buscaglia et al., 2006.
TcMUC II	Os genes presentes neste grupo codificam proteínas que compartilham as mesmas extremidades N e C-terminais que os membros do grupo TcMUC I, porém, sem o motivo T ₈ KP ₂ . Ao invés disso, possui regiões centrais ricas em Thr, Ser e Pro, tornando um alvo preferencial para adição de ácido siálico. Importante ressaltar que foi encontrada uma maior quantidade de genes (membros deste grupo) na membrana da forma tripomastigota de <i>T. cruzi</i> .	(Di Noia et al., 1996, 2002; Lantos et al., 2016)
TcMUC III	Representado também pelo termo de antígeno de superfície pequena tripomastigota (TSSA), são glicoproteínas que possuem cerca de 20 kDa e que, <i>in vivo</i> , é expressa em mamíferos.	(Barreto-Bergter; B Vermelho, 2010; De Marchi et al., 2011)
TcSMUG	Os membros deste grupo codificam um quadro de leitura aberto muito pequeno contendo um peptídeo sinal putativo na porção N-terminal e um sinal âncora GPI na porção C-terminal. Esta família de proteínas é dividida em dois grupos: (S) e (L), de acordo com o tamanho do mRNA codificado. Eles são os principais aceptores de ácido siálico na superfície do parasito pelas <i>trans</i> -sialidases. Este grupo S é encontrado nas formas epimastigota e tripomastigota metacíclica.	(Nakayasu et al., 2009; Schenkman et al., 1993)

Tabela 1. Resumo da classificação e suas principais características das famílias TcMUC e TcSMUG.

1.5.2. A Família das MASPs em *Trypanosoma cruzi*

A família MASP (*Mucin-Associated Surface Proteins*) é a segunda maior família de genes no genoma de *T. cruzi* CL Brener, compreendendo 1.377 genes e 433 pseudogenes distribuídos em arranjos genômicos de até 600 kb (Bartholomeu et al., 2009b; El-Sayed et al., 2005a). Seu nome deriva da localização próxima aos genes das mucinas (TcMUC II), com as quais compartilham similaridade estrutural, embora não sequencial (Bartholomeu et al., 2009b; El-Sayed et al., 2005b). Os MASPs são proteínas de superfície ancoradas por GPI, expressas preferencialmente nas formas tripomastigotas, mas também detectáveis em amastigotas e epimastigotas (Atwood et al., 2005; Bayer-Santos et al., 2013).

Cada membro da família MASP possui domínios conservados nas extremidades N- e C-terminais, incluindo um peptídeo sinal e um sítio de ancoragem GPI; região central HV e repertório diverso de motivos repetitivos (27% deles ricos em ácido glutâmico) e sítios de O-glicosilação (em 70% dos casos predominantemente em resíduos de treonina) (Bartholomeu et al., 2009b).

Outro fato adicional, é que a diversidade dos MASPs é gerada por mecanismos únicos, como a formação de quimeras (Fusões com domínios de mucinas ou TS), (El-Sayed et al., 2005b); retrotransposição: (inserção nas extremidades conservadas dos genes MASP, como por exemplo elementos móveis TcTREZO,) (Souza et al., 2007) e recombinação homóloga (facilitada por UTRs altamente conservadas (Bartholomeu et al., 2009b).

Os membros da família também são liberados no meio extracelular (Bartholomeu et al., 2009b). A sua expressão é altamente variável entre os isolados de diferentes DTUs e até mesmo, dentro de uma mesma população clonal (Azuaje; Ramirez; Da Silveira, 2007). Além disso, no estudo de (De Pablos et al., 2011), eles reforçam que membros dessa família parecem exercer um papel crítico na invasão celular, uma vez que a utilização de anticorpos anti-MASP52 direcionados à sua região catalítica demonstrou reduzir a capacidade de infecção do parasito, sugerindo sua importância nesse processo.

Interessantemente, em um estudo anterior realizado pelo nosso grupo, em que analisou a expressão de diferentes membros da família MASP, foi visto que em tripomastigotas sanguíneas provenientes de diferentes passagens em camundongos apresentou uma expressão distinta de genes do que aquelas tripomastigotas que foram mantidas em diferentes tecidos *in vitro* (Figura 5.A). Também *in vitro*, neste mesmo estudo mostrou que se alteram a expressão de genes com sucessivas passagens do parasito em diferentes tipos celulares (Figura 5.B). Devido a este achado, gerou-se a especulação, de que existem mudanças no repertório de peptídeos de proteínas de superfície durante uma infecção que podem contribuir para uma invasão celular aprimorada e mecanismos de evasão das respostas imunes do hospedeiro durante uma infecção na fase aguda da doença de Chagas (Dos Santos et al., 2012).

Embora estudos demonstrem que essas famílias multigênicas participam de processos essenciais na interação parasito-hospedeiro, como a invasão celular, ainda não há evidências sobre o papel de membros ou motivos específicos na capacidade do parasito de infectar diferentes tipos de células nucleadas do hospedeiro vertebrado.

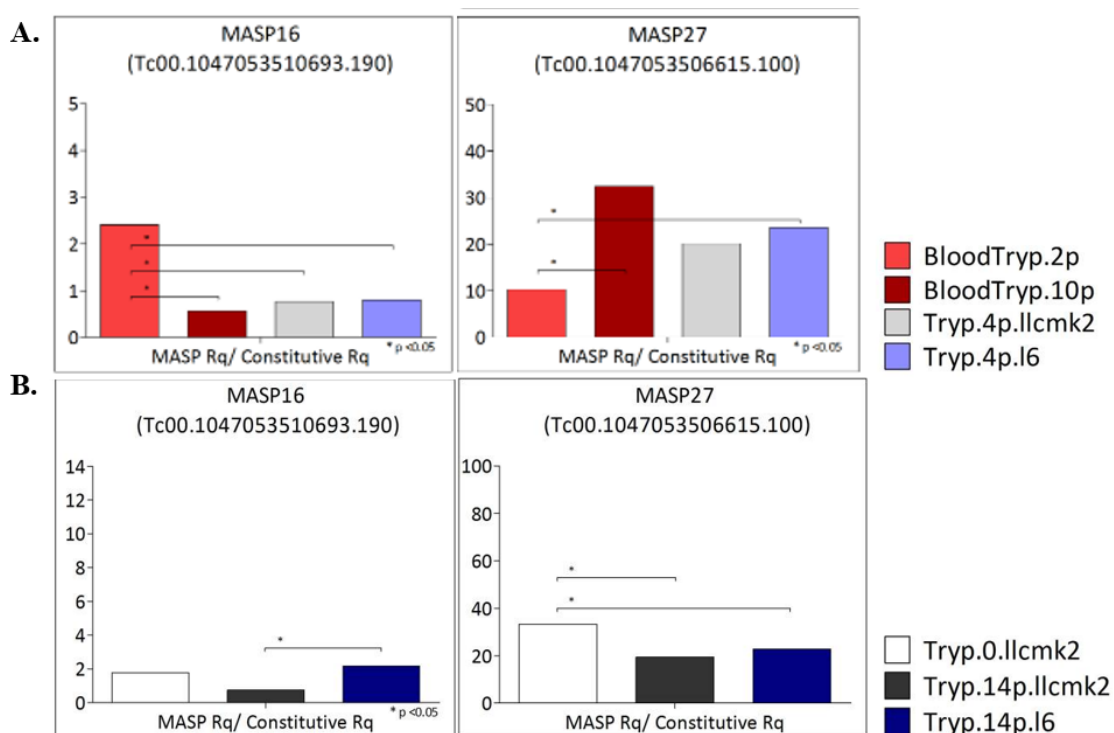


Figura 5. Alteração na expressão de genes de proteínas de superfície MASPs
(A) Análise de expressão por qRT-PCR de dois genes MASP em formas tripomastigotas de corrente sanguínea de passagens sequenciais e de tripomastigotas de cultura após a etapa *in vivo*. **(B)** Análise de expressão por qRT-PCR de dois genes MASP em tripomastigotas de cultura derivados de tipos celulares distintos. (Adaptado de: (Dos Santos et al., 2012).

Tryp.0.lcmk2: tripomastigotas de cultura antes da infecção dos dois tipos celulares; Tryp.14p.lcmk2: tripomastigotas de cultura derivados de células LLCMK2 após 14 passagens; Tryp.14p.l6: tripomastigotas de cultura derivados de células L6 após 14 passagens; BloodTryp.2p: forma-se na corrente sanguínea após 2 passagens; BloodTryp.10p: forma-se na corrente sanguínea após 10 passagens; Tryp.4p.lcmk2: cultiva tripomastigotas após etapa *in vivo* derivada de células LLCMK2 após 4 passagens; Tryp.4p.l6: cultiva tripomastigotas após etapa *in vivo* derivada de células L6 após 4 passagens. Retirado de: Dos Santos et al., 2012.

1.5.3. A Família das *trans*-sialidases em *Trypanosoma cruzi*

Um total, 1.430 genes do genoma de CL Brener codificam proteínas TS que constituem a maior família proteica do parasito, sendo a principal família de genes envolvida com processos de interação parasito-hospedeiro. Estas proteínas apresentam notável diversidade entre seus membros, sendo que cerca de 50% são pseudogenes (Buschiazzi et al., 2002; El-Sayed et al., 2005a; Frasch, 2000; Freitas et al., 2011). Esses genes codificam proteínas ancoradas por GPI, expressas em toda a superfície do parasito (corpo celular, flagelo e bolsa flagelar) (Frevert; Schenkman; Nussenzweig, 1992). A expansão dessa família está em parte associada à localização de alguns membros próxima a telômeros, onde a pressão imunológica favorece a diversificação genética (Kim et al., 2005).

T. cruzi é incapaz de sintetizar ácido siálico e depende das TS para a sua aquisição a partir do hospedeiro. Outra função exercida pelas TS, é a de atividade neuraminidase, que embora represente apenas cerca de 5% da atividade total da enzima TS (Pereira, 1983), ela pode contribuir para internalização do parasito por meio da remoção de ácido siálico de moléculas da célula hospedeira (Nardy et al., 2016).

Em um estudo realizado pelo nosso grupo (Freitas et al., 2011) foi demonstrado que as TS possuem alta diversidade entre seus membros, revelando uma complexidade estrutural e funcional maior do que se conhecia anteriormente. Neste estudo realizado com a cepa CL Brener, elas foram reclassificadas em oito diferentes subgrupos (I a VIII), considerando os diferentes aspectos dessas proteínas. Essa classificação leva em consideração a presença de motivos conservados, como Asp-box (SxDxGxTW), repetições SAPA, VTV/FLY (VTVxNVxLYNR) e FRIP (xRxP), bem como a presença ou ausência de atividade enzimática e a localização cromossômica (Figura 6). Dentre esses subgrupos, apenas TS do grupo I possuem atividade catalítica (aTS), fazendo com que a ligação do ácido siálico induza uma mudança estrutural,

reposicionando os resíduos Tyr119 e Tyr342/Leu36 para ativar a enzima (Amaya et al., 2004; Buschiazzo et al., 2002b; Freitas et al., 2011). Por outro lado, proteínas estruturalmente semelhantes, mas que não induzem nenhuma alteração estrutural e nem apresentam atividade transferase ou de neuraminidase, são denominadas como TS inativas (iTTS) (Oppezzo et al., 2011).

Apesar de serem consideradas um fator de virulência essencial, as múltiplas funções dessas proteínas na infecção ainda não foram completamente elucidadas, em grande parte porque a existência de diversas cópias de genes aTS complica o seu estudo.

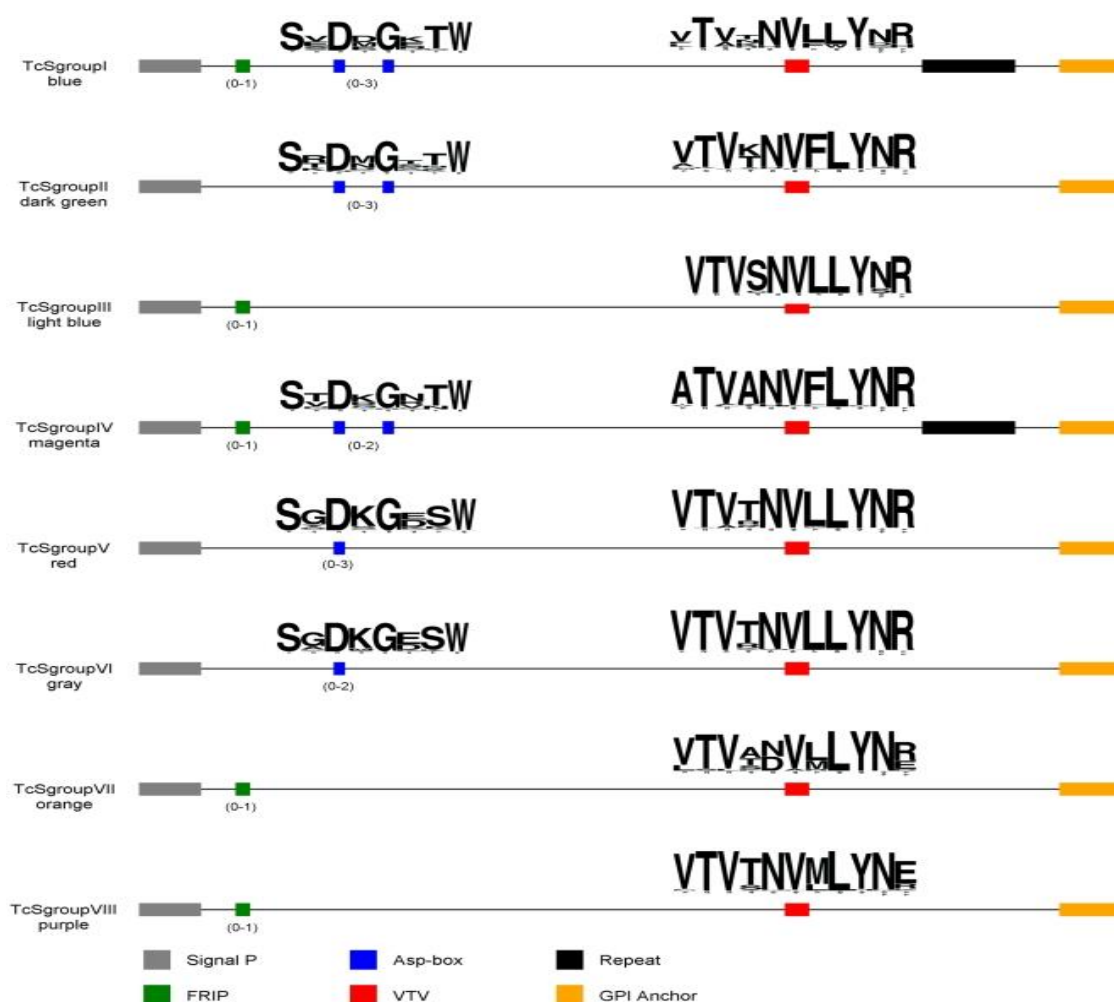


Figura 6. Classificação funcional e estrutural dos grupos de *trans*-sialidases de *Trypanosoma cruzi*.
Retirado de: Freitas et al., 2011.

Com o objetivo de buscar um melhor entendimento sobre a função das *trans*-sialidases durante uma infecção por *T. cruzi*, nosso grupo realizou um trabalho recente

(da Bulde Caldas et al. 2022), onde foi utilizado a tecnologia de manipulação genética CRISPR-Cas9 para geração de parasitos nocautes para todos os genes codificadores de *Trans*-Sialidades ativas (aTS-KØ). Os nocautes foram gerados utilizando o clone CL Brener, que expressa de forma constitutiva a proteína SpCas9 (Burle-Caldas et al., 2018). A inserção dessa proteína foi feita com o plasmídeo pROCK-HIGRO, o qual se integra no *locus* da β -tubulina (DaRocha et al., 2004). Utilizando dados obtidos por meio do sequenciamento nas plataformas PacBio e Illumina e montagem do genoma diplóide do clone CL Brener (Bartholomeu et al., dados não publicados). Identificou-se um total de 16 sequências de aTS no genoma de *CL Brener*. Em seguida, foram projetados dois RNAs guias (sgRNAs) direcionados a uma região conservada de 210 nucleotídeos, contendo uma tirosina na posição 342 presente em todas as sequências de aTS. Dessa forma, todas as 16 sequências identificadas tornaram-se alvo desses sgRNAs (Burle-Caldas et al., 2022a). O reparo pós-clivagem foi mediado por recombinação homóloga (RH), utilizando como molde um oligonucleotídeo de fita simples contendo: um sítio de restrição (*EcoRV*), uma sequência de M13, três códons de parada e duas regiões homólogas para as aTS com 25 nucleotídeos complementares à região alvo. Para a transfecção, utilizaram-se parasitos expressando Cas9, juntamente com os sgRNAs e o molde para RH. Por fim, foi realizada a transfecção, os parasitos foram clonados, dois clones de parasitos foram denominados (TS KO3 e TS KO7) e tiveram os seus DNAs extraídos e genotipados para confirmação da interrupção gênica nas sequências de aTS.

Após esse processo, foram realizados os experimentos que demonstraram que, embora os parasitos nocautes para aTS fossem capazes de infectar células *in vitro*, eles tinham uma capacidade reduzida de diferenciação de amastigota para tripomastigota e de evadir-se da célula infectada. Consequentemente, a capacidade de infectar novas células é reduzida e os mutantes para aTS perderam a capacidade de causar infecção *in vivo* (Figura 7).

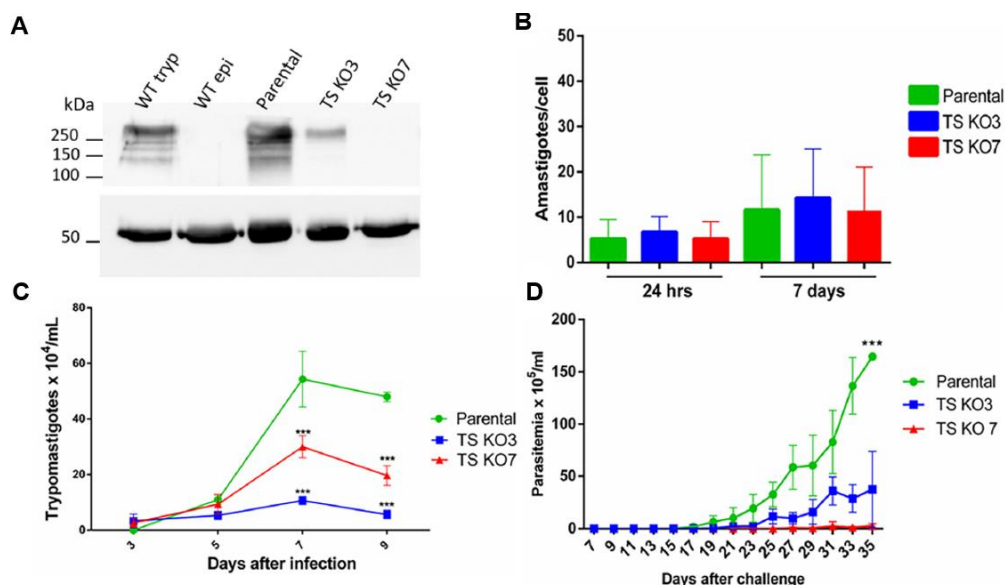


Figura 7. Expressão das *trans*-sialidases e capacidade de infecção dos parasitos *knockout* de aTS.

A. Extratos de proteínas totais de: WT trypan: tripomastigotas WT, WT epi: epimastigotas WT, tripomastigotas da linhagem parental: parental, TS KO3: tripomastigotas nocautes para aTS parcial e TS KO7: tripomastigotas nocaute para aTS total. Foram separados em géis de poliácridamida a 7,5%, transferidos para membranas de nitrocelulose e incubados com anticorpo anti-TS. O painel inferior mostra a incubação da membrana com anticorpo antitubulina como controle de carga. **B.** número de amastigotas por células infectadas em 24 horas ou 7 dias após a infecção. **C.** O número de tripomastigotas liberados no sobrenadante também foi acompanhado até 9 dias após a infecção das células LLCMK2. Para infecção foram utilizadas tripomastigotas da linhagem celular parental e das duas linhagens celulares mutantes. **D.** Infecção em modelo animal: camundongos IFN- γ KO foram infectados com tripomastigotas da linhagem celular parental ou das linhagens celulares mutantes TS KO3 ou TS KO7 e durante 35 dias a parasitemia foi monitorada. Retirado de: Burle-Caldas et al., 2022.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar os mecanismos moleculares de *Trypanossoma cruzi* associados ao tropismo tecidual e interação parasito-hospedeiro em condições de cultivo distintas e por meio de análises transcriptômicas comparativas dos parasitos.

2.2. Objetivos específicos

1. Comparar os perfis transcriptômicos de formas tripomastigostas de *T. cruzi* derivadas de células infectadas com linhagens selvagem e nocautes para os genes que codificam *trans*-sialidases ativas.
2. Gerar uma linhagem da cepa Y de *T. cruzi* expressando Luciferase para monitorar a infecção com o parasito no hospedeiro *in vivo*;
3. Realizar passagens dos parasitos em diferentes linhagens celulares (cardíacas e epiteliais) *in vitro* e avaliar possíveis diferenças na capacidade de invasão resultantes do processo de adaptação dos parasitos à diferentes tipos celulares.
4. Investigar em modelo animal o comportamento e tropismo tecidual adquirido por *T. cruzi* após passagens consecutivas nas diferentes células hospedeiras (cardíacas e epiteliais *in vitro*);
5. Obtenção e análise da qualidade do RNA extraídos das formas amastigotas e tripomastigostas da cepa Y de *T. cruzi* expressando Luciferase adaptados em diferentes linhagens celulares (cardíacas e epiteliais) para preparo de bibliotecas e sequenciamento.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS E MÉTODOS PARA ESTUDO DAS ALTERAÇÕES NO PERFIL DA EXPRESSÃO GÊNICA EM PARASITOS NOCAUTES PARA UMA FAMÍLIA DE SUPERFÍCIE

3.1.1. Preparo do RNA de tripomastigotas da cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi* para sequenciamento

As células HeLa foram expandidas e posteriormente infectadas com parasitos tripomastigotas da cepa CL Brener das linhagens WT e nocaute para aTS com uma alta MOI 40:1 parasitos/ célula. Após a ruptura das células infectadas, o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 4000 rpm por 10 min. e mantido em estufa *overnight* para separação das formas TCTs das formas amastigotas, como também separação dos debris celulares residuais. Uma vez obtido *pellets* com quantidades suficientes de tripomastigotas para posterior extração de RNA.

Amostras de RNAs foram extraídas em triplicata dos parasitos *T. cruzi*, cepa CL Brener, formas tripomastigotas *wild-type* (WT) e tripomastigotas nocautes para aTS (KO7). As amostras foram identificadas conforme a sua natureza; triplicatas de tripomastigotas WT: ("1_TCT_WT_1", "2_TCT_WT_2", "3_TCT_WT_3") e triplicatas de tripomastigotas KO7, nocautes para aTS: ("4_TCT_KO7_1", "5_TCT_KO7_2", "6_TCT_KO7_3").

3.1.2. Construção de bibliotecas e Sequenciamento

Para a construção das bibliotecas de cDNA foi utilizado o kit Illumina® Stranded mRNA Prep. Como ilustrado na Figura 8 (Preparação e geração de biblioteca), por meio de esferas magnéticas de oligo-dT que atuam sobre o RNA total, foi realizada a purificação e a captura de somente as moléculas de mRNA contendo caudas poli-A. Após a purificação do mRNA, ele foi fragmentado em cerca de 300 bases de comprimento. Utilizando estes fragmentos como cadeia molde, a primeira cadeia de DNA complementar (cDNA) foi sintetizada utilizando a transcriptase reversa e *random primers*. Em seguida, a cadeia molde de RNA foi removida e a segunda cadeia de

cDNA foi sintetizada (cadeia de cDNA substituta). Para garantir que apenas a fita correspondente ao RNA original fosse amplificada, o dTTP é substituído pelo dUTP para atingir a especificidade da primeira fita. Também, bases de adenina (A) e timina (T) foram adicionadas às extremidades dos fragmentos para que fosse possível a ligação aos adaptadores. Uma vez que, os fragmentos se ligaram aos adaptadores, estes fragmentos foram purificados e amplificados, prontos para serem sequenciados. A biblioteca resultante foi carregada na *flow cell*, onde os adaptadores presentes na biblioteca se hibridizaram à adaptadores complementares nesta *flow cell*, dando início ao processo de sequenciamento.

As amostras de RNA foram enviadas para a plataforma de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) do Instituto René Rachou, da Fundação Oswaldo Cruz em Belo Horizonte, Minas Gerais. A plataforma e o kit para sequenciamento utilizados foram a NextSeq 2000, Kit de reagentes NextSeq™ 1000/2000 P1 XLEAP-SBS™ (*pair-end*, 2x150 ciclos). Na instituição também foram realizados os serviços de conferência de integridade dos RNAs, construção de bibliotecas e o sequenciamento.

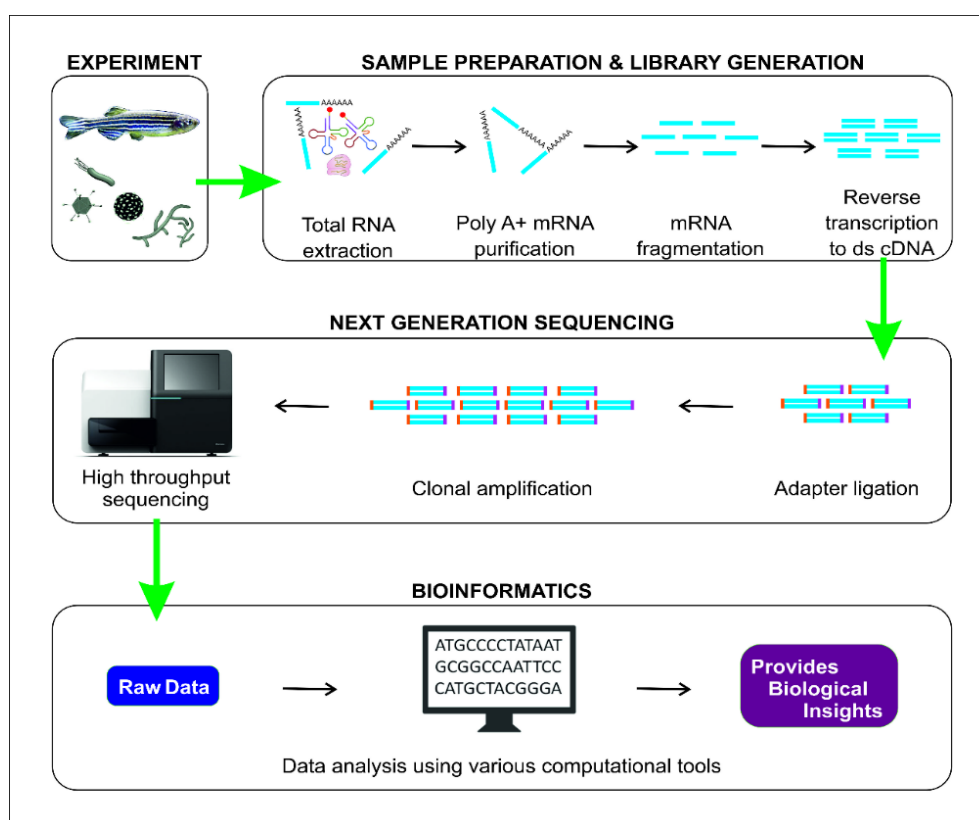


Figura 8. Fluxograma representativo da técnica de RNA-Seq.
(Sudhagar; Kumar; El-Matbouli, 2018)

3.1.3. Análise da qualidade das *reads*

As seis bibliotecas de *reads* correspondentes ao transcriptoma de tripomastigotas WT e nocautes para aTS de *T. cruzi* CL Brener foram analisadas quanto a qualidade das bases sequenciadas por meio da ferramenta FastQC (Versão 0.11.8) (Andrews S., 2010). As bibliotecas foram analisadas com base nas seguintes informações emitidas no relatório da ferramenta: número total de *reads* por biblioteca, qualidade das sequências por base, *score* de qualidade por sequência, conteúdo de sequência por base (proporção de cada uma das quatro bases (A, T, C e G), em cada posição sequenciada), conteúdo GC por sequência, conteúdo de N por base e distribuição do tamanho de sequências e conteúdo de adaptadores.

3.1.4. Trimagem e filtragem de *reads* com bases de baixa qualidade

As bibliotecas sequenciadas (*paired-end*, predominância de *reads* de 150 pb) foram submetidas ao processo de eliminação de nucleotídeos de baixa qualidade, bem como a remoção de adaptadores contaminantes, utilizando a ferramenta fastp (Chen et al., 2018). Para isso foram realizados alguns testes consecutivos visando avaliar o melhor conjunto de parâmetros com capacidade de gerar dados de alta qualidade e sem uma perda expressiva do total de *reads* disponíveis em cada biblioteca.

Para a filtragem de *reads* de baixa qualidade, foi estabelecido um *cut-off* de qualidade de bases igual a 30 (*phred score* $\geq$ 30) para todas as bibliotecas analisadas, ou seja, admitiu-se a possibilidade de 1 erro a cada 1000 bases sequenciadas. Os parâmetros utilizados para trimagem seguem descritos na linha de comando abaixo:

fastp

```
--in1 {sample}_foward.fastq.gz      --in2 {sample}_reverse.fastq.gz
--out1 {sample}_R1_trimmed.fastq     --out2 {sample}_R2_trimmed.fastq
--detect_adapter_for_pe
--trim_poly_g
--overrepresentation_analysis
--cut_front --cut_front_window_size 1  --cut_front_mean_quality=20
--cut_tail  --cut_tail_window_size 1   --cut_tail_mean_quality=20
```

```
--average_qual=30 --length_required 50
--html {sample}_fastp.html
```

Descrição dos parâmetros:

detect_adapter_for_pe: ativa a detecção automática de adaptadores.

trim_poly_g: aparar cauda poly-G (qualquer tipo de dado).

overrepresentation_analysis: contagens de sequências super-representadas.

cut_front --cut_front_window_size 1: ativa a remoção de baixa qualidade no início das leituras utilizando uma janela deslizante de 1 base para avaliar.

cut_front_mean_quality=20: remove se a qualidade média da janela for <20.

cut_tail --cut_tail_window_size 1: ativa a remoção de baixa qualidade no final das leituras utilizando uma janela deslizante de 1 base para avaliar.

cut_tail_mean_quality=20: remove se a qualidade média da janela for < 20.

average_qual=30: qualidade média da leitura seja pelo menos 30.

length_required 50: remoção de leituras com comprimento menor que 50 bases.

html {sample}_fastp.html: gera relatório de qualidade após o *trimming*.

3.1.5. Mapeamento das *reads*

O mapeamento de *reads* em regiões de famílias de superfície de *T. cruzi* é bastante desafiador devido ao seu alto nível de elementos repetitivos ao longo dessa região. Para obtenção de análises mais robustas, foram consideradas apenas as *reads* mapeadas em um único *locus*. Para otimizar o mapeamento das *reads* geradas para cada amostra, foi desenvolvido um protocolo que melhor representasse as regiões que contém os genes do compartimento *core* e disruptivo. Isso com a finalidade de analisar individualmente cada compartimento. O protocolo consiste em mapear as *reads* de alta qualidade de cada amostra contra dois genomas de referência: 1) o haplótipo Esmeraldo-like do genoma de *T. cruzi*, cepa CL Brener, chamado também de haplótipo Esmo (para análise da região do compartimento *core*), e 2) o genoma completo de *T. cruzi*, cepa CL Brener, que incluiu os dois haplótipos (Esmeraldo-like e não-Esmeraldo-like) e sequências não atribuídas a nenhum dos haplótipos, chamadas também de *unassigned*. O motivo do desenvolvimento deste protocolo, é que como a organização genômica do compartimento *core* é bastante

definida e conservada entre os haplótipos de CL Brener, para avaliar os genes do compartimento *core* (onde estão presentes os genes conhecidos como “*housekeeping*” e os genes compartilhados com outros tripanossomatídeos), pode ser realizado um mapeamento mais restritivo, utilizando apenas um único haplótipo. Em contrapartida, o mesmo não ocorre para os genes presentes no compartimento disruptivo (codificadores de proteínas de superfície) que estão em locais nos cromossomos onde a sintenia entre os haplótipos é perdida, o que torna necessário o uso dos dois haplótipos e sequências *unassigned* para que a total diversidade seja acessada e um mapeamento de *reads* mais otimizado seja realizado.

Foi utilizada a versão 68 dos genomas de referência em formato FASTA, a mais recente no momento da execução do projeto, disponível no banco de dados do TritrypDB (<https://tritrypdb.org/tritrypdb/app>) (Aslett et al., 2010).

Antes de iniciar o mapeamento das *reads*, foi necessário gerar o índice do genoma de referência. Para isso, foi utilizado a ferramenta STAR, mesmo programa utilizado para o mapeamento. A indexação foi executada segundo a linha de comando abaixo:

star

```
--runMode genomeGenerate
--genomeDir <caminho/files/indexacao>
--genomeFastaFiles <TriTrypDB-68_Genome.fasta>
--sjdbGTFfile <arquivoTriTrypDB-68.gff>
```

O mapeamento foi realizado com o software STAR utilizando parâmetros:

star

```
--genomeDir caminho/files/indexacao
--readFilesIn {sample}_R1_trimmed.fastq {sample}_R2_trimmed.fastq
--alignIntronMin 0
--alignIntronMax 0
--outSAMtype BAM SortedByCoordinate
--outFileNamePrefix ${sample}_
```

Descrição dos parâmetros:

alignIntronMin: define o comprimento mínimo de um íntron como 0.

alignIntronMax: define o comprimento máximo de um íntron como 0.

outSAMtype BAM SortedByCoordinate: define o formato (.BAM) e ordenação do arquivo de saída.

outFileNamePrefix \${sample}_: Prefixo para os arquivos de saída.

Os alinhamentos gerados foram ordenados pelo STAR (arquivo.bam), mesmo software do mapeamento. A indexação das reads mapeadas e estatística do mapeamento foram realizadas utilizando o programa samtools (<https://samtools.sourceforge.net/>). Também, com o mesmo *software*, foi utilizado para considerar apenas as *reads* que mapearam em uma única região do genoma de referência nas duas fitas (*forward* e *reverse*), gerando uma nova saída para estas *reads*.

3.1.6. Verificação de genes alvos nocaute para aTS

Para investigar os genes *trans*-sialidases que foram nocauteados, elaborou-se um mapa dos motivos conservados nas proteínas aTS de todos os genes alvos do nocaute descritos no trabalho (Burle-Caldas et al., 2022b). Neste mapa foram identificados os motivos protéicos das regiões conservadas das proteínas *trans*-sialidases com atividade catalítica, entre eles, Asp-box, VTV, repetições SAPA e o aminoácido tirosina 342. Também, neste mapa foi reconhecida a sequência de aminoácidos das *trans*-sialidades utilizada como molde de reparo para efetuação da técnica CRISPR-Cas9 (Figura 9.B).

Em seguida, foram utilizadas as *reads* unicamente mapeadas contra o genoma completo da cepa CL Brener de *T. cruzi* de duas bibliotecas correspondentes aos transcriptomas de tripomastigotas *wild-type* (amostra TCT_WT_1) e tripomastigotas nocaute para aTS (amostra TCT_KO7_1). Posteriormente, foram adicionados no *software* Artemis (Carver et al., 2012) os arquivos de saída do mapeamento de cada biblioteca, a fim de verificar e comparar a região de homologia das aTS, onde foi inserido o molde de reparo (sítio de região catalítica) (Figura 9. A-B).

O Artemis é uma plataforma utilizada para visualizar, explorar e interpretar grandes volumes de dados de experimentos produzidos pelas tecnologias de sequenciamento. Seus recursos incluem múltiplas visualizações de leituras de

sequência e variantes, permitindo que o usuário observe em diferentes perspectivas um mesmo conjunto de dados (Carver et al., 2012).

A. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MOLDE DE REPARO PARA TÉCNICA DE CRIPR-Cas9



B. MAPA DOS MOTIVOS PROTÉICOS CONSERVADOS NAS aTS E REGIÃO DE HOMOLOGIA DAS aTS UTILIZADAS PARA O MOLDE DE REPARO

Motivos conservados:

ASP-BOX

Y

VTV

SAPA

LW – Ponto de inserção da enzima EcoRV, M13 e stop códon.

Sequência de homologia transcrita das aTS (**letras em negrito**)

TcCLB.510787.10

MGKTVVGASRMFWLMFFVPLLLALCPSEPAHALAPESSRVELFKRQSSKVPFEKDGKVTDR
 VVHSFRLPALVNVDGVMVAIADARYETSDNNSLIDTVAKY **SVDDGETW**ETQIAIKNSRVSS
 VSRVVVPTVIVKGNKLYVLVGSYNSSKSYWTWQPDGSDWDILLAVGEVTKSTAGGKTTASI
 KWGSPVSLKKFFPAEMEGMHTNQFLGGAGVAIVASNGNLVYPVQVTNKRKQVFSKIIFY **SED**
EGKTWKFGKGRSDFGCSEPVALEWEGKLIINTRVDRARRLVYE **SSDMGNTW****VEAVGTLSRV**
WGPSPKSDQPGSQSSFTAVTIEGMRVMLFTHPLNFKGRWLRDRINLWLTDNQRIYNVGQVS
 IGDENAA**Y**SSVLYKDDKLYCLHEINTNEVYSLVFARLVGELRIIKSVLQSWKNWDSHLSSI
 CTPADPAASSSERGCGPAVTTVGLVGFLSGNASQNVWEDAYRCVNASTANAERVPNGLKFA
 GVGGGALWPVSQQGQNQRYRFANHAFTLVASVTIHEVPSVASPLLGLASLDSSGGKLLGLS
 YDKKHQWQPIYGSTPVTPTGSWETGKRYHVLTMANKIGSVYIDGEPLEGSGQTVVPDGRIT
 PDISHFYVGGYKRSMDPTISH**VTVNNVLLYNR**QLNAEEIRTLFLSQDLIGTEAHM**DSSSDS**
SAHGTPSTPVDSSAHGTPSTPVDSSAHSTPSTPADSSAHGTPSTPVDSSAHGTPSTPVDSS
AHSTPSTPVDSSAHGTPSTPVDSSAHGTPSTPVDSSAHSTPSTPVDSSAHGTPSTPVDSSA
HGTPSTPVDSSAHSTPSTPVDSSAHSTPSTPADSSAHGTPSTPVDSSAHGTPSTPVDSSAH
STPSTPVDSSAHSTPSTPADSSAHGTPSTPVDSSAHSTHSTPVDSSAHSTPSTPVDSSAHG
TPSTPVDSSAHGTPSTPVDSSAHSTPSTPVDSSAHGTPSTPVDSSAHGTPSTPVDSSAHGT
PSTPVDSSAHSTPSTPVDSSAHGTPSTPVDSSAHGTPSTPVDSSAHSTPSTPVDSSAHGTP

STPVDSSAHSTPSTPVDSSAHSTPSTPVDSSAHSTPSTPVDSSAHSTPSTPVDSSAHGTPS
 TPVDSSAHGTPSAPVDSSAHSTPSTPVDSSAHSTPSTPVDSSAHGTPSTPVDSSAHSTPST
 PAGNSATRMFLILPDGAALSAFSGGGLLLCACALLHVFFTAVFF

TcCLB.509495.30

MGKTVVGASRMFWLMFFVPLLLALCPSEPAHALAPESSRVELFKRQSSKVPFEKDGKVTER
 VVHSFRLPALVNVDGVMVAIADARYETSDNNSLIDTVAKY SVDDGETWETQIAIKNSRASS
 VSRVVDPTVIIVKGNKLYVLVGSYNSSRSYWTSHGDARDWDILLAVGEVTKSTAGGKTAS I
 KWGSPVSLKKFFPAEMEGMHTNQFLGGAGVAIVASNGNLVYPVQVTNKKKQVF SKIFY SED
 EGKTWKFGKGRSDFGCSEPVALEWEGKLIINTRVDWTRRLVYE SSDMGNTWVEAVGTLSRV
 WGSPSKSDQPGSQSSFTAVTIEGMRVMLETHPLNFKGRWLRDRNLW LTDNQRIYNVGQVS
 IGDENSA YSSVLYKDDKLYCLHEINTNEVYSLVFARLVGELRI IKSVLQSWKNWDSHLSSI
 CTPADPAASSSERGCGPAVTTVGLVGFLSGNASQNVWEDAYRCVNASTANAERVPNGLKFA
 GVGGGALWPVSQQGQNQRYRFANHAFTLVASVTIHEAPRDATPLLGASLDSSGGKLLGLS
 YDEKHQWQPIYGSTPVTPTGSWETGKRYHVLTMSNKIGSVYIDGEPLEGSGQTVVPDGRIT
 PDISHFYVGGYKRS DMPTISH VTVNNVLLYNRQLNAEEIRTLFLSQDLIGTEAHM DSSSDS
 SAHGTPSIPVDSSAHGTPSTPVDSSAHATPSTPVDSSAHSTPSTPVDSSAHGTPSTPVDSS
 AHGTPSTTVDDSSAHGTPSTPVDSSAHGTPSTTVDDSSAHATPSTPVDSSAHSTPSTPVDSSA
 HGTPSTPVDSSAHGTPSTPVDSSAHGTPSTPVDSSAHGTPSTPVDSSAHGTPSTPVDSSAH
 GKPSTPVDSSAHGTPSTPVDSSAHSTPSTPADSSAHSTPSTPA GNGANGTVLILPDGAALS
 AFSGGGLLLCACALLHVFFTAVFF

TcCLB.507085.30

MGRTVVGASRMFWLMFFVSLLLALCPSEPAHALAPGSSRVELFKRQSSKVPFEKDGKVTER
 VVHSFRLPALVNVDGVMVAIADARYETSDNNSLIDTVAKY SVDDGETWETQIAIKNSRVSS
 VSRVVVPTVIIVKGNKLYVLVGSYNSSRSYWTSHGDARDWDILLAVGEVTKSTAGGKTAS I
 KWGSPVSLKKFFPAEMEGMHTNQFLGGAGVAIVASNGNLVYPVQVTNKRKQVF SKIFY SED
 EGKTWKFGKGRSDFGCSEPVALEWEGKLIINTRVDARRRLVYE SSDMGNTWVEAVGTLSRV
 WGSPSKSDQPGSQSSFTAVTIEGMRVMLETHPLNFKGRWLRDRNLW LTDNQRIYNVGQVS
 IDDENAA YSSVLYKDDKLYCLHEINTNEVYSLVFARLVGELRI IKSVLQSWKNWDSHLSSI
 CTPADPAASSSERGCGPAVTTVGLVGFLSGNASQNVWEDAYRCVNASTANAERVPNGLKFA
 GVGGGALWPVSQQGQNQRYRFANHAFTLVASVTIHEVPSVASPLLASLDSSGGKLLGLS
 YDKKHQWQPIYGSTPVTPTGSWETGKRYHVLTMA NKIGSVYIDGEPLEGSGQTVVPDGRIT
 PDISHFHVGGYKGS DMPTISH VTVNNVLLYNRQLNAEEIRTLFLSQDLIGTEAHM DSSSDS
 SAHGTPSTPADRSAHSAPSTPVDSSAHGTPSTPVDSSAHSTPSTTVDDSSAHSTPSTPVDSS
 AHSTPSTTVDDSSAHSTPSTTVDDSSAHSTPSTPVDSSAHSTPSTTADSSAHSTPSTPADSSA
 HSTPSTPVDSSAHSTPSTPADSSAHSTPSTPVDSSAHSTPSTPVDSSAHGTPSTPA GNGAT
 RMFLILPDGAALSAFSGGGLLLCACALLHVFFTAVFF

TcCLB.508857.30

MPRLLLYVLVLFLLNFCPNVPAHALAPESSRIELFKRRNSTVPFEDKGKVTERVVHSFRL
 PALVNVDGVMVAIADARYTTSDNNSFIDTVVKY SVDDGETWETQIAIKNSRVSSVSRVDP
 TVIVKGNKLYVLVGSYNKSKNYWTWQPDGSDWDILLAVGEVTKSTADGKTANITWGS PVS
 LKEFFPAYMEGIPTKQFLGGAGVATVASNGNLVYPVQVTDMMKKQIFSKIFY SADEGKTWNF
 SEGRSDFGCSEPVLWKNKFIVNTRVDARRRLVYN SGDMPWPVEAVGTLSRVWGSPSKS

DQPGSQSSFTAVTIEGMRVMLFTHPLNFKGKWLDRDLNLLTLDNQRIYNVGQVSI GDENSA
YSSVLYKDDKLYCLHEINTNEVYSLVFARLVGELMI I KSVLQSWKNWDSHLSS ICTPADPA
 TLSSERVC GPAVTTVGLAGFLSDNATQNVWEDAYRCVNA STANA EKVPNGFKFAGVGGGAL
 WPVSQQGQNQRYHFANYEFTLVASVTIHEVPRDATPLLGASLDSSGGEKLLGLSYDEKHQW
 QPIYGSTPATPTGSWEVNKKYHVVLTMANKMGSVYIDGEPLAGSGQTVVPNEGTPDISHFY
 IGSYNSSNMP TESH**VTAKNVFLYNRQL**NAKEIRTLFLSQDL DGVEEDK**DSSDDGDNDGD**
SDGDDGDGAHSNSSSSFGGGASSVSAGGRNLVYVCALVLHLLVLVYF

TcCLB.508089.10

MPQLLLYVLVLF FPLNFCPNVPAHALAPES SRIELFKRKNSTVPFEDKGK VTERVVHSFRL
 PALVNVDGVMVAIADARYRSSNDNSLIDTVVKY**SVDDGETW**ETQIGIKNSRVSSVSRVDP
 TVIVKGNKLYVLVGSYNKSGSYWTWQPDGSDWDILLAVGVVTKSTADGKTTANITWGS PVS
 LKEFFPAYMEGIPTKQFLGGAGVATVASNGNLVYPVQVTNMKKELFSKIFY**SADEGKTW**NF
 SEGRSDFGCSEPVVLEWENKFIINTRVDYRRRLVYN**SGDMEKPW****VEAVGTL****SRVWG****PSPKS**
DQPGSQSSFTAVTIEGMRVMLFTHPLNFKGKWLDRDLNLLTLDNQHIYNVGQVSI GDENSA
YSSVLYKDDKLYCLHEINTNEVYSLVFARLVGELMI I KSVLQSWKNWDSHLSS ICTPADPD
 TLSSERGC GPAVTTVGLAGFLSDNATQNVWEDAYRCVNA STANA EKVPNGFKFAGVGGGAL
 WPVSQQGQNQRYHFANYEFTLVASVTIHEVPRAATPLLGASLDSSGGEKLLGLSYDEKHQW
 QPIYGSTPATPTGSWEVNKKYHVVLTMANKMGSVYIDGVLLKSGSGQTVVPDEGTPDISHFY
 IGSYNSSNMP TESH**LTAKNVFLYNRQL**NAKEIRTLFLSQDL DGVEEDK**DSSDDGEDKDSSD**
DGDDNDGAHSNSSSSFGGDASSVSAGGRNLVYVSALVLHLLVLVYF

TcCLB.511323.10

MGRTVVGASRMFWLT C FVPLLLALCPNEPAHALAPGSSRVELFKRQNSTVPFEENGEVRQR
 VVHSFRLPALVNVDGVMVAIADARYDTSDNSLIDTVVKY**SVDDGETW**ETQIAIKNSRASS
 VSRVVDPTVIIVKGNKIYVLVGGYNSSRSYWTSHGDASDWDILLAVGEVKKCTVDDKTAASI
 KWGSPVSLKEFFPAEMEGMQTNQFLGGAGVAIVASNGNLVYPVQVTNKKKQVFSKIFY**SED**
EGKTWKFGEGRSAFGCSEPVALEWEGKLIINTRVDWTRRLVYE**SGDMGNTW****VEAVGTL****SRV**
WGPSPASNMPGSQSSFTAVTIEGMRVMLFTHPLNFKGWWLRDRILQLTLDNQRIYNVGQVS
 IGDENSA**Y**SSVLYKDDKLYCLHEINSNEVYSLVFARLVGELRLIKSVVQSWKKWDSHLSSN
 CTPADSAASSSERGC GPAVTTVGLVGLSHSANKTKWKDAYRCVDASTANAERVSNGLKFA
 GVGGGALWPVSQQGQNQRYRFANHAFTLVASVTIHEVPSVASPLLGASLDSSGGEKLLGLS
 YDKKNQWQPIYGSTPVTPTGSWETGKRYHVVLTMANRNGSVYIDGELLKSGSGQTVVPDERT
 PDISHFYVGGYGRSDMPTMSH**VTVTNVL LYNRQL**DAEEIRTLFLSQDLIGTEGNL**DSSDDD**
DDGSNSTSSSTPVDSGANSTSLTPVDSGANSTSSSTPVDSGANSTSSSTPVDSGANSTSSSTPVG
SGANSTSSSTPVDSGANSTFSSLLAGSSNSTSSSTPVGSSAKSTPSMPFAGGVYRNFFVFDG
 GAFSAFSGGRFFLCAWALLHPLLMIASV

TcCLB.507979.30

MGRTVVGASRMFWLTHFVPLLLALCPSEPAHALAPGSSRVELFKRQNSTVPFEENGEVRQR
 VVHSFRLPALVNVDGVMVAIADARYDTSDNSLIDTVVKY**SVDDGETW**ETQIAIKNSRVSS
 ASRVVDPTVIIVKGNKIYVLVGSYNSSRSYWTSHGDASDWDILLAVGEVKKCTVDDKTAASI
 KWGSPVSLKEFFPAEMEGMQTNQFLGGAGVAIVASNGNLVYPVQVTNKKKQVFSKIFY**SED**
EGKTWKFGEGRSAFGCSEPVALEWEGKLIINTRVDWTRRLVYE**SSDMGNTW****VEAVGTL****SRV**
WGPSPASNMPGSQSSFTAVTIEGMRVMLFTHPLNFKGWWLRDRILQLTLDNQRIYNVGQVS

IGDENSAYSSVLYKDDKLYCLHEINSNEVYSLVFARLVGELRLIKSVVRSWKKWDSHLSSN
CTPADSAASSSERGCGPAVTTVGLVGLFLSHSANKTKWKDAYRCVDASTANAERVSNGLKFA
GVGGGALWPVSQQGQONQRYRFANHAFTLVASVTIHEVPSVASPLLGLASLDSSGGKLLGLS
YDEKHQWQPIYGSTPVTPTGSWETGKRYHVLTMANRNGSVYIDGELLKSGSGQTVVPDERT
PDISHFYVGGYGRSDMPTMSHVTVTNVLLYNRQLDAKEIRTLFLSQDLIGTEGNLDSSEDD
DGGPNSTSSTSVGSGAKSTSSTPVGSGSKSMSSTPVGSGAKSTSSTPVGSGSKSMSSTPVG
SGAKSTSSTPVGSGAKSTSSTPVGSGAKSTSSTPVGSGAKSTSSTPFESGDKSTPSMPFAG
GVYRNFFVFVDGGAFFSAFSGGRVFLCAWALLHLLLMIAFV

TcCLB.509817.50

MPRLLLYVLVLFPLNFCPNVPAHALAPESSRIELFKRKNSTVPFEDKGKVTERVVHSFRL
PALVDVDGVMVAIADARYDTSNDNSLIDTVVKYSVDDGETWETQIGIKNSRVSSVSRVDP
TVIVKGNKLYVLVGSYNSSRSYWTWQPDGSDWRPMLAVGEVTKSTADGKTTANITWGS PVS
LKEFFPAEMEGMHTKQFLGGAGVATVASNGNLVYPVQVTNMKKELFSKIFY SEDDGKTKF
SEGRSDFGCSEPVVLEWENKFI INNRVDYRRRLVYN SGMEEKPWVEAVGTL SRVWGSPSPKS
NQPGSQSSFTAVTIEGMRVMLFTHPLNFKGRWLRDRNLWLTNDNQRIYNVGQV SIGDENSEA
YSSVLYKDDKLYCLHEINTDEVYSLVFARLVGELRLIKSVVRSWKKWDSHLSSICTPADPA
ASSSERGCGPAVTTVGLAGFLSHSATQNVWEDAYRCVNAS TANAEEVPNGFKFAGVGGGAL
WPVSQQGQONQRYHFANYEFTLVASVTIHEAPRNATPLLGLASLDSSGGEKLLGLSYDEKHQW
QPIYGSTPVTPTGSWETGKRYHVLTMANRNGSVYIDGELLEGGSGQTVVPDERTPDISHFY
IGSYNSSNMPTISHLTANNVLLYNRQLNAEEIRTLFLSQDLIGTEGIL DSSDDGDGDKDSS
EYDDGAHSNSSSSFGDASSVSAGGRNLVYVCALVLHLLVLVYF

TcCLB.506975.80

MPRLLLYVLVLFPLNFCPNVPAHALAPGSSRIELFKRKNSTVPFEENGKVTERVVNSFRL
PALVNVDGVMVAIADARYDTSNDNSLIDTVVKYSVDDGETWETQIAIKNSRASSVSRVDP
TVIVKGNKLYVLVGSYNISRSYWTWQPDGSDWDILLAVGEVKKCTVDGKTTANITWGS PVS
LKEFFPAEMEGIHTKQFLGGAGVATLASNGNLVYPVQVANMKKQIFSKIFY SEDDGKTKF
SEGRSDFGCSEPVVLEWK NKFI VNTRVDRARRLVYN SGMER.PWVEAVGTL SRVWGSPSPKS
DQPGSQSSFTAVTIEGMRVMLFTHPLNFKGRWLRDRNLWLTNDNQRIYNVGQV SIGDENAA
YSSVLYKDDKLYCLHEINSNEVYSLVFARLVGELRIIKSVLQSWKNWDSHL SRICTPADPA
TSSSERVCGPAVTTVGLAGFLSDNATQNVWEDAYRCVNAS TANA EKVPNGFKFAGVGGGAL
WPVSQQGQONQRYHFANYEFTLVASVTIHEVPRDATPLLGLASLDSSGGEKLLGLSYDEKHQW
QPIYGSTPATPTGSWEVNKKYHVLTMANKMGSVYIDGEPLAGSGQTVVPDEGTPDISHFY
IGSYNSSNMPTESHVTTKNVFLYNRQLNAEEIRTLFLSQDLGDGVEEDK DSSDDGDENDGDD
SDGDDNDASSLSAGGRNLVYVCALVLHLLVLVYF

TcCLB.505931.30

MPLYLLFGFFLLFSFCAPADALAPGSSRVELFKRQNSTVPFEENGKVTERVVHSFRLPALV
NVDGVMVAIADARYDTSNDNSLIDTVAKYSVDGGETWETQIAIKNSRVSSFSRVDPPTVIV
KGNKLYVLVGSYNISTNYWMWHDASDWDILLAVGEVTKSTVDGNTTVS IKWGSPPVKEF
FPREMEGVPTKQFLGGAGVATLASNGNLVYPVQVTNVKGQIFSKIFY SEDDGKTKF GFKGR
SAFGCSEPVALEWEGKLI INTRVDRARRLVYES SDMGNTWVEAVGTL SRVWGSPSPKSDQPG
SQSSFTAVTIEGMRVMLFTHPLNFKGKWLDRDRNLWLTNDNQRIYNVGQV SIGDENAA YSSV
LYMDDKLYCLHEINTDEVYSLVFARLVGELMI IKSVLQSWKTWDSYLSSICTPADPAASSS

KRGC GPPFPTAGLVGFLSHSASQNVWEDAYRCVNASINHG TNLTRGFKFEGRNAGALWPVG
 KQGQNQRYRFANHRFTLVALVSIHKVPRSTRPLVGASLDGSGYRKLLGLSYDKEQRWVPTF
 GRAASSPTGSWELNKTYHVVLAFEEGVGYIYVDGEPLRGSGQRLTSVQLKSMEISHFSIGS
 YGTSDRGTDSTQITVTHVLLYNRRIEPSEVQTLFLGISKIVATSESMANEMVIQKMMLDASE
 RGSIFSRIDTLFLLTLLLLLSIS

TcCLB.503993.10

MPSYLLFGVLLLFSCAPADALAPGSSRVELFKRQNSTVPFEDKGKVTDRVVHSFRVPALF
 DVDGVMVAIADARYDTSNDNSLIDTVAKYSVDDGETWETQIAIKNSRVSSVS RVVDPTVIV
 KGNKLYVLVGGYNSSTTYWTHG DASDWDILLAVGEVTKCTVDGKTTANITWGSPVSLKEF
 FPREMEGVPTKQFLGGSGVAILASNGNLVYPVQVTNMRGQIFSKIFYSEDEGKTWKFGKGR
 SDFGCSEPVALEWEGKLIINTRVDRARRLVYESSDMGNTWVEAVGTLSRVWGSPSPKSDQPG
 SQSSF TAVTIEGMRVMLFTHPLNFKGKWLDRDLNLWLT DNQRIYNVGQVSI GDENAAVSSV
 LYKDDKLYCLHEINTDEVYSLVFARLVGELMIKSVVRSWKNWDNYLSSICTPADPAASSS
 KRGC GPPFPTAGLVGFLSHSTSQNVWEDAYRCVNASINRG TNLTRGFTFEGRNAGALWPVG
 KQGQNQRYRFANHRFTLVALVSIHKVPRSTRPLVGASLDGSGYRKLLGLSYDKEQRWVPKF
 GQAASFPTGSWELNKTYHVVLAFEEGVGYIYVDGEPLRGSGQRLTG VQLKSVDISHFSIGS
 YGTSDRGTDFTQITAKHVLLYNRRIEPNVQTLFLGISKIVATSESMINEMAIQRMMLDASE
 RGSRFSLINTLFLLTLLLLL

Figura 9. Representação esquemática da técnica para nocaute e os genes aTS alvos.

A. Representação esquemática do molde de reparo. Sequência do oligonucleotídeo de fita simples com três códons de parada (sublinhado e em letras minúsculas), a sequência do primer reverso M13 (letras na cor cinza) e o sítio de restrição da enzima *EcoRV*. Duas sequências de aTS com 25 nucleotídeos foram utilizadas como marcadores de homologia para permitir o reparo de HR dentro dos genes aTS. **B. Mapa das proteínas aTS de todos os genes alvos para nocaute.** Motivos protéicos conservados das regiões catalíticas das aTS: Asp-box (realce de fundo lilás), VTV (realce de fundo azul claro), aminoácido tirosina (realce de fundo vermelho), repetições SAPA (realce de fundo amarelo), LW: ponto de inserção da enzima *EcoRV*, M13 E stop códon (realce de fundo laranja e verde) e sequência de homologia transcrita (letras em negrito).

3.1.7. Contagem das *reads* por gene

A quantificação das *reads* mapeadas para cada gene do genoma de *T. cruzi* foi feita com o programa `featureCounts` (Liao; Smyth; Shi, 2014) considerando apenas as *reads* mapeadas em uma única região.

Foi executada a linha de comando apresentada abaixo.

featureCounts

```
--verbose -T 15 -p
-t mRNA -g ID -a arquivoTriTrypDB-68.gff
-o amostras-counts.txt *uniquely_mapped_sorted.bam
```

Descrição dos parâmetros:

verbose: exibe mensagens durante a execução **-T:** número de *threads*

-p: indica que os arquivos BAM são de leitura pareada (*paired-end*)

-t mRNA: *feature type* **-g ID:** define o atributo do GFF **-a:** arquivo de anotação

3.1.8. Análise das contagens e expressão diferencial

A fim de analisarmos a heterogeneidade entre as amostras foi realizado uma análise de componentes principais (PCA) considerando a contagem de 9004 genes obtidos no genoma de referência haplótipo Esmo, utilizando um p valor ajustado $< 0,05$.

Esta contagem também foi considerada para análise de expressão diferencial, a qual foi conduzida no ambiente R de programação (versão 4.4.1) pelo pacote estatístico DESeq2 (Love; Huber; Anders, 2014). O gene considerado diferencialmente expresso (GDE), foi aquele que obedeceu a dois parâmetros pré-estabelecidos: p ajustado (padj) $< 0,05$ e $\text{Log2FoldChange} < -1,5$ ou $> 1,5$ (mudança de expressão maior ou menor que aproximadamente 2,82 vezes). Os métodos de normalização e distribuição assumidos são inerentes ao pacote.

O DESeq2 considera um método baseado em “fatores de tamanho” específico de cada amostra que tornam comparáveis as contagens de diferentes amostras. Outra característica deste pacote, é que ele assume distribuição binomial negativa (Anders; Huber, 2010).

Para atender o protocolo desenvolvido, detalhado anteriormente no item nº 3.1.5, foi realizado as análises dos GDEs presentes no compartimento *core* e dos GDEs presentes no compartimento disruptivo (Tabela 2) mediante o seguinte procedimento; primeiramente, foi estabelecida a comparação a ser avaliada: TCT KO7 (nocaute para aTS) vs TCT WT (*wild-type*), a qual foi armazenada no objeto denominado **col**. As três bibliotecas KO7 foram consideradas como um único grupo, assim como as duas bibliotecas WT. A função **DESeqDataSetFromMatrix** foi utilizada para a criação de outro objeto, denominado **dds**. Posteriormente, a função **DESeq** foi utilizada para estimar os fatores de normalização dos dados (função **estimateSizeFactor**), cálculo da dispersão entre as contagens observadas (função

estimateDispersions) e aplicação do modelo GLM binomial negativo, o qual testa a significância dos coeficientes para o Log2FoldChange (Log2FC) calculado para cada gene, em cada amostra (função *nbinomWaldTest*). A tabela de resultados foi gerada a partir da função **results**, a qual foi extraído valores Log2FC, padj e *p-values* resultantes da análise de GDE, para cada gene.

Parâmetros utilizados	Análise para região core	Análise para região disruptiva
Genoma de referência	Haplótipo Esmo	Genoma completo + <i>unassigned</i>
Abordagem do mapeamento	Incluídas apenas <i>reads</i> unicamente mapeadas	Incluídas apenas <i>reads</i> unicamente mapeadas

Tabela 2. Planejamento para análises de expressão diferencial dos compartimentos core e disruptivo da cepa CL Brener de *T. cruzi*.

Tabela resumo do planejamento para análises de expressão diferencial contendo os parâmetros utilizados: genomas de referências e tipo de *reads* utilizadas na abordagem do mapeamento.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS PARA ESTUDO DA ADAPTAÇÃO À DIFERENTES TIPOS CELULARES DA CEPA Y DE *Trypanosoma cruzi* EXPRESSANDO LUCIFERASE

3.2.1. Obtenção dos parasitos cepa Y de *Trypanosoma cruzi* - Coleta e hemocultura

Em camundongos fêmeas infectadas da linhagem Swiss foi realizada a coleta de sangue por punção do seio orbitário.

Após a coleta, os parasitos tripomastigotas sanguíneos foram mantidos por 15 dias em tubos falcons contendo meio *Liver Infusion Tryptose* (LIT), pH=7,2, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB – fabricante Sigma) inativado e 1% de antibiótico (penicilina 10.000 U. l/ml e estreptomicina 10 mg/ml), na posição vertical em uma estufa incubadora *Biochemical Oxygen Demand* (B.O.D), ajustada à 28°C.

Posteriormente, com o auxílio da microscopia óptica, foi realizada a leitura da lâmina e confirmou-se a presença de tripomastigotas sanguíneas e formas epimastigotas do parasito. A partir disso, cerca de 2 ou 3 vezes na semana, os tubos foram homogeneizados e, semanalmente, o sobrenadante contendo os parasitos foi transferido para novos tubos falcons até a completa remoção do sedimento (hemácias e células brancas).

3.2.2. Obtenção de uma linhagem de parasitos cepa Y expressando Luciferase

No presente trabalho, com a finalidade de detectar facilmente os parasitos *in vivo*, a partir de uma população de parasitos cepa Y de *T. cruzi*, utilizando o vetor pROCK Red Shifted Luciferase foram gerados uma linhagem de parasitos que emitem bioluminescência.

A sequência contendo o gene Red Shifted Luciferase foi adquirida e purificada a partir do vetor pUC, previamente sintetizado. Após a purificação, esta foi inserida em um novo vetor pTOPO, que em seguida, prosseguiu-se com a transformação da bactéria competente TOP10, de acordo com o protocolo “*One Shot® Chemical transformation*” fornecido pelo fabricante TOPO®.

Esta etapa da clonagem foi essencial para que as enzimas de digestão XbaI e XhoI fossem adicionadas na sequência e criasse a condição para obtenção de uma

sequência com as extremidades coesivas, no propósito de posteriormente, tornar possível a inserção no vetor específico para o parasito, pROCK, que também contém as mesmas enzimas.

3.2.3. Transformação de bactérias

Produtos de clonagem foram incubados com bactérias quimiocompetentes *Escherichia coli* (TOP10) por 30 minutos no gelo. Após a incubação foi realizado choque térmico a 42°C por 55 segundos e em seguida 400µL do meio 2XYT (1,6% de triptona; 1% de extrato de levedura; 0,5% de NaCl; pH 7,0) foi adicionado às bactérias transformadas, que foram então mantidas sob agitação a 37°C. Após uma hora, aproximadamente 200µL da cultura foram plaqueadas em meio 2XYT-ágar (meio 2XYT acrescido de 1,5% de ágar) contendo 100µg/mL de ampicilina. As placas foram incubadas por, pelo menos, 16 horas a 37°C.

3.2.4. PCR de colônia

Colônias transformadas foram analisadas por PCR de colônia. Para isso colônias foram incubadas em 20µL de água por 5 minutos e em seguida aproximadamente 2µL foram usados em reação de PCR contendo: 0,2mM de dNTPs, tampão Taq 1X, 1µM de cada iniciador, Taq 0,04U/µL. A reação foi submetida ao programa: 95°C por 5 minutos seguido de 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 50°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos. Após todos os ciclos as reações eram incubadas a 72°C por 10 minutos para complementação da extensão das cadeias. Por fim produtos de PCR foram analisados por eletroforese em agarose 0,8% a 100V por aproximadamente 45 minutos.

3.2.5. Digestões enzimáticas

Em seguida, foram realizadas as digestões enzimáticas com as seguintes enzimas de restrição: *Xba*/*Xho*I, *Eco*RI/*Bam*HI e *Not*I, que, respectivamente, de acordo com a enzima utilizada foram obtidos os seguintes tamanhos de fragmentos: 1600pb/7000pb, 8000pb/580pb e 8000pb que indicaram a presença do inserto no pROCK. Os fragmentos gerados pelas digestões foram analisados por eletroforese em agarose 0,8% a 100V por aproximadamente 45 minutos.

3.2.6. Transfecção de formas epimastigotas cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e seleção dos parasitos transfectados

A quantidade de 8×10^7 formas epimastigotas cepa Y de *T. cruzi* na fase exponencial de crescimento, foram centrifugadas à 4000 rpm por 10 minutos e, ressuspensos em tampão de eletroporação (TE) (120 mM KCl, 0,15 mM CaCl_2 , 10 mM K_2HPO_4 , 25 mM Hepes, 2 mM EDTA pH 8.0, e 5mM MgCl_2) a 4 °C.

Posteriormente foram distribuídos igualmente em dois grupos denominados, pROCK+luciferase e grupo controle. Sendo considerado o grupo pROCK+luciferase, o grupo que foi ressuspensionado com tampão de eletroporação e 50µg do vetor pROCK Red Shifted Luciferase, recentemente precipitado e linearizado com a enzima de digestão *NotI*. O grupo controle, também ressuspensionado com o tampão de eletroporação, porém, ao invés de ser adicionado o vetor pROCK contendo a sequência luciferase, o mesmo foi substituído por água. Sucessivamente, com o protocolo previamente estabelecido e otimizado no laboratório (DaRocha et al., 2004), por meio do equipamento eletroporador Nucleofector, foi realizada a transfecção nos dois grupos de parasitos (Figura 10).

Após a transfecção, os parasitos dos 2 grupos foram transferidos para garrafas de cultura contendo 5mL de meio LIT suplementado com 10% de SFB inativado. Vinte e quatro horas após a eletroporação foram adicionados 100 µg/mL de droga G418 (Geneticin - Gibco, USA). Este composto é um antibiótico aminoglicosídeo que atua no mecanismo de síntese protéica. O G418 liga-se aos polissomos e interfere na síntese de proteínas causando erros ou terminando precocemente a tradução do mRNA.

Semanalmente, a dosagem da droga foi sendo ajustada com mais 50 µg/mL, até a obtenção da concentração final de 200 µg/mL, na 3ª semana pós transfecção. Quando foi observada a morte dos parasitos que pertenciam ao grupo controle, foi considerado a completa seleção dos parasitos que receberam os vetores.

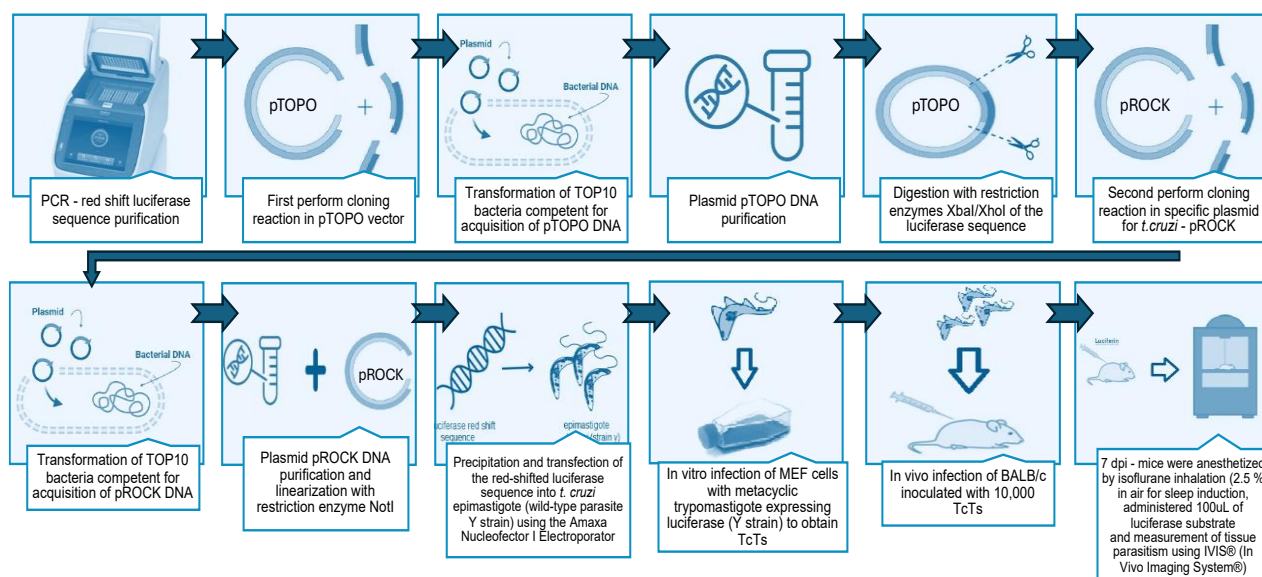


Figura 10. Fluxograma do processo de clonagem para obtenção de parasitos expressando Luciferase.

Resumo das etapas do processo para clonagem da sequência Luciferase no plasmídeo pROCK, transfecção dos parasitos de cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e testes com infecções experimentais *in vitro* e *in vivo* para confirmação da emissão de bioluminescência.

3.2.7. Curva de crescimento das formas epimastigotas cepa Y

O crescimento das formas epimastigotas da cepa Y WT e formas epimastigotas da cepa Y expressando Luciferase de *T. cruzi* foi avaliado a partir de culturas iniciadas na concentração de $0,5 \times 10^7$ parasitos/mL. O crescimento foi monitorado diariamente por meio de contagens realizadas em câmara de Neubauer (Kasvi®).

3.2.8. Ensaio de liberação de tripomastigotas cepa Y expressando Luciferase no sobrenadante (meio de cultura)

As células das linhagens MEF, LLCMK2 e AC16 em uma quantidade de 5×10^4 células foram plaqueadas em placas de poliestireno de 24 poços (Sarstedt®, área = $1,82 \text{ cm}^2$) e cultivadas como previamente descrito no item 2.4 Linhagens celulares. No mesmo dia em que as células foram contadas e plaqueadas, as células eram submetidas a interação com as formas TcTs com multiplicidade de infecção (MOI) de 10:1 e 20:1 parasitos/células, ou seja, aderência celular e infecções eram feitas simultaneamente. Após 24 horas, as células foram lavadas com o PBS 1x ou o meio usual da célula para remoção dos parasitos não internalizados e adicionado o meio usual da célula suplementado com 2% ou 10%. Nas primeiras 24h, as culturas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% CO_2 , após a lavagem, elas foram mantidas em estufa

a 34°C e 5% CO₂. A liberação de TCTs e a proporção de amastigotas intracelulares foi determinada com o auxílio de contagem por meio de câmara de Neubauer (Kasvi®) em microscópio óptico pós infecção nos dias 4, 5, 6 e 7.

3.2.9. Ensaio de multiplicação de amastigotas intracelular cepa Y expressando Luciferase

Uma quantidade de 5×10^4 células de linhagem MEF, foi plaqueada sobre lamínulas de vidro estéreis redondas Knittel® (13 mm), em placas de poliestireno de 24 poços (Sarstedt®, área = 1,82cm²) e incubadas em estufa a 37 °C, com atmosfera úmida e 5% de CO₂. No mesmo dia em que as células foram contadas e plaqueadas, as células eram submetidas a interação com as formas TCTs com multiplicidade de infecção (MOI) de 10:1 e 20:1 parasitos/células.

Após 24 horas, as lamínulas foram lavadas três vezes com o meio RPMI para a remoção dos parasitos não internalizados e adicionado novo meio RPMI a 2% SFB. As células foram fixadas com kit de coloração rápida Panótico Renylab® após 24h e 48h pós infecção (Hpi), montadas sobre uma lâmina com Permount® e analisadas sob microscopia óptica em objetiva de 100x. Experimento foi realizado em triplicata e foram contados em 250 células/lamínula. A taxa de multiplicação de amastigotas foi definida pelo total de amastigotas encontrada em cada lamínula dividido pelo total de células infectadas.

3.2.10. Linhagens celulares e cultivo de células utilizadas neste estudo

No presente projeto foram utilizadas as células MEF (fibroblastos de camundongo), células LLCMK2 (epitelial de rim de macaco) e células AC16 (cardiomiócitos humanos) (Figura 11). Durante os experimentos elas foram mantidas em frascos de cultura estéreis, de 250 cm², com filtro e livre de DNase/RNase e pirogênio.

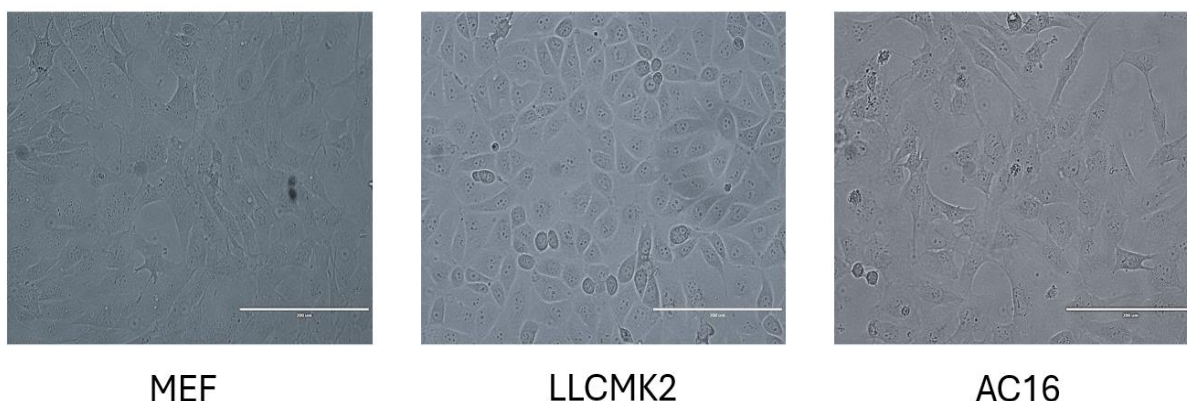


Figura 11. Representação microscópica das células MEF, LLCMK2 e AC16 utilizadas neste estudo.

As imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência EVOS FL (Life Technologies) com lente de aumento 20x.

3.2.11. Manutenção das células cultivadas *in vitro*

Para proceder à manutenção da cultura, os meios de cultura utilizados foram RPMI 1640 Gibco™ e DMEM-F12 Gibco™, ambos suplementados com 10% e 12,5% de SFB inativado, respectivamente. 1% de antibiótico/antimicótico (penicilina 500U/mL e estreptomicina 0,5mg/mL - Gibco™). Todos os frascos de cultura foram mantidos em estufa com atmosfera úmida à 5% de CO₂, sob temperatura a 37 °C.

Para o repique, as células foram lavadas com aproximadamente 5 mL de tampão salina fostato (PBS) e então adicionado 1mL de tripsina Gibco™. As células foram incubadas por cerca de 3 minutos em estufa úmida a 5% de CO₂ a 37 °C. Após incubação com tripsina, as células foram recolhidas em tubo Falcon e centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos à 4 °C e então contadas em câmara de Neubauer. Após a contagem, cerca 1,0 x 10⁶ células eram colocadas novamente em novos frascos de culturas, devidamente identificados com seu respectivo conteúdo.

3.2.12. Infecções experimentais *in vitro* e realização das passagens com tripomastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* expressando Luciferase

A obtenção de formas tripomastigotas metacíclicos (TM) foi realizada através do envelhecimento de culturas de epimastigostas (EPs) em meio LIT, por um período aproximado de 12 dias. As células MEF foram infectadas com a população de TMs de cepa Y expressando Luciferase e Tripomastigotas derivados de Cultura de Tecido (TCTs) foram obtidos através de coleta do sobrenadante da eclosão dessas células.

O sobrenadante foi centrifugado a 4000 rpm por 10 min e mantido em estufa *overnight* para separação de formas TCTs das formas amastigotas e debris celulares residuais. As infecções foram realizadas com multiplicidade de infecção (MOI) de 10:1 parasitos/célula.

O ponto inicial do experimento (tempo 0) foi denominado até 5 infecções (passagens) e realizadas com o objetivo de expandir a quantidade de parasitos. A mesma população de TCTs oriundos do tempo 0 foi utilizada para infectar células LLCMK2 e AC16 por 15 passagens consecutivas em cada célula hospedeira.

Nas passagens de número 5, 10 e 15, a cultura foi expandida de forma a obter triplicatas e quantidade de parasitos suficiente para realizar os testes de invasão, infecções cruzadas e para gerar pellets de tripomastigotas para posterior extração de DNA e RNA (Figura 12).

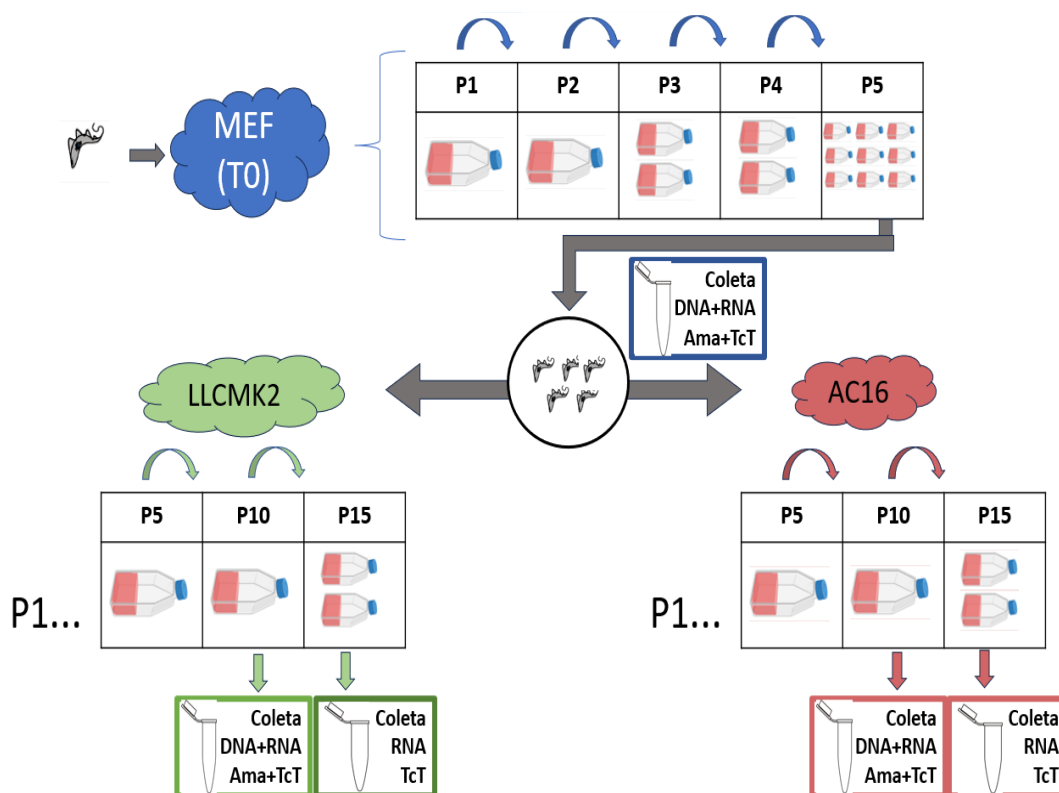


Figura 12. Esquema experimental do cultivo e coleta de parasitos da cepa Y Luciferase de *Trypanosoma cruzi* infectando diferentes linhagens celulares.

A imagem mostra formas tripomastigotas metacíclicas que infectaram inicialmente células MEF (T0). Após, para expansão, as Tripomastigotas derivados de Cultura de Tecidos (TCTs) foram coletados do sobrenadante e utilizados, novamente, para infectar células MEF por 5 passagens consecutivas. Em seguida, parasitos formas tripomastigotas de P5, provenientes da MEF, foram utilizados para infectar células LLCMK2 (epitelial) e AC16 (cardiomíócitos) por até 15 passagens consecutivas. Nas passagens P5, P10 e P15, foram coletados

tripomastigotas e amastigotas intracelulares para extração de DNA/RNA e realização dos ensaios de invasão.

3.2.13. Infecções experimentais *in vivo* com tripomastigotas da cepa Y expressando Luciferase

O modelo experimental adotado neste trabalho, utilizou camundongos fêmeas da linhagem BALB/c com 5 semanas de idade.

A infecção experimental nos animais foi realizada intraperitonealmente e inoculados aproximadamente 10^4 formas tripomastigotas dos parasitos de cepa Y de *T. cruzi* expressando Luciferase mantidos por 15 passagens consecutivas nas linhagens de células AC16 e LLCMK2. Ressalta-se que essa quantidade de inoculação, permite ao camundongo sobreviver a fase aguda da doença sem intervenção terapêutica e, atingir a fase crônica da infecção, possibilitando o estudo de carga parasitária em animais sem tratamento.

Três dias após o inóculo, para verificação da parasitemia, uma pequena gota de sangue foi extraída da cauda dos animais e examinada em dias alternados, até o 17º dia.

3.2.14. Ensaios de invasão com dois grupos parasitos formas tripomastigotas da cepa Y expressando Luciferase

Os ensaios de invasão foram realizados com os parasitos mantidos por consecutivas passagens nas células LLCMK2 e AC16. Os parasitos recuperados da 5ª e 15ª passagem de cada uma dessas culturas foram utilizados para infectar a mesma célula hospedeira em que eles vinham sendo mantidos e realizar uma infecção cruzada para quantificar as taxas de infecções.

Para o teste de invasão, foram plaqueadas 5×10^4 células por poço em um volume de 500uL de meio RPMI ou DMEM-F12 (a depender de qual célula), contendo 10% de SFB. Para que as células fossem aderidas na lamínula, a placa contendo as células em triplicata foi mantida *overnight* em uma estufa com 5% CO₂ a uma temperatura de 37°C.

Em todos os testes de invasão realizados foi utilizada uma MOI de 40 parasitos por célula. Para retirar os parasitos não internalizados, após 60 minutos os poços foram lavados 5x com PBS +/- estéril (CaCl₂ 0.9mM e MgCl₂ 0.5mM) ou com o meio usual da célula. Para a recuperação das células que haviam sido infectadas na etapa

anterior, os poços foram ressuspensos com o meio usual para cada célula contendo 10% ou 12,5% de SFB e durante aproximadamente 2 a 3 horas, a placa foi mantida em estufa contendo 5% CO₂ a uma temperatura a 37 graus.

Em seguida, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% diluído em PBS +/- armazenadas sob temperatura de 4°C a 8°C *overnight*. E por fim, foi dado prosseguimento com a técnica de imunofluorescência com o protocolo já estabelecido previamente no laboratório.

Para o cálculo da taxa de invasão, foram contados o número de parasitos intracelulares em cerca de 200 células hospedeiras. A taxa foi definida como: $(100 \times \text{número de parasitos intracelulares}) / \text{número de células hospedeiras contadas}$.

3.2.15. Análises de resultados e construção de gráficos para estudo das proteínas de superfície no processo de adaptação dos parasitos cepa Y expressando Luciferase

As análises gráficas dos resultados experimentais foram realizadas com o auxílio do software GraphPad Prism®, versão 8.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

Para visualizar o crescimento das cepas epimastigotas da cepa Y WT e Y expressando Luciferase ao longo do tempo, foi construído um gráfico de linhas comparativo, representando a quantidade de epimastigotas (número de epimastigotas/mL $\times 10^7$) em função do tempo.

A liberação de tripomastigotas ao longo do tempo, nas diferentes linhagens celulares testadas, também foi analisada por meio de gráficos de linhas, comparando as quantidades de tripomastigotas (número de tripomastigotas/mL $\times 10^7$) entre os grupos.

Para estimar a taxa média de multiplicação de amastigotas intracelulares por célula infectada, foram gerados gráficos de barras, evidenciando as diferenças entre as diferentes MOIs utilizadas nas infecções.

Por fim, para representar as taxas de invasão nas diferentes linhagens celulares, foram elaborados gráficos *boxplot*, destacando a mediana, a distribuição e a variabilidade dos valores obtidos nas triplicatas.

Todas as análises tiveram caráter exploratório, permitindo a comparação entre os grupos. Contudo, devido ao número reduzido de replicatas, não foram aplicados

testes estatísticos inferenciais robustos para determinar significância das diferenças observadas. Além disso, essas representações gráficas facilitaram a interpretação visual dos dados experimentais, permitindo a identificação de tendências e diferenças entre as condições avaliadas, bem como a comunicação clara e objetiva dos resultados obtidos.

3.2.16. Obtenção de ácidos nucleicos de parasitos cepa Y de *Trypanosoma cruzi* expressando Luciferase

Extrações de DNA

Foram extraídas em triplicata e em uma quantidade de 1×10^8 tripomastigotas por replicata, os DNAs das TCTs coletadas do sobrenadante provenientes de células MEF no tempo 0 e TCTs recuperados das passagens: 5^a, 10^a e 15^a oriundas dos sobrenadantes das células LLCMK2 e AC16, por meio do kit comercial *NucleoSpin Tissue Mini kit for DNA from cells and tissue* - Macherey-Nagel™ (MN).

Extrações de RNA

Os RNAs das TCTs coletadas do sobrenadante provenientes de células HeLa, MEF (tempo 0) e dos TCTs recuperados das passagens: 5^a, 10^a e 15^a oriundas dos sobrenadantes das células LLCMK2 e AC16, seguindo as instruções do fabricante e previamente padronizadas no laboratório, foram extraídos em triplicata o RNA total de uma quantidade de aproximadamente 4×10^8 tripomastigotas por replicata, por meio do kit comercial *PureLink RNA Mini Kit* - Invitrogen™. Para uma precisa, sensível e específica quantificação do DNA e do RNA foi utilizado o fluorômetro Qubit Invitrogen™ e a qualidade foi avaliada em gel de agarose. Além disso, para garantir integridade e evitar a degradação do RNA foi realizado o tratamento de todas as amostras de RNA extraídos com o kit comercial Invitrogen™ TURBO DNA-free.

3.2.17. PCR das amostras de RNA extraído pós-tratamento com o kit TURBO DNA-free

Em seguida do tratamento das amostras de RNA extraídas com a enzima DNase, para certificar que todas as amostras estavam livres de DNA, foi realizado PCR convencional das amostras de RNA extraído pós-tratamento, utilizando-se

primers desenhados para o gene *PGK1* e condições de amplificação previamente padronizadas no laboratório, seguido de eletroforese em gel de agarose 0,8%. As condições do termociclador e as etapas da PCR estão representadas na Tabela 3.

O gene *PGK1*, que codifica a enzima fosfoglicerato quinase 1, foi escolhido para a confirmação da ausência de DNA nas amostras por ser considerado um gene constitutivo ou de manutenção, com expressão essencial em praticamente todas as células humanas, já que participa da glicólise, um processo fundamental para a produção de energia celular.

Etapas	Ação	Tempo	Temperatura	Ciclos
Etapa I	Desnaturação inicial	1min.	95°	
	Desnaturação	30s.	95°	
Etapa II	Anelamento	30s.	58°	30x
	Extensão	2min.	72°	
Etapa III	Extensão final	5min.	72°	

Tabela 3. Condições estabelecidas para Reação em Cadeira da Polimerase (PCR) para confirmar a ausência de DNA nas amostras.

4. RESULTADOS

4.1. ALTERAÇÕES NO PERFIL DA EXPRESSÃO GÊNICA EM PARASITOS NOCAUTES PARA UMA FAMÍLIA DE SUPERFÍCIE

4.1.1. Preparo do RNA para construção de bibliotecas para sequenciamento do transcriptoma

Foram extraídos em triplicata os RNAs de formas tripomastigotas da cepa CL Brener de *T. cruzi* retirados do sobrenadante da linhagem de células HeLa. Como demonstrado na Tabela 4, obteve-se um rendimento satisfatório nessas extrações, com quantidade suficiente para a realização do sequenciamento.

Identificação da amostra	Célula	Quantidade de parasitos	Forma do parasito	Concentração RNA (ng/uL)	Rendimento (ug)
1_TCT_WT_1	HeLa	3x10 ⁸	Tripomastigota	196	7,25
2_TCT_WT_2	HeLa	3x10 ⁸	Tripomastigota	360	13,32
3_TCT_WT_3	HeLa	3x10 ⁸	Tripomastigota	300	11,10
4_TCT_KO7_1	HeLa	3x10 ⁸	Tripomastigota	280	10,36
5_TCT_KO7_2	HeLa	3x10 ⁸	Tripomastigota	254	9,40
6_TCT_KO7_3	HeLa	3x10 ⁸	Tripomastigota	39,6	1,47

Tabela 4. Rendimento das extrações de RNA para estudo do perfil da expressão gênica em parasitos nocautes para aTS.

A partir das amostras com RNAs extraídos foram obtidas bibliotecas de cDNA em triplicata dos parasitos *T. cruzi*, cepa CL Brener, formas tripomastigotas *wild-type* (WT) e nocautes para aTS (KO7). As bibliotecas foram geradas e sequenciadas na Plataforma de Sequenciamento de Nova Geração do Centro de Pesquisa René Rachou.

4.1.2. Sequenciamento: Qualidade e número de *reads*

O Q-score (mapa de calor) obtido na plataforma *BaseSpace* da Illumina, fornece uma visão geral das pontuações de qualidade em todos os ciclos. Este mapa indicou que o sequenciamento produziu em média *reads* com boa qualidade com um Q-score > 30 até o final do sequenciamento das fitas reversas, apenas apresentando

uma diminuição na qualidade no final desta etapa. O que é esperado devido a tecnologia de síntese empregada na tecnologia de NGS (Figura 13).

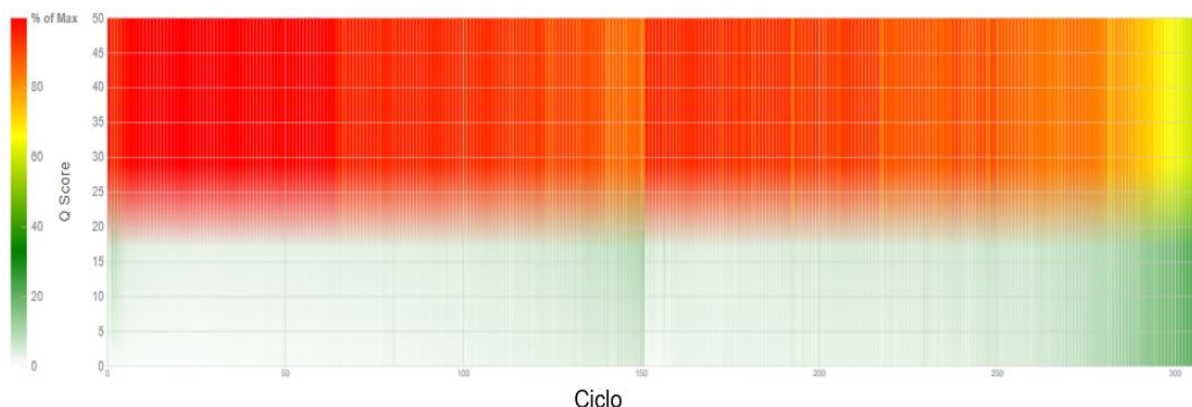


Figura 13. Mapa de calor Q-score da qualidade das reads produzidas pelo sequenciamento

As 6 bibliotecas sequenciadas obtiveram em média 19 milhões de *reads* geradas para cada biblioteca. Após a filtragem, essa média caiu para 17,2 milhões de *reads* (90,52%), ocorrendo uma perda de apenas cerca 1,8 milhões de *reads* (9,48%) (Tabela 5).

Bibliotecas	Nº de <i>reads</i> antes da remoção	Nº de <i>reads</i> depois remoção	Reads descartadas (%)
1_TCTs_WT_1	19.189.897	17.667.697	7,93%
2_TCTs_WT_2	19.840.271	18.163.773	8,45%
3_TCTs_WT_3	16.583.257	15.191.948	8,39%
4_TCTs_KO7_1	21.205.990	19.196.226	9,48%
5_TCTs_KO7_2	20.297.802	17.798.532	12,31%
6_TCTs_KO7_3	16.859.263	15.209.020	9,79%

Tabela 5. Resultado da filtragem das *reads* por qualidade efetuado pela ferramenta Fastp

A qualidade das *reads* de todas as bibliotecas foi verificada antes (Figura 14 e Figura 15. A: coluna esquerda) e após a remoção de bases de baixa qualidade (Figura

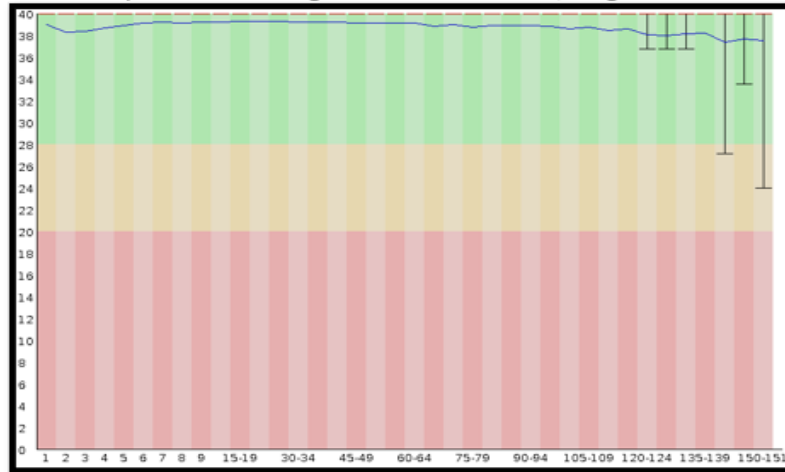
14 e Figura 15. A: coluna esquerda) por meio da ferramenta FastQC. Além do mais, foi respeitado o valor mínimo de qualidade média phred ≥ 30 (99% de confiança) para cada uma das bases. Após a trimagem, um padrão de boa qualidade foi obtido para todas as bibliotecas. Foi conferido também a ausência residual dos adaptadores que poderiam interferir nas seguintes etapas.

Para um mapeamento mais apurado, foi estipulado um valor mínimo de comprimento das *reads* de 50pb. Ainda assim, cerca de 90% das *reads* que passaram pelo filtro de qualidade continham 150 pb de comprimento.

A) ANTES DA REMOÇÃO DAS READS

TCT_WT_1

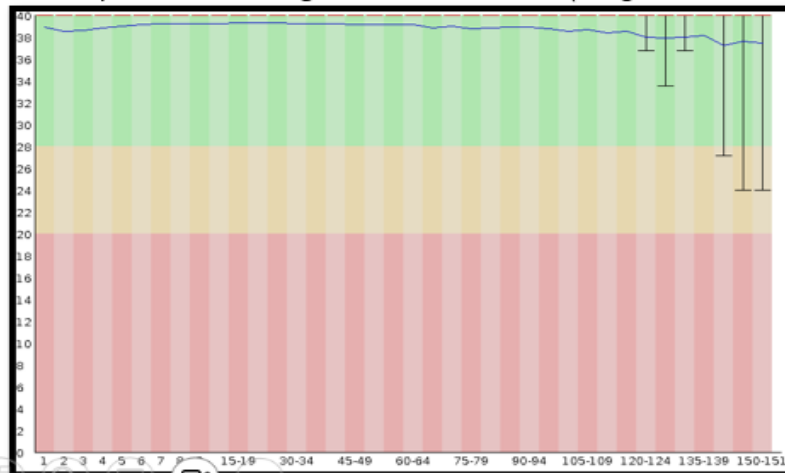
Scores de qualidade ao longo de todas as bases (Sanger/ Illumina 1.9)



Posição na read (pb)

TCT_WT_2

Scores de qualidade ao longo de todas as bases (Sanger/ Illumina 1.9)



Posição na read (pb)

B) DEPOIS DA REMOÇÃO DAS READS

TCT_WT_1

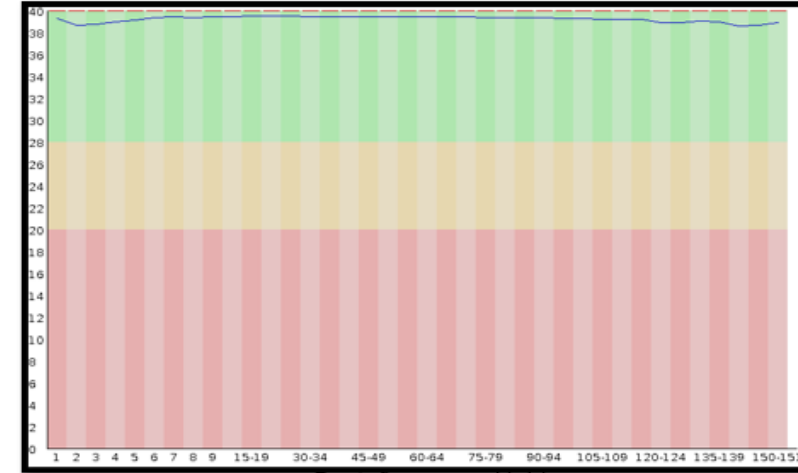
Scores de qualidade ao longo de todas as bases (Sanger/ Illumina 1.9)



Posição na read (pb)

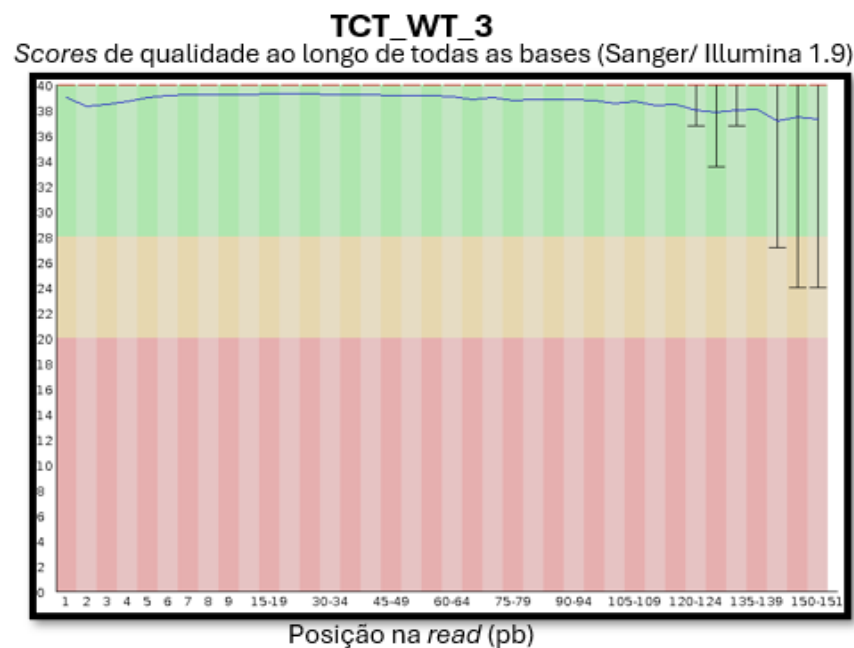
TCT_WT_2

Scores de qualidade ao longo de todas as bases (Sanger/ Illumina 1.9)



Posição na read (pb)

A) ANTES DA REMOÇÃO DAS *READS*



B) DEPOIS DA REMOÇÃO DAS *READS*

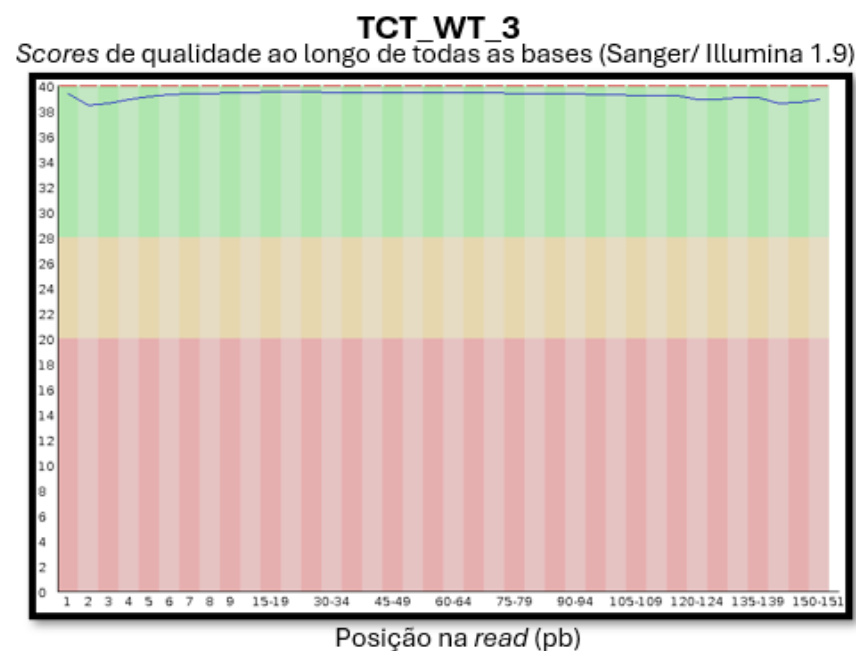


Figura 14. Gráficos de qualidade por base de *reads* brutas oriundos de bibliotecas de cDNA de tripomastigotas WT.

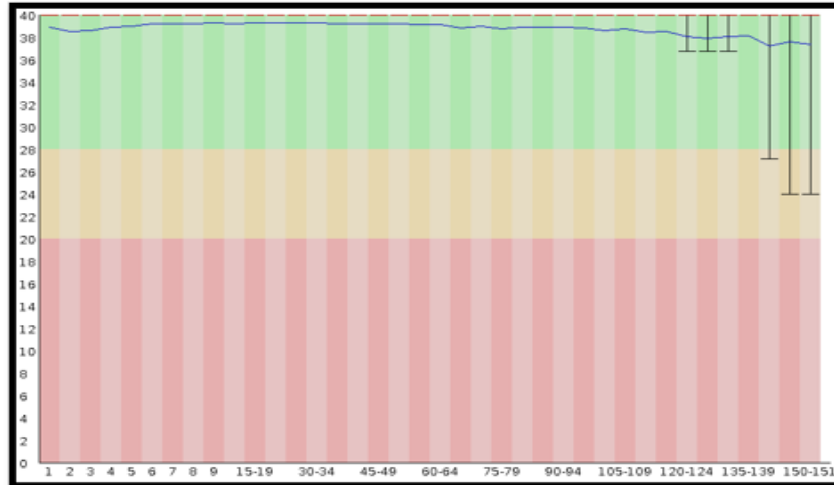
Qualidade de *reads* (*forward*) por base baseada na pontuação de *phred score* (eixo y) para cada uma das três bibliotecas geradas.

A) antes da remoção das *reads* de baixa qualidade (coluna esquerda) e **B).** Depois da remoção das *reads* de baixa qualidade (coluna direita).

A) ANTES DA REMOÇÃO DAS *READS*

TCT_KO7_1

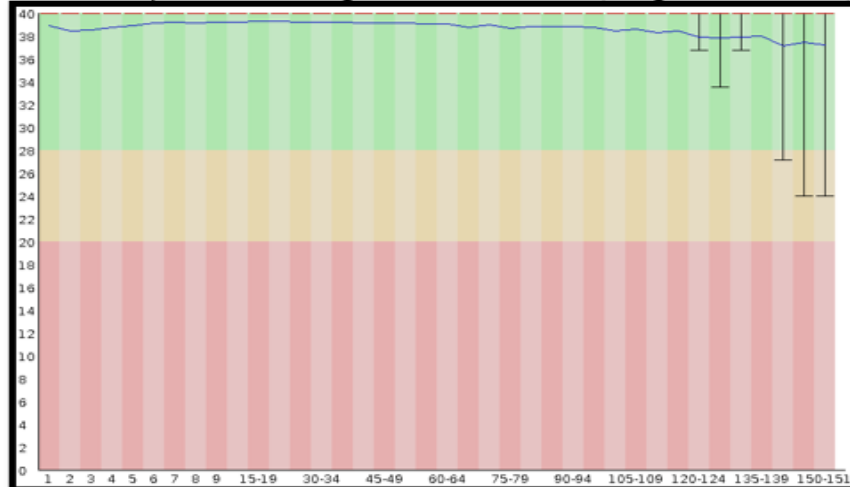
Scores de qualidade ao longo de todas as bases (Sanger/ Illumina 1.9)



Posição na *read* (pb)

TCT_KO7_2

Scores de qualidade ao longo de todas as bases (Sanger/ Illumina 1.9)



Posição na *read* (pb)

B) DEPOIS DA REMOÇÃO DAS *READS*

TCT_KO7_1

Scores de qualidade ao longo de todas as bases (Sanger/ Illumina 1.9)



Posição na *read* (pb)

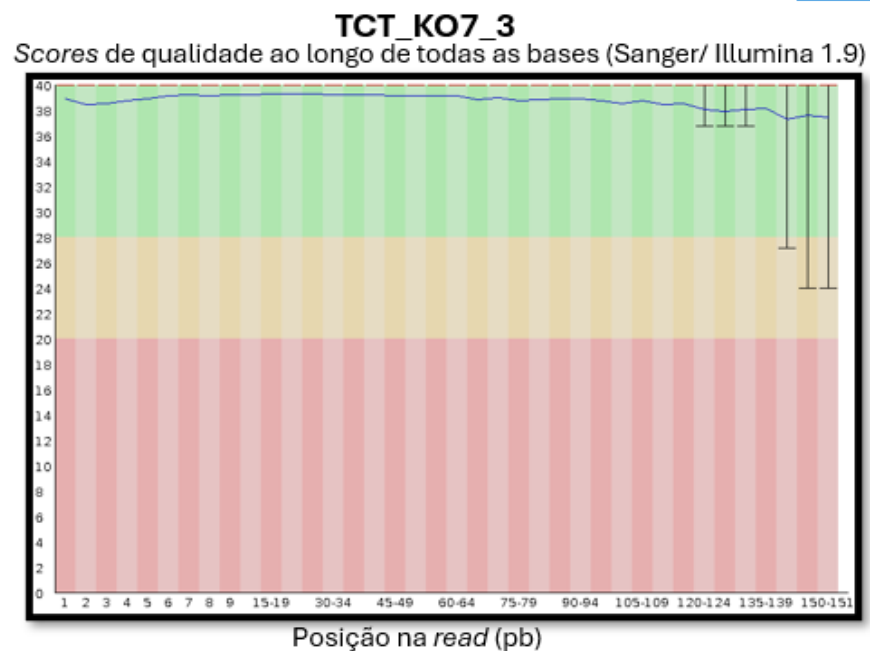
TCT_KO7_2

Scores de qualidade ao longo de todas as bases (Sanger/ Illumina 1.9)



Posição na *read* (pb)

A) ANTES DA REMOÇÃO DAS READS



B) DEPOIS DA REMOÇÃO DAS READS

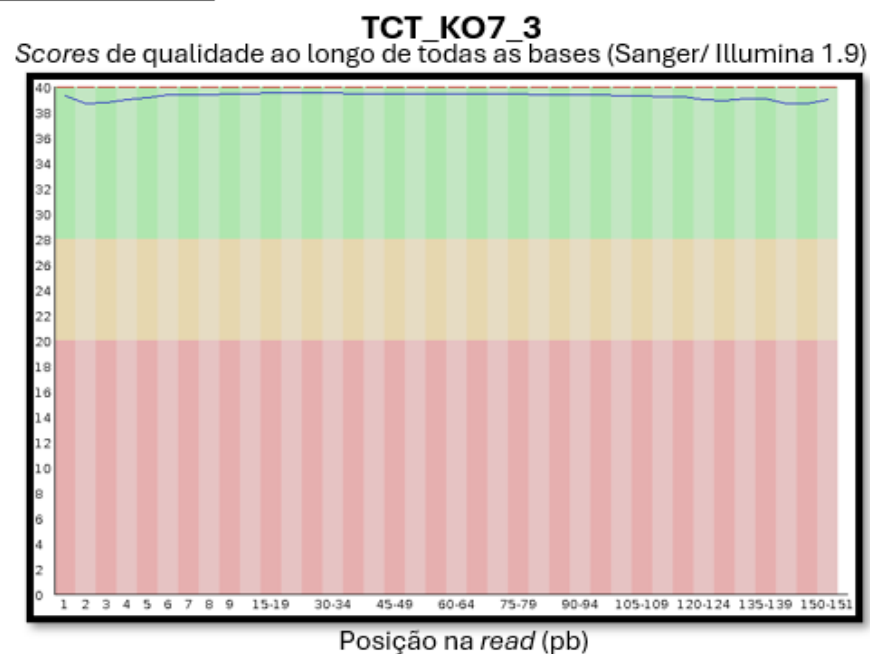


Figura 15. Gráficos de qualidade por base de reads brutas oriundos de bibliotecas de cDNA de tripomastigotas aTS-KØ (KO7). Qualidade de reads (forward) por base baseada na pontuação de phred score (eixo y) para cada uma das três bibliotecas gerados. **A)** antes da remoção das reads de baixa qualidade (coluna esquerda) e **B).** Depois da remoção das reads de baixa qualidade (coluna direita).

4.1.3. Mapeamentos e contagem de *reads* mapeadas no genoma do clone CL Brener de *Trypanosoma cruzi* – haplótipo Esmeraldo e genoma completo

Considerando as *reads paired-end* que passaram pelo filtro de qualidade, foram mapeadas as bibliotecas no genoma anotado de *T. cruzi*, contra o haplótipo Esmeraldo-like e contra o genoma completo (incorporada as sequências *unassigned*) da cepa CL Brener de *T. cruzi* (Tabela 6). No mapeamento contra o haplótipo Esmeraldo-like, foi obtido uma média de aproveitamento de 11,3 milhões de *reads* (64,59%) quando consideradas *reads* mapeadas em um único *locus* e uma média de 1,93 milhões de *reads* mapeadas em múltiplos *locus* (11%). Por outro lado, no mapeamento contra o genoma completo, a média aumentou em 5% (12,3 milhões de *reads* - 69,76%) considerando as *reads* mapeadas em um único *locus*, e dobrou a quantidade de *reads* quando considerado as *reads* mapeadas em múltiplos *locus* (cerca de 4,20 milhões de *reads* - 23,83%). Ou seja, com este mapeamento foi obtido um melhor aproveitamento das *reads* de 94%, considerando as *reads* que mapeiam em único *locus* (*reads unique-map*) e as *reads* que mapeiam em múltiplos *locus* (*reads multimap*).

Samples	Haplótipo mapeado	Número de <i>reads</i> unicamente mapeadas	Número de <i>reads</i> em múltiplos <i>locus</i>
1_TCTs_WT_1	Esmo	11.560.723 (65.43%)	1.938.564 (10.97%)
2_TCTs_WT_2	Esmo	11.723.455 (64.54%)	2.075.006 (11.42%)
3_TCTs_WT_3	Esmo	9.586.231 (63.10%)	1.942.440 (12.79%)
4_TCTs_KO7_1	Esmo	12.320.122 (64.18%)	2.061.532 (10.74%)
5_TCTs_KO7_2	Esmo	11.450.459 (64.33%)	1.934.654 (10.87%)
6_TCTs_KO7_3	Esmo	9.803.657 (64.46%)	1.688.243 (11.10%)

1_TCTs_WT_1	Esmo, Non-Esmo <i>Unassigned</i>	12.465.182 (70.55%)	4.273.500 (24.19%)
2_TCTs_WT_2	Esmo, Non-Esmo <i>Unassigned</i>	12.675.019 (69.78%)	4.434.990 (24,42%)
3_TCTs_WT_3	Esmo, Non-Esmo <i>Unassigned</i>	10.453.637 (68.81%)	3.845.382 (25.31%)
4_TCTs_KO7_1	Esmo, Non-Esmo <i>Unassigned</i>	13.262.344 (69.09%)	4.478.561 (23.33%)
5_TCTs_KO7_2	Esmo, Non-Esmo <i>Unassigned</i>	12.363.877 (69.47%)	4.164.016 (23.40%)
6_TCTs_KO7_3	Esmo, Non-Esmo <i>Unassigned</i>	10.632.145 (69.91%)	3.619.042 (23.80%)

Tabela 6. Resultado dos dois mapeamentos das bibliotecas.

Resultado dos dois mapeamentos das bibliotecas. Foi utilizado as duas estratégias de mapeamento para análises do compartimento core e disruptivo: **1)** mapeamento realizado contra o haplótipo Esmeraldo-like e **2)** mapeamento realizado contra o genoma completo (Haplótipos Esmeraldo e Não-esmeraldo) e região com genes não-atribuídos a nenhum dos haplótipos (*unassigned*).

4.1.4. Análise da heterogeneidade entre as bibliotecas sequenciadas

A taxa de heterogeneidade entre as bibliotecas foi analisada por PCA (Figura 16). Para esta análise, inicialmente foram consideradas todas as seis amostras. Agruparam-se as replicatas de amostras pertencentes aos grupos tripomastigotas WT e tripomastigotas KO7 respectivamente e foram identificados dois grupos distintos no plano horizontal, apresentando uma alta variância de 78%. No plano vertical, foi observada uma baixa variância de 16% entre amostras de um mesmo grupo (Figura 16.A). Entretanto, foi detectado que a amostra 3_TCT_WT_3 ficou afastada das outras amostras do seu grupo, indicando que ela fosse um *outlier*. Portanto, com o objetivo de evitar uma grande variação entre as amostras de um mesmo grupo, e consequentemente erros nas análises, foi necessária sua exclusão para dar continuidade com as seguintes etapas. Posteriormente, foi realizado uma nova PCA

(Figura 16.B), considerando somente duas amostras do grupo tripomastigotas WT e 3 amostras do grupo tripomastigotas KO7. Em comparação com a primeira análise, foi mantida uma alta variância de 77% entre os grupos. Também, ocorreu uma melhora de 4% de variância entre amostras do mesmo grupo (12%).

Desta forma, este resultado permitiu que seguissemos as análises com 1 duplicata (1_TCT_WT_1 e 2_TCT_WT_2) para representar o grupo tripomastigotas WT e uma triplicata (4_TCT_KO7_1, 5_TCT_KO7_2 e 6_TCT_KO7_3) para representar o grupo tripomastigotas KO7.

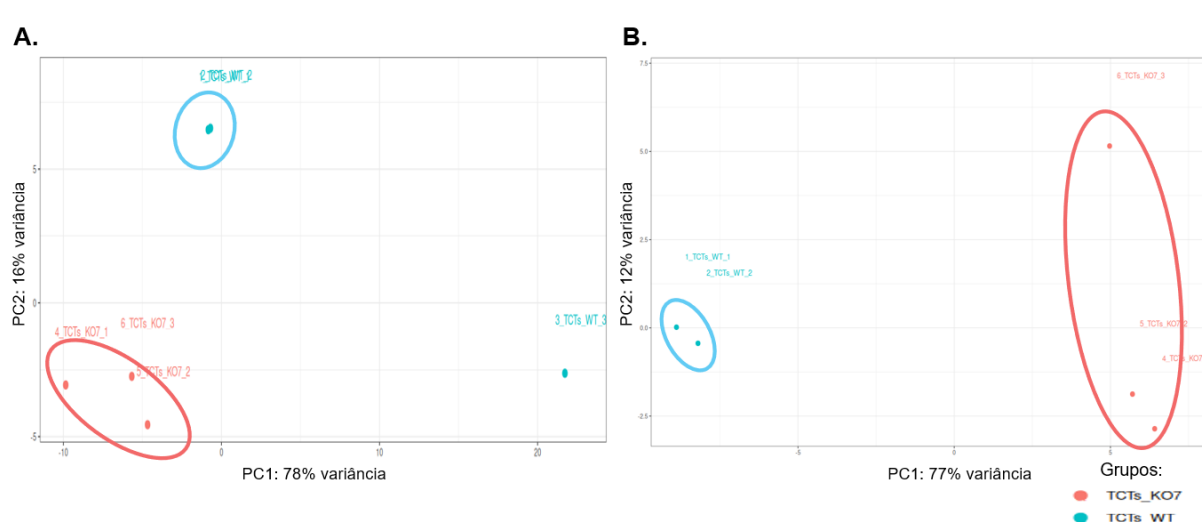


Figura 16. Análise de Componente Principal (PCA).

A. Análise realizada contendo todas as bibliotecas de cDNA. **B.** Análise realizada na exclusão do possível *outlier* (biblioteca cDNA TCTs WT 3). As elipses laranja e azul marcam os 2 principais grupos da análise: TCT WT e TCT KO7 (nocaute para aTS).

4.1.5. Análise dos genes da família *trans*-sialidases (grupo I) alvos do nocaute

Foram analisados os 11 genes de *trans*-sialidases ativas, alvos para nocaute. Observou-se que desses 11 genes, apenas três (27%) IDs TcCLB.510787.10, TcCLB.509495.30 e TcCLB.507085.30, apresentaram diferenças claras no alinhamento das reads entre os grupos de amostras (Figura 17). Em tripomastigotas WT, *reads* foram mapeadas nas regiões catalíticas desses genes, enquanto nas amostras tripomastigotas KO7, nessas mesmas regiões elas estavam ausentes. Isso indica uma provável interrupção ou ausência de transcrição, possivelmente em consequência do nocaute.

Também foi observado que dois genes (18%) IDs: TcCLB.508857.30 e TcCLB.508089.10 não apresentam *reads* mapeadas nas regiões catalíticas em

nenhum dos grupos de amostras, sugerindo que provavelmente esses genes não estão sendo transcritos em nenhum dos grupos. Por outro lado, na maioria dos genes analisados (55%), IDs: TcCLB.511323.10, TcCLB.507979.30, TcCLB.509817.50, TcCLB.506975.80, TcCLB.505931.30 e TcCLB.503993.10 foram detectadas grandes quantidades de *reads* mapeadas nas regiões catalíticas em ambos os grupos (Figura 17). Isso sugere que, possivelmente está ocorrendo a transcrição destes genes tanto em tripomastigotas WT, quanto em tripomastigotas KO7. Além disso, através destas análises foi possível observar que os três genes que apresentaram diferenças no alinhamento das *reads* entre os grupos tripomastigotas WT e tripomastigotas nocautes para aTS, apresentaram uma maior quantidade de repetições SAPA em comparação aos demais genes analisados (Tabela 7).

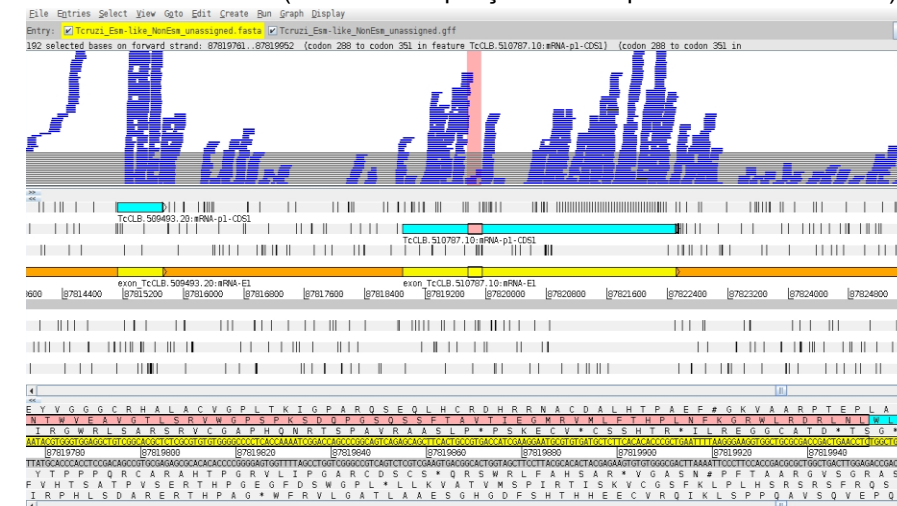
Identificação do gene	<i>Reads</i> mapeadas na região catalítica das aTS no grupo Tripomastigotas WT	<i>Reads</i> mapeadas na região catalítica das aTS no grupo Tripomastigotas KO7	Quantidade de repetições SAPA
TcCLB.510787.10 *	Presente	Ausente	41
TcCLB.509495.30 *	Presente	Ausente	19
TcCLB.507085.30 *	Presente	Ausente	15
TcCLB.508857.30	Ausente	Ausente	3
TcCLB.508089.10	Ausente	Ausente	3
TcCLB.511323.10	Presente	Presente	7
TcCLB.507979.30	Presente	Presente	6
TcCLB.509817.50	Presente	Presente	3
TcCLB.506975.80	Presente	Presente	2
TcCLB.505931.30	Presente	Presente	1
TcCLB.503993.10	Presente	Presente	1

Tabela 7. Mapeamento de reads nas regiões catalíticas dos genes de *Trans*-sialidases ativas (aTS) alvos de nocaute em *Trypanosoma cruzi*.

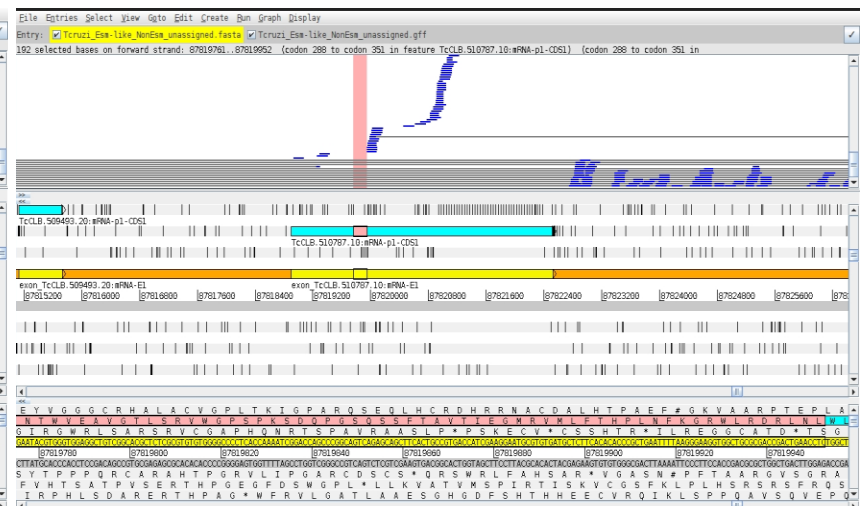
Comparação do alinhamento de *reads* nas regiões catalíticas dos genes de aTS nos grupos tripomastigotas selvagens (WT) e nos tripomastigotas nocautes para aTS (KO7). Os genes destacados com asterisco (*) apresentaram *reads* mapeadas apenas no grupo tripomastigotas WT, sugerindo possível interrupção da transcrição após o nocaute. Dois genes não apresentaram *reads* em nenhum dos grupos e na maioria foi detectado alinhamento de *reads* em ambos os grupos.

TRIPOMASTIGOTAS WT

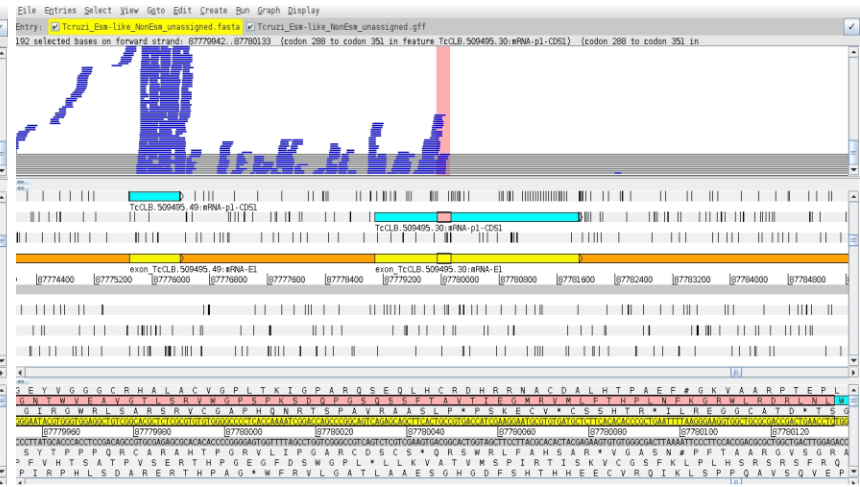
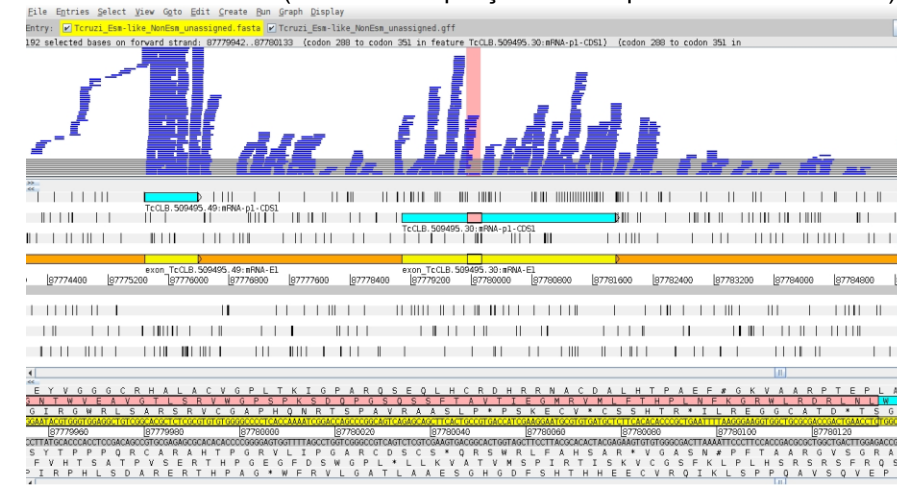
ID: TcCLB.510787.10 (contém 41 repetições de sequências motivo SAPA)



TRIPOMASTIGOTAS KO7



ID: TcCLB.509495.30 (contém 19 repetições de sequências motivo SAPA)

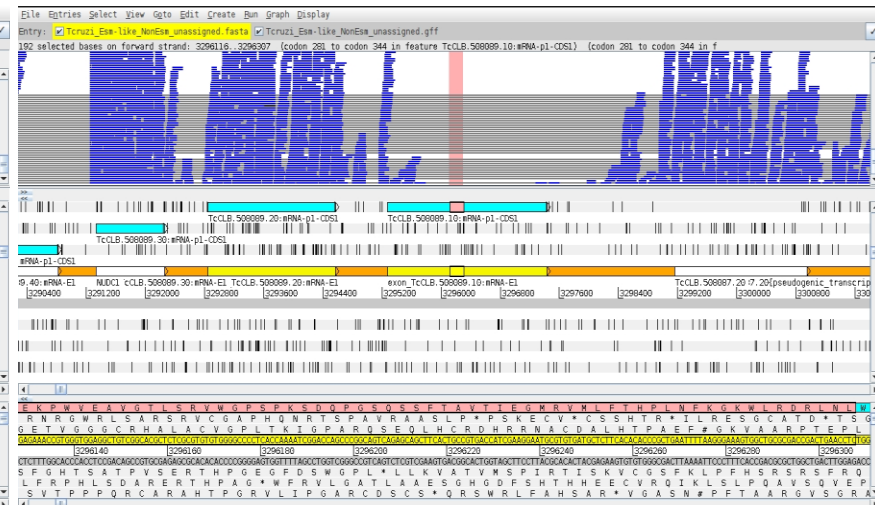


TRIPOMASTIGOTAS WT

ID: TcCLB.508089.10 (contém 3 repetições de sequências motivo SAPA)



TRIPOMASTIGOTAS KO7

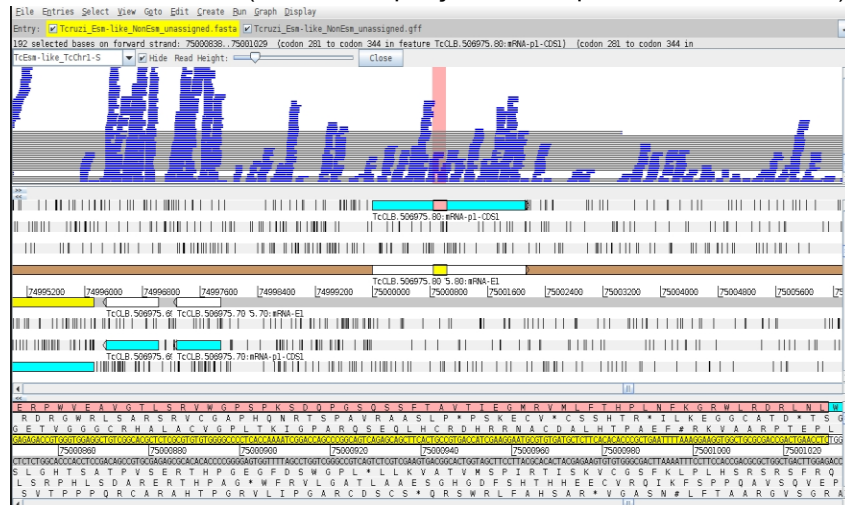


ID: TcCLB.511323.10 (contém 7 repetições de sequências motivo SAPA)

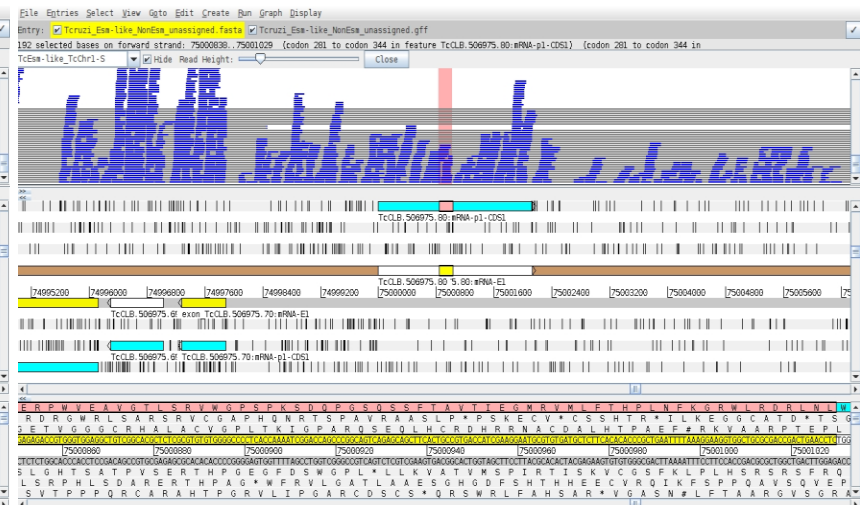


TRIPOMASTIGOTAS WT

ID: TcCLB.506975.80 (contém 2 repetições de seqüências motivo SAPA)



TRIPOMASTIGOTAS KO7



ID: TcCLB.505931.30 (contém 1 seqüência motivo SAPA)



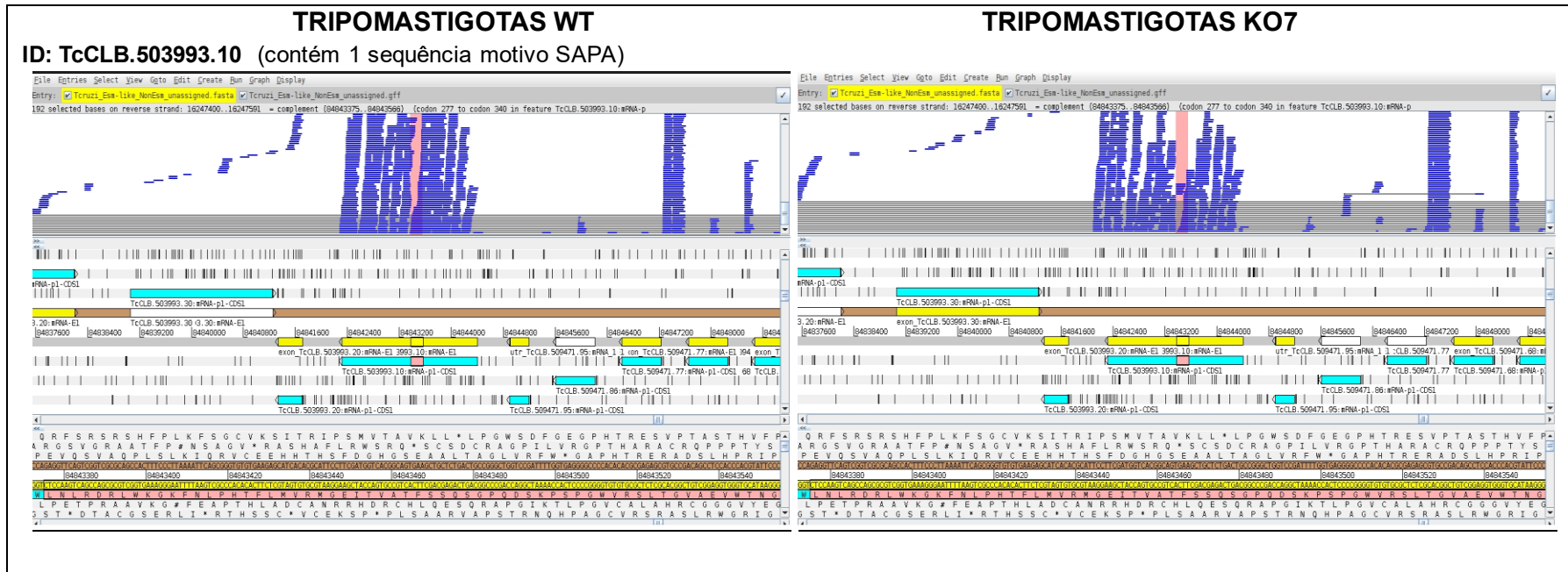


Figura 17. Visualização de *reads* mapeadas em genes aTS alvos para nocaute.

A imagem mostra os genes aTS alvos para nocaute. Uma captura gráfica que destaca um trecho da região protéica com a sequência de aminoácidos do motivo conservado Asp-box até a sequência da região que foi utilizada como marcador de homologia presentes nas *trans*-sialidasas para o molde de reparo. As *reads* alinhadas na região são mostradas empilhadas na cor azul. Amostras de RNA analisadas: TCT_WT_1 (esquerda) e TCT_KO7_1 (direita).

4.1.6. Análise de expressão diferencial dos genes

Foram construídas duas tabelas com as contagens brutas de *reads* mapeadas por gene para as cinco bibliotecas, considerando apenas as *reads* mapeadas em um único *locus*. Essas tabelas foram geradas a partir dos dois mapeamentos realizados separadamente e serviram de entrada para as análises de expressão diferencial dos compartimentos *core* e *disruptivo*. Foram encontrados um total 9.041 genes quando considerado o mapeamento contra o haplótipo Esmeraldo-like e 19.630 genes quando considerado o mapeamento contra o genoma completo. Estas tabelas foram utilizadas para execução das análises de expressão diferencial entre tripomastigotas nocautes para aTS (KO7) e tripomastigotas WT.

As análises de expressão diferencial foram conduzidas utilizando o pacote estatístico Deseq2 e os parâmetros estabelecidos para que os genes fossem considerados diferencialmente expressos foram $\text{padj} < 0,05$ e $\text{Log2FoldChange} > 1,5$ e $< -1,5$, ou seja, apenas os genes que contenham uma mudança de maior magnitude.

Para cada abordagem foram obtidos diferentes resultados que serão abordados com mais detalhes a seguir.

4.1.7. Análises realizadas para o compartimento *core*

Inicialmente, com a finalidade de explorar os dados obtidos nas análises para o compartimento *core* foi gerado um gráfico de vulcão com a comparação de todos os genes diferencialmente expressos ($\text{padj} < 0,05$) do grupo tripomastigotas KO7 em comparação ao grupo tripomastigotas WT. Foi possível ser observado que grande parte dos genes estão concentrados próximo ao centro do gráfico ($\text{log2FoldChange} = 0$) (Figura 18), sugerindo que parece haver poucas mudanças na expressão de genes presentes no compartimento *core* de tripomastigotas KO7 quando comparado com tripomastigotas WT.

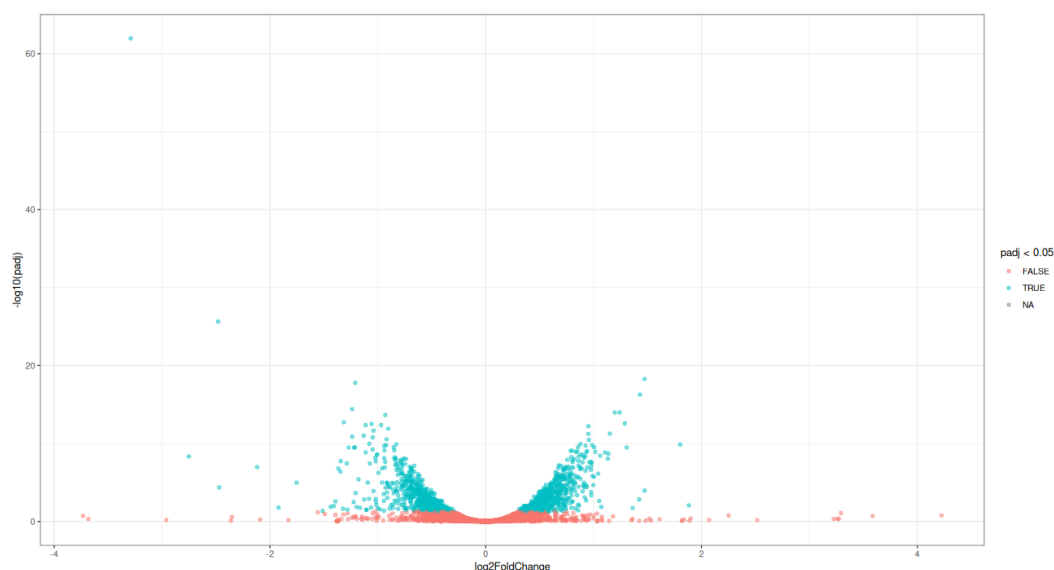


Figura 18. Gráfico de vulcão dos genes diferencialmente expressos entre os grupos tripomastigotas KO7 e WT para análise do compartimento core.

No gráfico, o eixo X representa o log2FoldChange e no eixo Y o $-\log_{10}(\text{p valor adj})$. Genes diferencialmente expressos ($\text{padj} < 0,05$) estão destacados em azul.

Nas análises de genes diferencialmente expressos foram identificados apenas um gene com a expressão aumentada (Tabela 8) e seis GDEs com a expressão diminuída (Tabela 9). O único gene TcCLB.506825.10 que está regulado positivamente possui função de uma proteína de ligação ao RNA de fita dupla (RBPs). Dos seis genes que estão regulados negativamente, apenas dois não são hipotéticos (TcCLB.507537.20 e TcCLB.507603.270) e exercem funções similares de proteases de resíduos de cisteína. Os demais genes encontrados são hipotéticos e não foram o foco deste trabalho. O conjunto destas evidências sugerem que o nocaute para aTS em tripomastigotas da cepa CL Brener de *T. cruzi* não promoveu alterações significativas no metabolismo dos parasitos.

Também, é importante ressaltar que as análises para validação dos níveis de expressão dos genes apontados serão futuramente realizadas por meio da técnica *Real Time-PCR*.

ID do gene	Log2FC	p-valor ajustado	Anotação
TcCLB.506825.10	1,89	0,0087	DRBD12

Tabela 8. Gene com expressão aumentada em tripomastigotas nocaute para aTS em comparação com tripomastigotas wild-type.

Considerando apenas genes do compartimento core. Na tabela são apresentados o identificador do gene, Log2FC: valor de log2FoldChange, p-valor ajustado e a anotação funcional.

ID do gene	Log2FC	p-valor ajustado	Anotação
TcCLB.511611.40	-1,511	0,0440	proteína hipotética
TcCLB.506529.370	-2,119	1,06E-07	proteína hipotética
TcCLB.510071.20	-2,471	4,11E-05	proteína hipotética
TcCLB.507603.270	-2,481	2,22E-26	principal cisteína proteinase putativa
TcCLB.507537.20	-2,752	4,50E-09	cisteína peptidase putativa
TcCLB.509551.60	-3,291	1,12E-62	proteína hipotética conservada

Tabela 9. Genes com expressão diminuída em tripomastigotas nocaute para aTS em comparação com tripomastigotas *wild-type*.

Considerando apenas genes do compartimento *core*. Na tabela são apresentados o identificador do gene, Log2FC: valor de log2FoldChange, p-valor ajustado e a anotação funcional.

4.1.8. Análises realizadas para o compartimento disruptivo

Com o objetivo de investigar a expressão gênica no compartimento disruptivo, foi gerado um novo gráfico de vulcão. Neste gráfico foram comparados todos os genes diferencialmente expressos ($p_{adj} < 0,05$) entre os grupos de tripomastigotas KO7 e tripomastigotas WT.

Nesta análise, diferente da abordagem anterior que considerava *reads* mapeadas apenas contra o Haplótipo Esmeraldo-like, foram utilizadas as *reads* mapeadas contra o genoma completo. Como resultado observou-se uma maior quantidade de genes diferencialmente expressos e, aumento na dispersão dos genes ao longo do eixo log2FoldChange (Figura 19), indicando provavelmente alterações mais amplas e significativas na expressão de genes associados ao compartimento disruptivo em tripomastigotas KO7 em relação ao grupo tripomastigotas WT.



Figura 19. Gráfico de vulcão dos genes diferencialmente expressos entre os grupos tripomastigotas KO7 e WT para análise do compartimento disruptivo.

No gráfico, o eixo X representa o log2FoldChange e no eixo Y o $-\log_{10}(\text{p valor adj})$. Genes diferencialmente expressos ($\text{padj} < 0,05$) estão destacados em azul.

Para obter uma caracterização mais detalhada dos genes presentes nas análises do compartimento disruptivo, foi realizada uma comparação com as três maiores famílias multigênicas do parasito: MASPs, *trans*-sialidases e mucinas. Foram considerados apenas os genes diferencialmente expressos com $\log_2\text{FoldChange} > 1,5$ e p-valor ajustado $< 0,05$.

Nessa análise, observou-se que a família MASP apresentou o maior número de genes com expressão aumentada (25 genes), seguida pelas *trans*-sialidases (12 genes) e, por fim, pelas mucinas (7 genes) (Figura 20). Esse perfil de expressão sugere um possível papel compensatório dessas famílias, em especial da MASP e *trans*-sialidases, em resposta à diminuição/eliminação da expressão dos genes que codificam as aTS, possivelmente contribuindo para a adaptação ou manutenção de funções primordiais para forma tripomastigota infectiva do parasito.

Vale destacar que, entre os 12 genes da família *trans*-sialidases com expressão aumentada, metade pertencem ao subgrupo V (Tabela 11), cuja função ainda não foi completamente elucidada, o que também levanta questões sobre o possível envolvimento desse subgrupo em mecanismos compensatórios ou funções até então desconhecidas no contexto do nocaute das aTS, como por exemplo, a incapacidade de causar parasitemia *in vivo*.

Adicionalmente, também é importante salientar que por meio destas análises foram identificados com expressão diminuída, os três genes aTS mais prováveis de que tenham sido nocauteados (IDs: TcCLB.507085.30, TcCLB.509495.30 e TcCLB.510787.10) (Tabela 12). Corroborando o resultado encontrado descrito no item 4.1.3. (Análise para verificação dos genes da família *trans*-sialidases grupo I alvos do nocaute), onde demonstra a ausência de *reads* mapeadas nas regiões catalíticas apenas no grupo tripomastigotas KO7. Estes achados reforçam a robustez dos resultados aqui presentes.

Outra evidência relevante, foi encontrado um predomínio de genes com expressão diminuída 2 vezes maior do que genes com expressão aumentada (Tabela 10), tanto nas análises que investigam o compartimento core quanto nas análises que investigam o compartimento disruptivo, o que também sugere, que o nocaute das aTS pode provocar uma regulação negativa mais ampla, afetando principalmente os genes do compartimento disruptivo.

GDEs	MASP	Mucinas	TS	Quant. total de genes
nº de genes com expressão aumentada	25	7	12	44
nº de genes com expressão diminuída	46	38	27	111

Tabela 10. Quantidade de genes das principais famílias multigênicas com expressão aumentada e diminuída em tripomastigotas nocaute para aTS em comparação com tripomastigotas *wild-type*.

Considerando apenas genes do compartimento disruptivo. Na tabela são apresentadas as quantidades de genes diferencialmente expressos (p valor adj. $< 0,05$ e $\log_2FC > 1,5$ e $< -1,5$) das principais famílias multigênicas. GDEs: Genes diferencialmente expressos, MASP: *Mucin-Associated Surface Proteins*, TS: *trans*-sialidases.

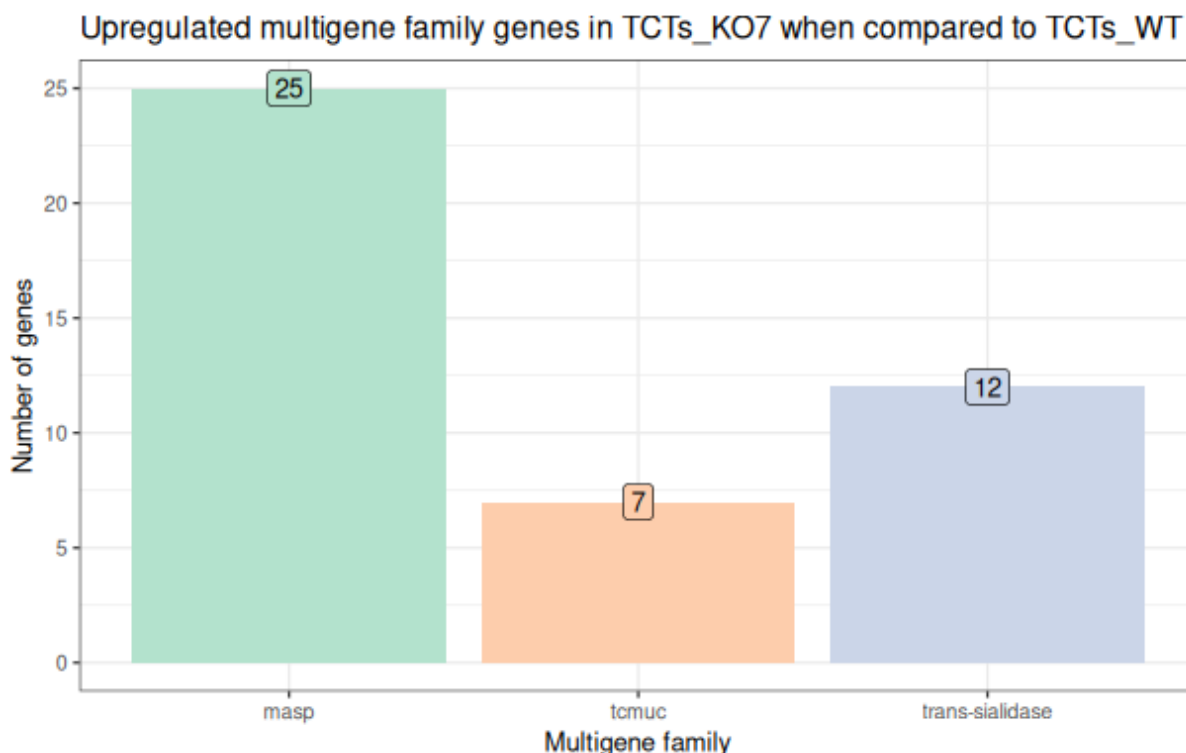


Figura 20. Histograma representando o número de genes diferencialmente expressos aumentados nas principais famílias multigênicas em tripomastigotas nocautes para aTS (KO7) quando comparado ao grupo de tripomastigotas WT.

Famílias multigênicas: MASP: *Mucin-Associated Surface Proteins*, tcmuc: mucinas e *trans*-sialidases

ID do gene	Log2FC	p-valor ajustado	Anotação
TcCLB.506899.40	10,10	2,708E-10	mucin TcMUCII putative
TcCLB.510047.80	6,80	4,564E-11	<i>trans</i> -sialidase Group V putative
TcCLB.510047.109	6,49	1,9E-15	mucin TcMUCII putative
TcCLB.510047.129	6,38	0,0008962	mucin TcMUCII putative
TcCLB.506901.10	6,06	0,0008899	mucin TcMUCI putative
TcCLB.508939.30	6,06	4,732E-07	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S043
TcCLB.448661.10	4,03	0,0101923	Mucin-associated surface protein (MASP) (fragment)
TcCLB.510831.21	3,88	1,236E-15	<i>trans</i> -sialidase putative (fragment)
TcCLB.507145.60	3,64	0,0004259	<i>trans</i> -sialidase Group V putative
TcCLB.508999.150	3,25	0,0011996	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S016
TcCLB.510629.150	2,35	0,0007346	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S097
TcCLB.506879.10	2,29	6,533E-20	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S114
TcCLB.505317.9	2,29	3,049E-10	<i>trans</i> -sialidase putative (fragment)
TcCLB.510629.30	2,20	0,0003716	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S097

TcCLB.511233.140	2,18	1,516E-06	<i>trans</i> -sialidase Group V putative
TcCLB.510629.10	2,12	1,341E-10	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S043
TcCLB.504201.50	2,06	3,678E-12	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S025
TcCLB.504201.30	2,00	1,389E-05	<i>trans</i> -sialidase Group V putative
TcCLB.510627.60	2,00	4,057E-06	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S089
TcCLB.510625.190	2,00	0,0144431	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S096
TcCLB.448661.20	1,99	2,622E-08	mucin TcMUCII putative
TcCLB.510627.150	1,99	6,023E-05	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S097
TcCLB.508161.30	1,97	6,846E-14	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S055
TcCLB.510629.70	1,95	6,145E-12	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S086
TcCLB.510627.80	1,92	0,0021757	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S097
TcCLB.506361.50	1,92	7,1E-10	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S100
TcCLB.504787.40	1,89	0,0001359	<i>trans</i> -sialidase Group V putative
TcCLB.511059.10	1,87	1,163E-05	<i>trans</i> -sialidase putative
TcCLB.510627.128	1,87	0,0001315	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S097
TcCLB.509631.90	1,86	1,737E-11	mucin TcMUCII putative
TcCLB.505949.20	1,83	0,0036067	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S008
TcCLB.504787.20	1,82	3,04E-09	mucin TcMUCII putative
TcCLB.463323.10	1,82	4,034E-10	<i>trans</i> -sialidase Group II putative
TcCLB.397923.10	1,81	6,486E-06	Mucin-associated surface protein (MASP) (fragment)
TcCLB.510543.70	1,80	4,221E-09	<i>trans</i> -sialidase Group II putative
TcCLB.510627.110	1,79	2,924E-11	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S097
TcCLB.510627.190	1,79	0,0080935	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S097
TcCLB.511173.470	1,77	0,0044459	<i>trans</i> -sialidase Group V putative
TcCLB.510917.9	1,71	2,741E-23	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S061
TcCLB.504201.40	1,66	1,602E-09	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S082
TcCLB.504787.30	1,64	2,058E-05	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S004
TcCLB.508163.50	1,61	1,45E-06	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S048
TcCLB.506307.10	1,57	2,347E-14	Mucin-associated surface protein (MASP)
TcCLB.507867.5	1,51	0,0487166	<i>trans</i> -sialidase putative (fragment)

Tabela 11. Genes com expressão aumentada em tripomastigotas nocaute para aTS em comparação com tripomastigotas *wild-type*.

Considerando apenas genes do compartimento disruptivo. Na tabela são apresentados o identificador do gene, Log2FC: valor de log2FoldChange, p-valor ajustado e a anotação funcional.

ID do gene	Log2FC	p-valor ajustado	Anotação
TcCLB.508495.140	-11,91	5,206E-21	mucin TcMUCII putative
TcCLB.507085.170	-11,88	5,030E-21	mucin TcMUCII putative
TcCLB.507085.150	-11,58	8,313E-20	Mucin-associated surface protein (MASP)
TcCLB.506923.21	-11,12	2,334E-18	mucin TcMUCII putative
TcCLB.509493.110	-11,07	4,174E-18	mucin TcMUCII putative
TcCLB.507085.60	-11,00	9,079E-18	mucin TcMUCII putative
TcCLB.509493.20	-10,96	1,048E-17	mucin TcMUCII putative
TcCLB.509493.39	-10,95	7,259E-18	mucin TcMUCII putative
TcCLB.508495.50	-10,73	3,540E-17	mucin TcMUCII putative
TcCLB.509493.80	-10,59	3,378E-22	mucin TcMUCII putative
TcCLB.508495.70	-10,57	2,072E-16	mucin TcMUCII putative
TcCLB.507085.140	-10,40	7,553E-16	mucin TcMUCII putative
TcCLB.508495.170	-10,38	8,341E-16	mucin TcMUCII putative
TcCLB.508495.200	-10,13	5,588E-15	mucin TcMUCII putative
TcCLB.508495.100	-9,28	2,909E-12	<i>trans</i> -sialidase Group V putative
TcCLB.503519.30	-8,96	2,603E-11	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S082
TcCLB.503519.20	-8,51	1,662E-10	mucin TcMUCII putative
TcCLB.401569.10	-5,04	6,745E-07	<i>trans</i> -sialidase putative
TcCLB.509753.220	-4,81	2,348E-06	mucin TcMUCII putative
TcCLB.509947.10	-4,23	3,569E-23	mucin TcMUCII putative
TcCLB.509685.40	-3,69	1,816E-45	<i>trans</i> -sialidase Group V putative
TcCLB.506139.100	-3,67	6,921E-34	mucin TcMUCII putative
TcCLB.510193.10	-3,64	3,394E-02	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S030
TcCLB.507729.50	-3,61	5,912E-18	Mucin-associated surface protein (MASP) (fragment)
TcCLB.506139.110	-3,49	7,286E-48	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S072
TcCLB.504155.170	-3,43	5,888E-10	mucin TcMUCII putative
TcCLB.506451.20	-3,36	3,427E-37	<i>trans</i> -sialidase Group V putative
TcCLB.506139.40	-3,27	7,700E-57	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S024
TcCLB.509755.40	-3,22	1,387E-03	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S036
TcCLB.508435.10	-3,21	3,633E-20	Mucin-associated surface protein (MASP)
TcCLB.508435.70	-3,16	2,675E-21	Mucin-associated surface protein (MASP)
TcCLB.506453.10	-3,15	7,775E-07	<i>trans</i> -sialidase putative
TcCLB.506139.120	-3,14	2,750E-10	<i>trans</i> -sialidase Group V putative

TcCLB.506139.160	-3,12	1,421E-31	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S100
TcCLB.506139.80	-3,08	3,636E-15	mucin TcMUCII putative
TcCLB.508435.20	-3,07	9,362E-12	mucin TcMUCII putative
TcCLB.506139.70	-3,02	6,001E-28	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S066
TcCLB.506453.30	-3,00	4,592E-31	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S008
TcCLB.398265.9	-2,92	8,876E-07	<i>trans</i> -sialidase putative
TcCLB.508433.180	-2,91	1,923E-23	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S003
TcCLB.509265.90	-2,81	3,103E-05	<i>trans</i> -sialidase Group II putative
TcCLB.507731.10	-2,77	1,000E-06	Mucin-associated surface protein (MASP)
TcCLB.509753.300	-2,76	1,891E-12	mucin TcMUCII putative
TcCLB.509753.110	-2,72	1,281E-08	mucin TcMUCII putative
TcCLB.510933.30	-2,69	1,150E-03	mucin TcMUCII putative
TcCLB.507085.30 *	-2,64	5,163E-19	<i>trans</i> -sialidase Group I putative
TcCLB.508433.233	-2,63	3,740E-02	Mucin-associated surface protein (MASP) (fragment)
TcCLB.510933.190	-2,61	7,259E-18	mucin TcMUCII putative
TcCLB.510279.190	-2,56	9,118E-05	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S084
TcCLB.510539.10	-2,51	2,429E-13	Mucin-associated surface protein (MASP)
TcCLB.509753.150	-2,51	2,748E-06	mucin TcMUCII putative
TcCLB.510933.20	-2,51	9,003E-18	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S033
TcCLB.509753.250	-2,50	4,929E-18	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S072
TcCLB.509495.30 *	-2,50	1,824E-12	<i>trans</i> -sialidase Group I putative
TcCLB.508433.220	-2,49	5,432E-19	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S099
TcCLB.509753.140	-2,48	1,390E-06	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S082
TcCLB.509753.100	-2,43	1,836E-10	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S082
TcCLB.509755.10	-2,40	2,651E-04	<i>trans</i> -sialidase Group V putative
TcCLB.509753.194	-2,40	2,702E-12	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S070
TcCLB.508433.170	-2,38	5,187E-04	mucin TcMUCII putative
TcCLB.509755.70	-2,38	1,078E-04	mucin TcMUCII putative
TcCLB.423205.10	-2,37	5,653E-11	<i>trans</i> -sialidase putative (fragment)
TcCLB.510933.90	-2,35	6,417E-17	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S080
TcCLB.506067.80	-2,32	3,500E-02	mucin TcMUCII putative
TcCLB.509753.240	-2,31	1,625E-05	mucin TcMUCII putative
TcCLB.507905.39	-2,29	1,989E-07	Mucin-associated surface protein (MASP)
TcCLB.511779.60	-2,28	9,438E-14	<i>trans</i> -sialidase Group III putative

TcCLB.506129.50	-2,27	1,608E-02	<i>trans</i> -sialidase Group IV putative
TcCLB.508327.10	-2,25	3,165E-14	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S099
TcCLB.508011.30	-2,23	8,534E-09	mucin TcMUCII putative
TcCLB.509753.310	-2,23	6,622E-16	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S066
TcCLB.509419.80	-2,22	7,025E-07	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S061
TcCLB.506139.10	-2,21	9,570E-03	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S087
TcCLB.508501.70	-2,20	4,986E-06	mucin TcMUCII putative
TcCLB.510279.110	-2,19	1,092E-09	<i>trans</i> -sialidase Group VI putative
TcCLB.510933.80	-2,18	3,976E-10	<i>trans</i> -sialidase Group V putative
TcCLB.508501.110	-2,17	8,173E-13	mucin TcMUCII putative
TcCLB.510279.140	-2,11	1,485E-13	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S049
TcCLB.509217.40	-2,10	2,811E-05	<i>trans</i> -sialidase Group V putative
TcCLB.507121.20	-2,03	4,960E-03	<i>trans</i> -sialidase Group VII putative
TcCLB.510279.120	-2,00	4,459E-07	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S066
TcCLB.503609.100	-1,99	1,035E-03	mucin TcMUCII putative
TcCLB.509265.110	-1,98	2,259E-02	<i>trans</i> -sialidase Group IV putative
TcCLB.507907.20	-1,97	1,970E-02	<i>trans</i> -sialidase Group II putative
TcCLB.508501.40	-1,97	2,263E-28	mucin TcMUCII putative
TcCLB.507959.80	-1,96	2,000E-07	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S034
TcCLB.509753.210	-1,96	3,348E-17	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S080
TcCLB.510197.20	-1,96	4,114E-21	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S093
TcCLB.509755.50	-1,94	3,357E-06	<i>trans</i> -sialidase Group V putative
TcCLB.506971.60	-1,89	5,364E-03	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S097
TcCLB.510787.10 *	-1,88	2,400E-16	<i>trans</i> -sialidase Group I putative
TcCLB.509377.20	-1,88	8,018E-16	<i>trans</i> -sialidase Group VII putative
TcCLB.504155.160	-1,87	3,742E-05	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S066
TcCLB.511613.10	-1,85	4,954E-06	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S052
TcCLB.508499.20	-1,82	4,380E-13	Mucin-associated surface protein (MASP)
TcCLB.508499.10	-1,81	2,054E-14	mucin TcMUCII putative
TcCLB.508481.20	-1,78	3,726E-05	Mucin-associated surface protein (MASP)
TcCLB.508501.140	-1,78	1,331E-11	mucin TcMUCII putative
TcCLB.508501.80	-1,77	3,704E-09	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S080
TcCLB.507997.14	-1,76	4,804E-03	<i>trans</i> -sialidase putative (fragment)
TcCLB.506067.240	-1,76	1,613E-05	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S032

TcCLB.509419.70	-1,74	4,175E-04	<i>trans</i> -sialidase Group V putative
TcCLB.511547.10	-1,74	4,331E-02	Mucin-associated surface protein (MASP)
TcCLB.506067.169	-1,71	2,764E-20	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S061
TcCLB.509419.90	-1,60	2,857E-05	<i>trans</i> -sialidase Group V putative
TcCLB.511611.20	-1,60	1,946E-02	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S110
TcCLB.509075.40	-1,57	4,578E-05	Mucin-associated surface protein (MASP)
TcCLB.507237.210	-1,56	4,171E-03	mucin TcMUCII putative
TcCLB.508125.100	-1,53	2,259E-02	mucin TcMUCII putative
TcCLB.506423.10	-1,52	3,397E-02	Mucin-associated surface protein (MASP) subgroup S095
TcCLB.508485.10	-1,51	1,138E-02	<i>trans</i> -sialidase Group II putative

Tabela 12. Genes com expressão diminuída em tripomastigotas nocaute para aTS em comparação com tripomastigotas *wild-type*.

Considerando apenas genes do compartimento disruptivo. Na tabela são apresentados os prováveis genes nocauteados destacados com asterisco (*), o identificador do gene, Log2FC: valor de log2FoldChange, p-valor ajustado e a anotação funcional.

4.2 ADAPTAÇÃO À DIFERENTES TIPOS CELULARES DA CEPA Y DE *Trypanosoma cruzi* EXPRESSANDO LUCIFERASE

4.2.1. Preparo do vetor pROCK e geração de uma linhagem de parasitos cepa Y expressando Luciferase

O processo de clonagem visando a inserção da sequência codificadora da Red-Shifted Luciferase no vetor pROCK foi bem-sucedido (Figura 21). A sequência previamente sintetizada e purificada a partir do vetor pUC foi devidamente inserida no vetor pTOPO, permitindo a sua digestão enzimática com XbaI e XhoI.

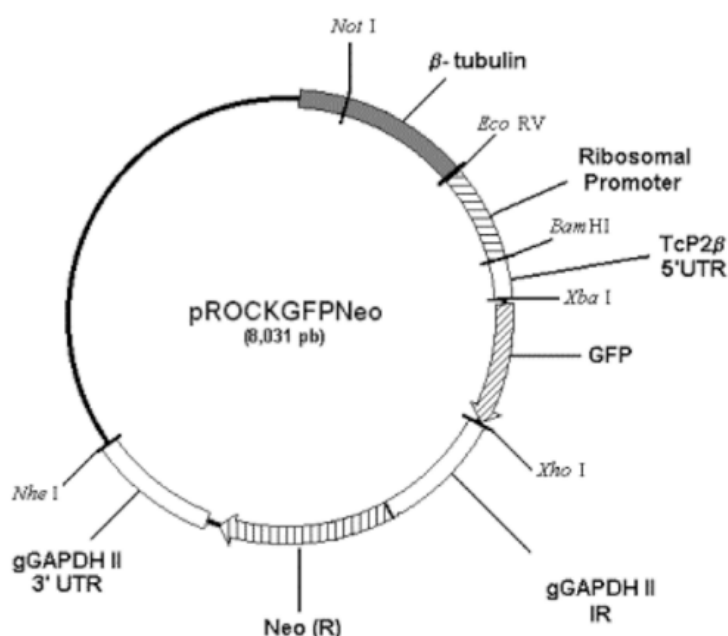


Figura 21. Mapa representativo do vetor pROCK.

A imagem mostra a representação do plasmídeo pROCK contendo os sítios: da inserção do plasmídeo (Beta-tubulina), promotor ribossomal, das enzimas de restrição e onde lê-se "GFP": sítio da sequência Luciferase (DaRocha et al., 2004),

Por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%, foi verificado e confirmado que os fragmentos digeridos pelas enzimas referentes a sequência Luciferase e o plasmídeo pROCK estavam íntegros (Figura 22: A), indicando a correta preparação do inserto e portanto, aptos a seguir para seguinte etapa de ligação.

Na etapa de transformação, a quimiocompetente *E. coli* que continha o vetor recombinante apresentou uma eficiência adequada, resultando em uma média de 30 colônias por placa, enquanto as placas controles apresentaram apenas 2 colônias em média (Figura 22: B). Esse resultado foi esperado, ou seja, as placas contendo as

colônias de bactérias que incorporaram o plasmídeo recombinante, e portanto, eram resistentes a ampicilina, cresceram 15X mais do que comparado com as placas controles, que não haviam adquirido a molécula de DNA circular.

As colônias transformadas foram analisadas por PCR de colônia para verificação da inserção correta da sequência luciferase. Dez colônias (CL1–CL10) apresentaram um produto de amplificação de aproximadamente 1800 pb, que corresponde ao tamanho esperado do gene da Luciferase, enquanto os controles negativos (CL11 e controle da reação) não apresentaram amplificação (Figura 22: C), confirmando a presença do inserto nas colônias selecionadas.

Foram realizadas análises adicionais por digestão enzimática do preparo do vetor com a sequência Luciferase utilizando as combinações XbaI/XhoI, EcoRI/BamHI e NotI. Revelou perfis de fragmentos com tamanhos esperados (1600 pb/7000 pb; 8000 pb/580 pb; e 8000 pb, respectivamente), confirmando a identidade do vetor recombinante e a inserção correta da sequência luciferase (Figura 22: D-E).

Por fim, o plasmídeo linearizado e precipitado (Figura 22: F) foi utilizado para transfecção de formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* por eletroporação. Após a adição progressiva do antibiótico G418, foi observada a morte completa dos parasitos do grupo controle, enquanto o grupo transfectado foi mantido em cultura, indicando a seleção positiva de uma população de parasitos geneticamente modificados, resistentes ao G418 e expressando Luciferase.

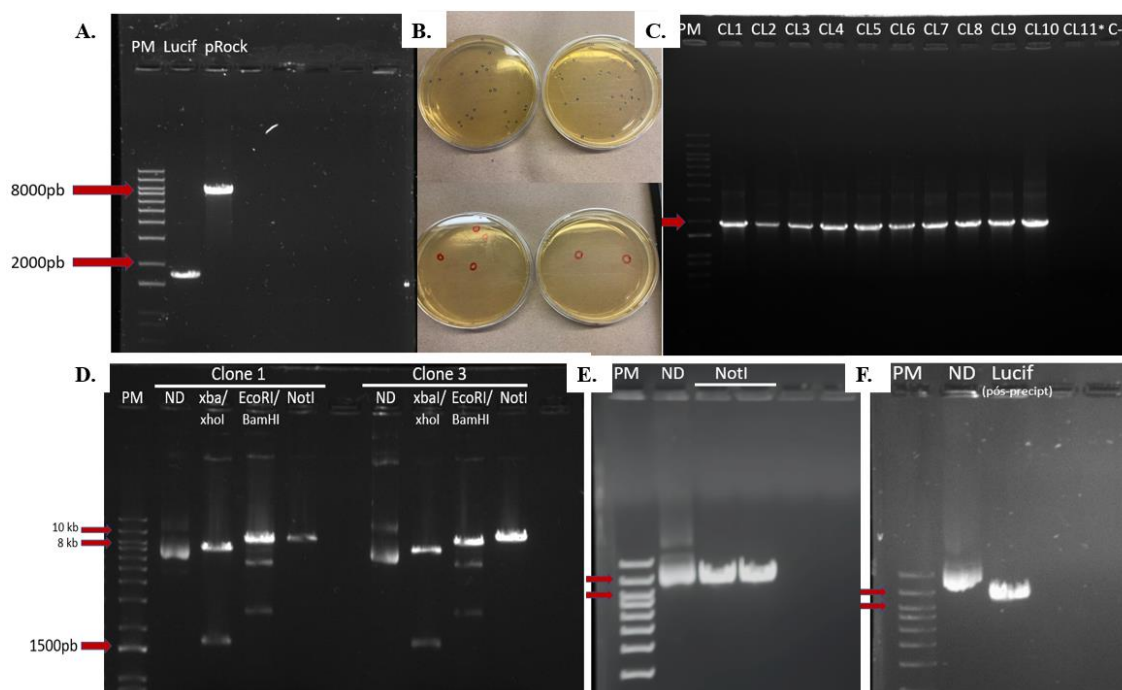


Figura 22. Geração e seleção de parasitos cepa Y *Trypanosoma cruzi* transfectados com o vetor pROCK Red-Shifted Luciferase.

(A) Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos da digestão do vetor recombinante mostrando a integridade das sequências do inserto Luciferase e do vetor pROCK. **(B) Imagem superior: Colônias bacterianas transformadas com o vetor pROCK contendo a sequência Luciferase** (média de 30 colônias/placa); Imagem inferior: a comparação com o controle negativo (média de 2 colônias/placa). **(C) PCR de colônia das colônias transformadas.** As colônias CL1–CL10 apresentaram um fragmento amplificado de ~1800 pb, correspondente com a sequência Luciferase, enquanto os controles negativos (CL11 e da reação) não apresentaram amplificação. **(D-E) Perfis de digestões enzimáticas do vetor recombinante extraído das colônias positivas**, utilizando as enzimas XbaI/XhoI, EcoRI/BamHI e NotI, indicando os tamanhos de fragmentos esperados e confirmando a correta inserção do gene de interesse. **(E) Eletroforese do plasmídeo linearizado** após digestão com NotI. **(F) Eletroforese do plasmídeo após a linearização e precipitação**, utilizado para transfecção dos parasitos.

As populações de parasitos transfectados e resistentes a droga G418 apresentaram intensa bioluminescência (Figura 23:A) quando realizado o teste *in vitro* de Luciferase. Tanto a dinâmica de crescimento (Figura 23:B), quanto a mobilidade e a morfologia normal dos parasitos foram mantidas. Com este resultado podemos inferir que parece que o processo de transfecção não alterou as características bioquímicas nem a capacidade de infecção dos parasitos.

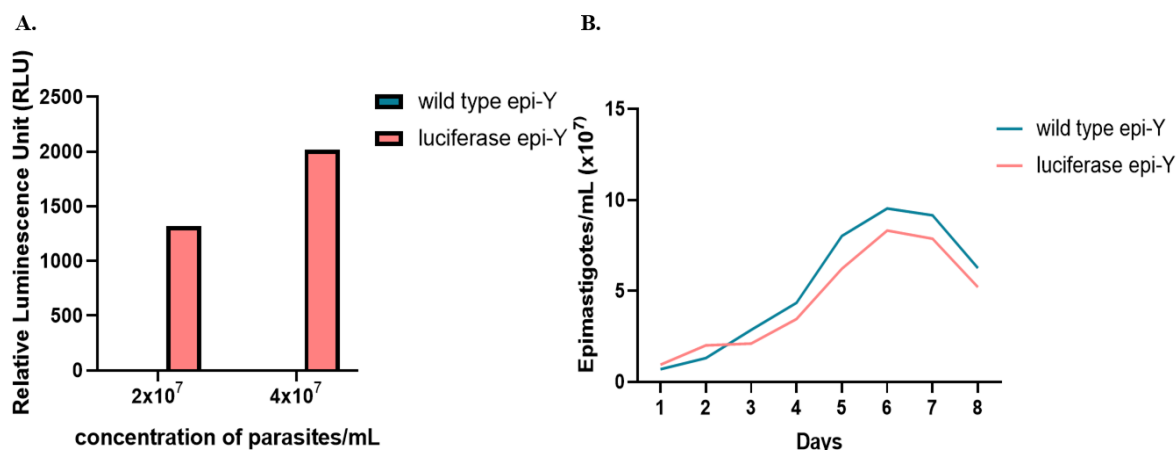


Figura 23. Caracterização dos parasitos cepa Y expressando Luciferase.

A. Ensaio de Luciferase *in vitro*. **B.** Comparação das curvas de crescimento das epimastigotas *wild-type* e epimastigotas cepa Y expressando Luciferase.

4.2.2. Definição do modelo experimental para infecção com parasitos cepa Y

Luciferase em diferentes linhagens celulares

Foram realizadas diferentes infecções nas linhagens celulares: MEF, LLCMK2 e AC16. Os resultados mostram que infecções na linhagem MEF liberaram mais tripomastigotas no sobrenadante ($3,375 \text{ tct/mL} \pm 2.412$) do que nas infecções com linhagens AC16 ($2,105 \text{ tct/mL} \pm 1.132$) e LLCMK2 ($1,566 \pm 0.667$). Além disso, nas duas linhagens mais infectivas (MEF e AC16) o pico de liberação ocorreu no 5º dpi. Diferentemente, da linhagem LLCMK2 que foi observado diferença na dinâmica de infecção, com início e o pico de liberação mais tardios (Figura 24).

Adicionalmente, por meio desta análise, decidiu-se que os dias mais convenientes para coleta de tripomastigotas do sobrenadante foram o 5º e 6º dias.

Estes achados sugerem diferentes suscetibilidades das linhagens celulares e cinética de infecção por *T. cruzi*, cepa Y expressando Luciferase.

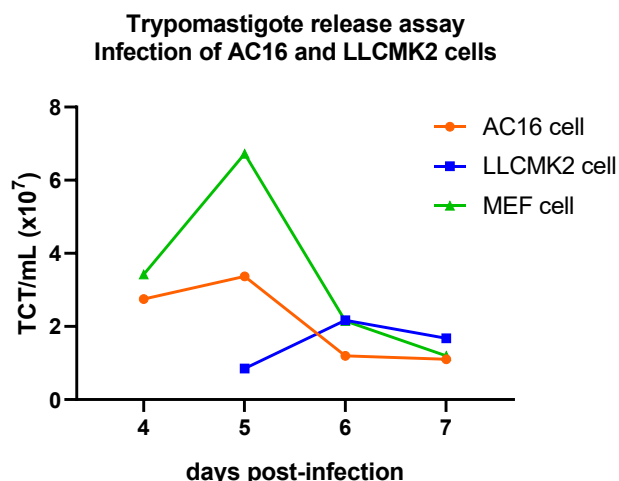


Figura 24. Ensaio de liberação de tripomastigotas de células infectadas ao longo do tempo.

Gráfico mostra o número de tripomastigotas (TCT/mL $\times 10^7$) liberados no sobrenadante por células AC16 (laranja), LLCMK2 (azul) e MEF (verde) a partir do 4º dia pós-infecção. Os dados parecem indicar diferenças na suscetibilidade celular e na cinética de infecção por *T. cruzi*, cepa Y expressando Luciferase entre as diferentes linhagens.

A MOI das infecções foi padronizada para um melhor aproveitamento na extração de RNA das amastigotas intracelulares. Para isso, foram realizados ensaios de invasão e multiplicação de amastigotas em células MEF. Após 48 horas de incubação contendo 5% CO₂ sob uma temperatura de 34°C a infecção em células MEF com uma MOI de 10:1 apresentou uma taxa de infecção de 36,5% $\pm$ 3,06, com uma taxa de multiplicação de amastigota de 4,34 amastigota/célula. Por outro lado, com uma MOI de 20:1, a taxa de infecção foi 40% maior (49,67% $\pm$ 1,45), com uma taxa de multiplicação de amastigota de 6,26 amastigota/célula (Figura 25: A-B).

Esses dados indicaram que a MOI de 20:1 foi mais eficiente para aumentar a carga parasitária nas células hospedeiras e, conseqüentemente, otimizar a extração de RNA de amastigotas intracelulares para análises posteriores. Para visualização dos dados brutos, ver a Tabela 13.

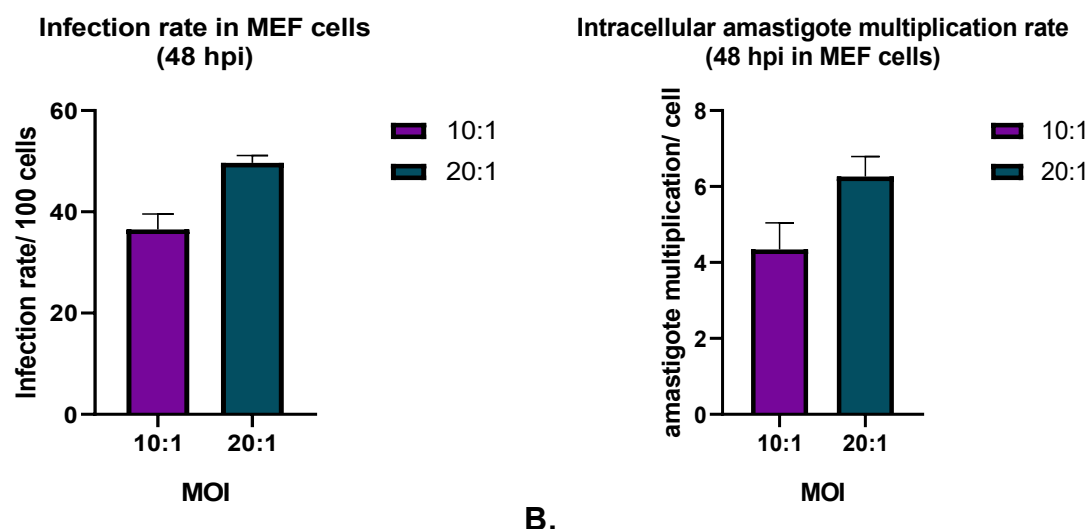


Figura 25. Taxa de infecção e multiplicação de amastigotas em células MEF com diferentes MOIs.

Células MEF foram infectadas com tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* expressando Luciferase, com MOIs 10:1 ou 20:1 e avaliadas 48 hpi. **A.** Taxa de células infectadas (número de células infectadas a cada 100 células) **B.** Taxa média de multiplicação de amastigotas intracelular por célula infectada.

Multiplicity rate (48 hpi in MEF cells)	Infection rate/ 100 cells	Intracellular amastigote multiplication rate
10 parasites: 1 cell	36.5% ± 3.06	4.34 amastigote/cell
20 parasites: 1 cell	49.67% ± 1.45	6.26 amastigote/cell

Tabela 13. Ensaio de multiplicação de amastigotas em células MEF.

Infecções com duas diferentes MOI para escolha da infecção e obtenção dos RNA das formas amastigotas e da célula hospedeira.

4.2.3. Ensaios de invasão para estudo da adaptação da cepa Y Luciferase em diferentes linhagens celulares *in vitro*

Foram realizados ensaios de invasão em diferentes linhagens celulares para avaliar a adaptação *in vitro* de parasitos cepa Y Luciferase. Com esta finalidade, foram utilizados parasitos oriundos da 5^o e 15^a passagens (P5 e P15, respectivamente) mantidos nas células LLCMK2 (epiteliais) e AC16 (cardiomiócitos) por consecutivas passagens.

Em ambos os grupos, tanto no grupo da população de parasitos que vinham sendo mantidos por consecutivas passagens nas células LLCMK2, quanto no grupo da população de parasitos que vinham sendo mantidos por consecutivas passagens

nas células AC16, foi possível observar que houve uma maior taxa de invasão nas células de linhagem AC16 e uma menor taxa de invasão nas células de linhagem LLCMK2 (Figura 26.)

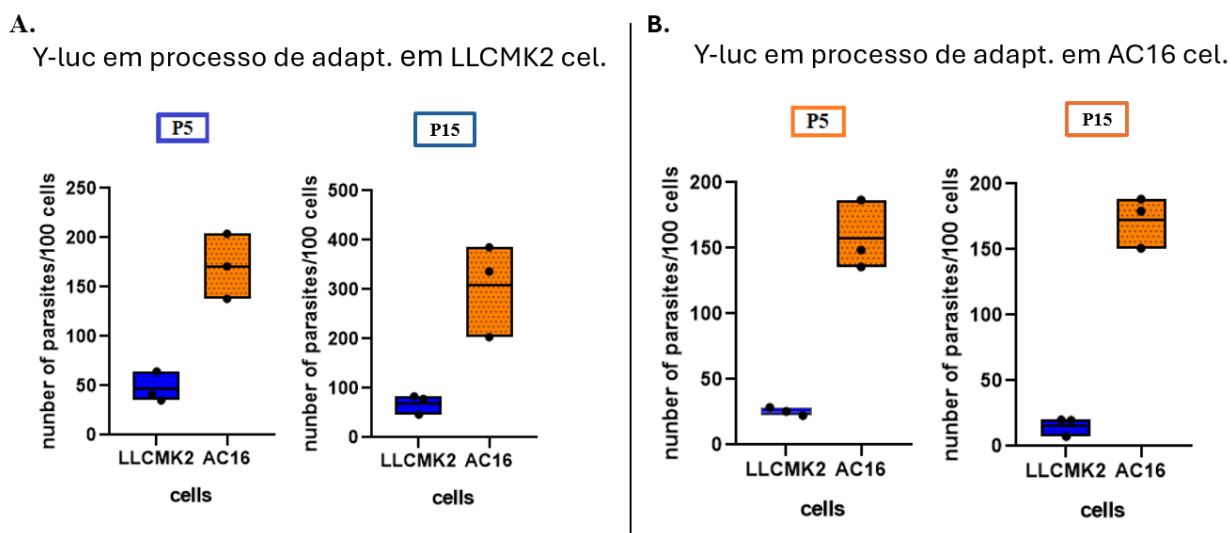


Figura 26. Comparação dos ensaios de invasão *in vitro* entre os dois grupos tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* expressando Luciferase mantidos em duas diferentes linhagens celulares por passagens consecutivas.

A. Número de parasitos por 100 células hospedeiras em dois ensaios de invasão realizados com tripomastigotas mantidos em células LLCMK2 liberados de P5 e P15. **B.** Número de parasitos por 100 células hospedeiras em dois ensaios de invasão realizados com tripomastigotas mantidos em células AC16 liberados de P5 e P15. Os gráficos *boxplot* representam a mediana e a variabilidade das triplicatas experimentais para cada condição, evidenciando provavelmente um maior efeito de tropismo destes parasitos pelo tecido cardíaco.

Confirmando que, de forma geral, parece que as tripomastigotas da cepa Y Luciferase apresentam maior tropismo e eficiência de invasão em cardiomiócitos (AC16) do que em células epiteliais (LLCMK2), independentemente da linhagem celular em que estes parasitos estavam sendo mantidos. Tal comportamento é compatível com a biologia de *T. cruzi*, um parasito com interesse natural por células musculares cardíacas durante a infecção em humanos (Bianca Zingales, 2022). No entanto, quando se analisa individualmente cada linhagem celular (Figura 27: A-B), observou-se uma tendência sugestiva de aumento na taxa de invasão nas células em que os parasitos foram previamente mantidos, ou seja, parece que os parasitos mantidos em células LLCMK2 apresentaram, nas infecções em LLCMK2, maior taxa invasão de P5 para P15. Assim como os parasitos mantidos em AC16, mostraram maior invasão em AC16 após a 15ª passagem em comparação com a 5ª passagem.

Essa observação sugere uma possível adaptação progressiva das tripomastigotas no tipo celular em que são cultivados *in vitro*, resultando em uma maior eficiência invasiva nessa mesma linhagem com o tempo. Embora a diferença ainda não tenha atingido uma ideal significância estatística, a tendência observada aponta para um efeito biológico que merece investigação mais aprofundada, pois pode refletir mecanismos de plasticidade fenotípica de *T. cruzi* frente a diferentes ambientes celulares.

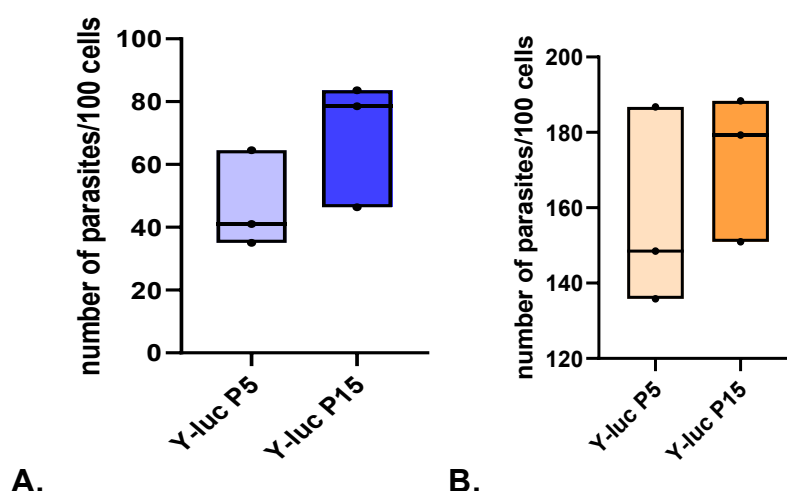


Figura 27. Ensaio de invasão *in vitro* com tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* expressando Luciferase, liberados das passagens P5 e P15.

A. Número de parasitos por 100 células hospedeiras em ensaios realizados com tripomastigotas mantidos em células LLCMK2. **B.** Número de parasitos por 100 células hospedeiras em ensaios realizados com tripomastigotas mantidos em células AC16. Os gráficos *boxplot* representam a mediana e a variabilidade das triplicatas experimentais para cada condição, evidenciando o efeito de uma provável adaptação progressiva nas diferentes linhagens celulares.

4.2.4. Ensaio de infecção *in vivo* utilizando tripomastigotas da cepa Y Luciferase derivadas de passagens sucessivas *in vitro* em diferentes células hospedeiras

A parasitemia foi monitorada até o 17º dia pós-infecção e foi constatado que a quantidade de parasitos inoculados foi capaz de causar picos de parasitemia em ambos os grupos, com uma dinâmica de infecção bastante parecida entre eles (Figura 28). Além disso, os camundongos apresentaram o pico da parasitemia entre o 9º e 10º dia, padrão característico da cepa utilizada.

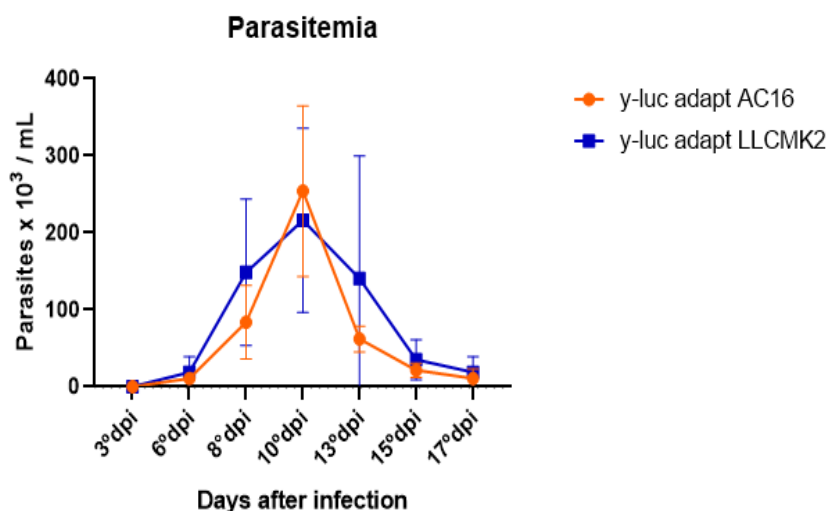


Figura 28. Curva de parasitemia dos camundongos infectados com tripomastigotas de cepa Y e adaptados nas células LLCMK2 e AC16.

Para o monitoramento da infecção experimental *in vivo*, foi utilizado o equipamento especializado no imageamento de pequenos animais, IVIS® (In Vivo Imaging System) que permitiu a análise do estado da infecção. Na imagem da bioluminescência (Figura 29) foi detectada a emissão da bioluminescência dos parasitos oriundos das consecutivas passagens *in vitro* nas células AC16 (imagem esquerda) e LLCMK2 (imagem direita). Por meio da intensidade da bioluminescência que indicou a presença do parasitismo tecidual em ambos os grupos. Foi visualizado também, uma tendência de maior concentração de parasitos na região do trato gastrointestinal nos camundongos infectados com Y Luciferase de P15 oriundos de células AC16 (Figura 29).

Com estas análises prévias, indicam que a cepa Y Luciferase, após múltiplas passagens *in vitro* em células AC16 ou LLCMK2, manteve a capacidade de infectar os animais e apresentar padrão de bioluminescência similar por ambos os grupos. Além disso, como comentado acima, observou-se uma tendência a maior acúmulo de parasitos na região do trato gastrointestinal nos camundongos infectados com parasitos de P15 oriundos de AC16, sugerindo uma possível diferença na virulência dos parasitos. Porém, como se trata de resultados bastante preliminares, experimentos adicionais são necessários para confirmar e aprofundar estas observações.

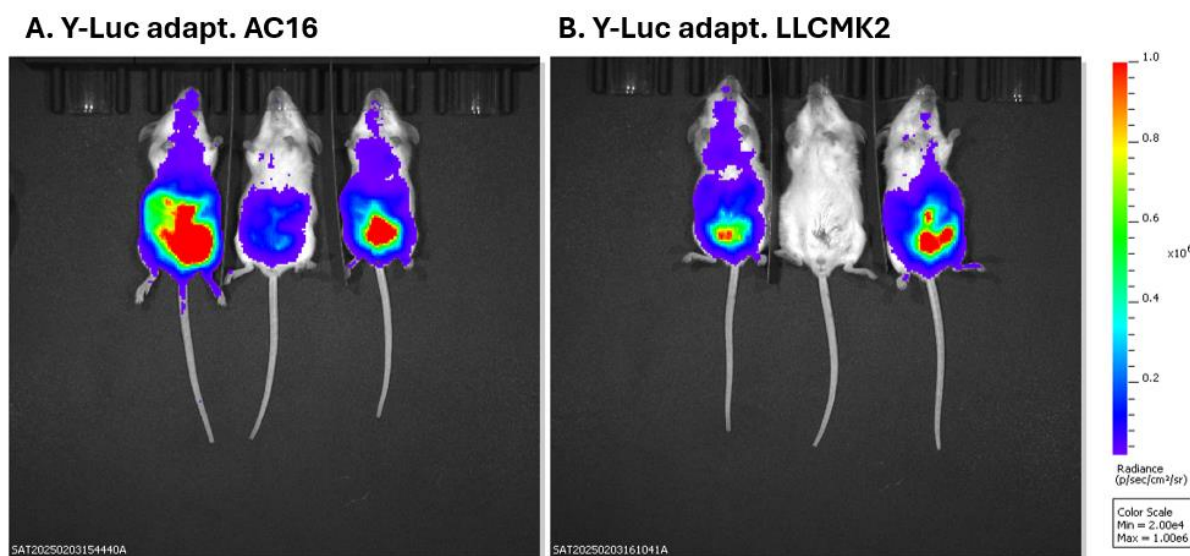


Figura 29. Infecção experimental em modelo animal.

Imagens foram obtidas pelo equipamento de monitoramento de bioluminescência IVIS® (*In Vivo Imaging System*). Através da radiação ventral foi detectado sinal de luminescência em camundongos BALB/c infectados no 13º dia depois da inoculação com TCTs **A.** Tripomastigotas da cepa Y expressando Luciferase mantidas por 15 passagens consecutivas em células da linhagem AC16 (cardiomiócitos) **B.** Tripomastigotas da cepa Y expressando Luciferase mantidas por 15 passagens em células da linhagem LLCMK2 (epitelial).

4.2.5. Preparo do RNA para construção de bibliotecas para sequenciamento do transcriptoma

Foram extraídos em triplicata os RNAs das células não infectadas, das células infectadas (contendo amastigota intracelular) e de parasitos cepa Y formas tripomastigotas retirados do sobrenadante de cada linhagem celular. Como demonstrado na Tabela 14, obteve-se um rendimento satisfatório nessas extrações, com quantidade mais que suficiente para serem sequenciados.

Identificação da amostra	Célula	Quantidade de parasitos	Forma do parasito	Concentração RNA (ng/uL)	Rendimento (ug)
MEF NI 1	MEF	N/A	N/A	380	14,06
MEF NI 2	MEF	N/A	N/A	396	14,65
MEF NI 3	MEF	N/A	N/A	366	13,54
AMA+MEF 1	MEF	1x10 ⁷	Amastigota intracelular	504	18,65
AMA+MEF 2	MEF	1x10 ⁷	Amastigota intracelular	620	22,94
AMA+MEF 3	MEF	1x10 ⁷	Amastigota	598	22,13

intracelular					
TCT Y LUC 1	MEF	5x10 ⁸	Tripomastigota	246	9,1
TCT Y LUC 2	MEF	5x10 ⁸	Tripomastigota	214	7,92
TCT Y LUC 3	MEF	5X10 ⁸	Tripomastigota	191	7,07

Tabela 14. Rendimento das extrações de RNA para estudo da adaptação da cepa Y de *T. cruzi* expressando Luciferase.

Também, foi avaliada a integridade desses RNAs utilizando o Bioanalyzer 2100. Ele utiliza um algoritmo que gera os valores de integridade de RNA (RNI) que auxilia na decisão se o RNA tem integridade suficientemente alta para prosseguir com a análise de RNAseq. Em uma amostra de RNA intacta, os picos de RNA 28S e 18S devem ter uma proporção de aproximadamente 2:1. Portanto, estes eletroferogramas indicaram que nossas amostras possuem RNA íntegros e livres de contaminantes, aptos a serem sequenciados (Figura 30).

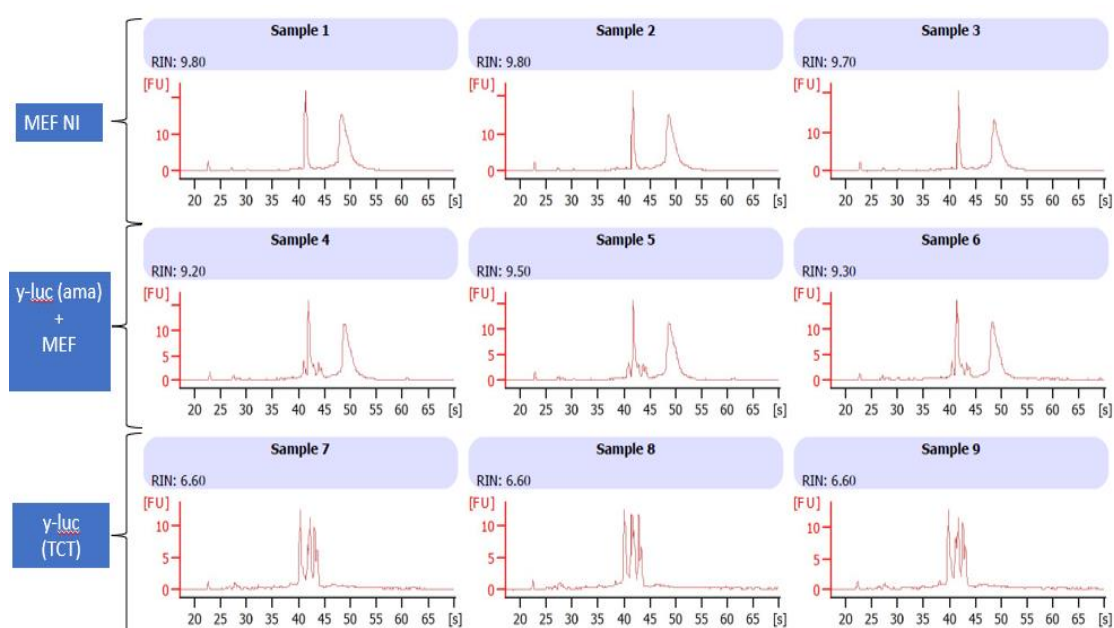


Figura 30. Eletroferogramas e valores de RNI obtidos pelo Bionalyzer.

Além disso, a fim de evitar interferências no sequenciamento com impurezas e outros tipos de ácidos nucleicos, as amostras foram tratadas com a enzima DNase. Para garantir e se certificar da eficácia desse tratamento, as amostras de células não-infectadas e células infectadas que tiveram o seu RNA total extraído, foram feitas PCR (Figura 31) e como indicado na imagem, não houve produto de amplificação do gene PGK1 em nenhuma das amostras. Este resultado demonstra que as amostras

estavam livres de DNAe, portanto, sob este aspecto, consideradas com boa qualidade para o sequenciamento. Os controles negativo da reação (água) e o positivo da reação (DNA extraído de células Hela) indicaram que a reação funcionou corretamente.

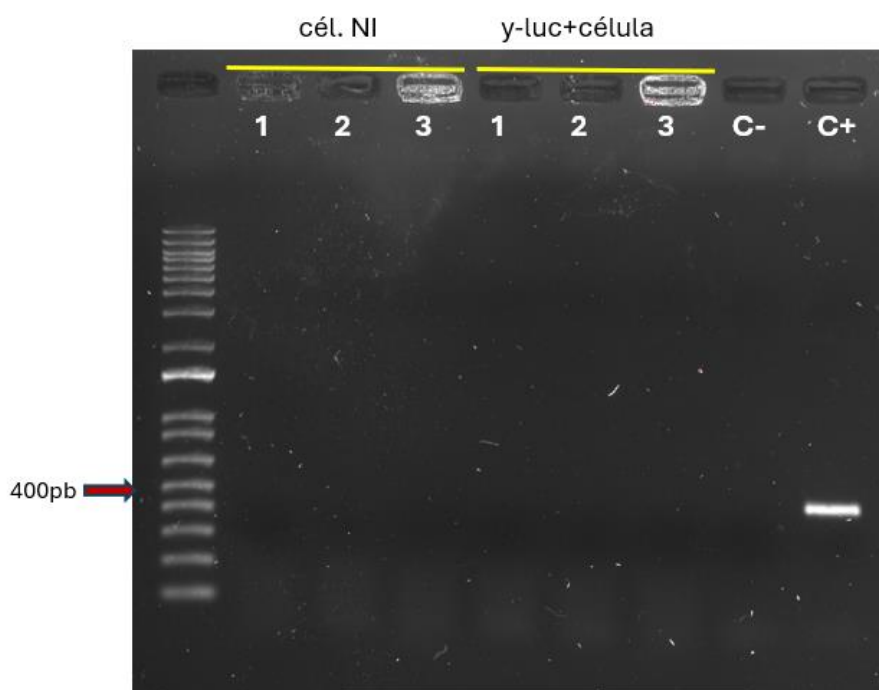


Figura 31. Análise da ausência de DNA nas amostras de RNA extraídos pós-tratamento
A imagem apresenta a eletroforese da PCR pós-tratamento DNase em gel de agarose 1%.
cél.NI: RNA em triplicata das células MEF não infectadas, Y-luc+célula: RNA em triplicata da célula infectada contendo amastigota intracelular, C-: controle negativo da reação, C+: DNA Células HeLa. Primers da PCR: gene PGK1, tamanho do fragmento esperado: 450 pb, informação da fonte: 90 volts-70 minutos.

4.2.6. Preparo do DNA para construção de bibliotecas para sequenciamento do genoma

Foram extraídos, em triplicata, os DNAs de células não infectadas, células infectadas (contendo amastigotas intracelulares) e parasitos da cepa Y nas formas tripomastigotas, coletados do sobrenadante de cada linhagem celular. Como apresentado na Tabela 15, as extrações apresentaram rendimento satisfatório em todas as condições analisadas, com quantidades de DNA mais do que suficientes para permitir o sequenciamento.

Identificação da amostra	Célula	Quant. de parasitos	Forma do parasito	Concentração DNA	Rendimento (ug)
--------------------------	--------	---------------------	-------------------	------------------	-----------------

				(ng/uL)	
MEF NI 1	MEF	N/A	N/A	192	7,1
MEF NI 2	MEF	N/A	N/A	196	7,25
MEF NI 3	MEF	N/A	N/A	172	6,36
AMA+MEF 1	MEF	1x10 ⁷	Amastigota intracelular	184	6,81
AMA+MEF 2	MEF	1x10 ⁷	Amastigota intracelular	195	7,22
AMA+MEF 3	MEF	1x10 ⁷	Amastigota intracelular	184	6,81
y-luc 1	N/A	1x10 ⁸	Tripomastigota	120	4,8
y-luc 2	N/A	1x10 ⁸	Tripomastigota	153	6,12
y-luc 3	N/A	1x10 ⁸	Tripomastigota	142	5,68

Tabela 15. Rendimento das extrações de DNA para estudo da adaptação da cepa Y de *T. cruzi* expressando Luciferase.

Os resultados obtidos confirmaram que as metodologias escolhidas para aquisição dos ácidos nucleicos (RNA e DNA) foram adequadas e reprodutíveis para as diferentes análises testadas. No entanto, para garantir maior robustez e consistência nos dados obtidos dos experimentos, serão realizados experimentos adicionais antes do envio das amostras para o sequenciamento final.

5. DISCUSSÃO

As proteínas de superfície representadas pelas famílias multigênicas em *Trypanosoma cruzi* são moléculas-chaves na interação parasito-hospedeiro. Recentes estudos vêm demonstrando que elas desempenham distintos e fundamentais papéis na invasão, sobrevivência, virulência e capacidade de evasão do sistema imune. Dentro desse contexto, este trabalho contribui para uma melhor compreensão da associação entre a infectividade e a mais abundante família proteica presente na superfície de *T. cruzi*, as *trans*-sialidases. Além disso, apresentamos observações sobre a alta capacidade de adaptação que o parasito apresenta aos diferentes ambientes, capacidade essa que poderia estar relacionada aos diferentes desfechos clínicos apresentados por indivíduos portadores da doença de Chagas.

Em um estudo anterior (Burle-Caldas et al., 2022), observou-se que a interrupção dos genes que codificam *Trans*-sialidases com atividade catalítica (aTS) que resultou em uma indetectável atividade enzimática que não afetou a capacidade de invasão de células hospedeiras, mas comprometeu a diferenciação de amastigotas intracelulares em tripomastigotas e saída do parasito da célula hospedeira. Em decorrência desse interrompimento, nas infecções de camundongos com essa linhagem de parasitos atenuados não foi observada parasitemia detectável nos animais. Entretanto, nesse estudo não foi elucidado se esses efeitos foram consequências diretas e exclusivas da depleção dos genes de TS. Os resultados obtidos neste trabalho forneceram evidências que comprovam a interrupção dos genes de aTS, assim como mostraram que o nocaute não alterou vias metabólicas relevantes nos parasitos mutantes. Por outro lado, os parasitos mutantes tiveram afetada a expressão de genes do compartimento disruptivo, especialmente das famílias MASP e TS, sugerindo um possível mecanismo compensatório. Esse resultado reforça a plasticidade do genoma de *T. cruzi* que possui a capacidade de remodelar seu repertório de moléculas de superfície em resposta a diferentes alterações no ambiente (Berná et al., 2017; Dos Santos et al., 2012). Outro dado a considerar da nossa análise, é a predominância de genes da região disruptiva com expressão diminuída, duas vezes maior do que a de genes com expressão aumentada. Isto sugere, que o nocaute das aTS possa ter comprometido a expressão de outras proteínas de superfície, essenciais para a virulência do parasito,

particularmente daquelas que podem estar envolvidas na *lise* ou escapamento celular, o que normalmente resultaria em picos de parasitemia em camundongos.

Um novo estudo ainda não publicado por nosso grupo demonstra que a reintrodução dos genes aTS (*Addback*) restaura parcialmente a capacidade infectiva do parasito, em comparação ao parasito selvagem. Esses achados, em conjunto com os demais resultados apresentados, reforçam o papel das proteínas de superfície no processo infeccioso promovido por *T. cruzi*.

Neste estudo de transcriptoma também permitiu explorar sobre aspectos do controle da expressão gênica presente nos tripanossomatídeos. Desde a década de 1980, estudos tem demonstrado que mecanismos de controle pós-transcricionais desempenham papéis fundamentais na regulação de genes ao longo do ciclo de vida dos tripanossomatídeos, por meio de eventos como *trans-splicing* e *splicing* alternativo (Nilsson et al., 2010; Teixeira; Kirchhoff; Donelson, 1999), mas especialmente por meio de controle da estabilidade do mRNA (Araújo; Teixeira, 2011b).

A análise dos genes TS do grupo I, baseada apenas no alinhamento das *reads* provenientes de RNAm poliadenilado, não permite afirmar se os transcritos detectados virão a ser traduzidos em proteínas funcionais. Isso ocorre porque a estabilidade dos diferentes mRNAs maduros é determinada por taxas específicas de degradação e influenciadas por elementos *cis* (sinais de *splicing*), fatores *trans* (proteínas regulatórias) e outros mecanismos ainda pouco conhecidos que afetam o *turnover* ou degradação dos mRNAs (Clayton; Shapira, 2007). O estudo de Brandão e Jiang (2009) revelou a presença de sequências repetitivas (motivos) distribuídas principalmente na região 3' UTR. Estas atuam como sítios de ligação para proteínas *trans* reguladoras e se associam aos mRNAs, determinando a sua estabilidade (promove tanto sua estabilização quanto sua degradação) e como resultado, impactando diretamente na meia-vida dos transcritos e a eficiência da tradução (De Gaudenzi; D'Orso; Frasch, 2003; Haile; Papadopoulou, 2007). Diante disso, é importante considerar as limitações biológicas e técnicas decorrentes tanto do controle transcricional quanto da organização genômica de *T. cruzi*. A identificação precisa de sítios de *trans-splicing* e poliadenilação poderá futuramente ajudar a esclarecer o grau de maturação dos transcritos analisados e seu potencial traducional. Além disso, tais análises poderão revelar novas moléculas envolvidas na estabilidade e degradação de mRNAs, ligadas aos mecanismos de controle da expressão gênica via decaimento de RNA. Outro aspecto crítico a ser considerado são os genes

codificadores de proteínas aTS, que assim como outras proteínas de superfície, estão localizados em regiões disruptivas dos cromossomos, áreas altamente complexas e repetitivas (Kim et al., 2005). De fato, essas características representam um grande desafio para as atuais tecnologias de sequenciamento, tanto genômico quanto transcriptômico, não apenas dificultando o mapeamento preciso dessas regiões, mas também aumentando a probabilidade de erros de alinhamento e interpretação dos dados. Portanto, embora nossos dados indiquem a interrupção da expressão gênica em alguns genes de *trans*-sialidases ativas após o nocaute, é possível também que a presença de *reads* nos demais genes aTS alvos para nocaute, seja parcialmente atribuída às limitações biológicas e técnicas mencionadas acima.

Os transcritos foram mapeados contra um dos haplótipos isoladamente (haplótipo Esmo-*like*), bem como contra o genoma completo (considerando ambos haplótipos e as sequências não atribuídas a nenhum dos dois haplótipos), utilizando uma abordagem de mapeamento único por leitura. Foi utilizada uma abordagem semelhante às apresentadas nos trabalhos (Belew et al., 2017; Li et al., 2016; Oliveira et al., 2020) que buscaram otimizar e reduzir a ambiguidade de alinhamento, causada pela complexidade do genoma do parasito. Além disso, foram aplicados critérios estatísticos mais restritivos (valor *p* adj. < 0,05 e log2fold-change <1,5 e >1,5) de modo a priorizar apenas alterações de expressão com maior impacto biológico e evitar interpretações errôneas.

Atualmente, diversos genomas de *T. cruzi* encontram-se disponíveis nos bancos de dados TriTrypDB e Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI), o que tem contribuído significativamente para o avanço dos estudos sobre a variabilidade fenotípica, patogenicidade e complexidade desse microrganismo. Este trabalho empregou uma abordagem de alto rendimento baseada no sequenciamento de nova geração (RNA-Seq), utilizando a plataforma Illumina NextSeq 2000. Como evidenciado em nossos resultados, a principal vantagem dessa tecnologia é a alta capacidade de geração de leituras, aliada a baixas taxas de erro. Por outro lado, uma limitação importante é a produção de conjuntos de leitura altamente fragmentados, o que dificulta reconstruções genômicas completas. No entanto, como o objetivo central deste estudo não foi a montagem do genoma ou dos transcritos, mas sim avaliação do impacto do nocaute das *trans*-sialidases na expressão de outros genes, essa limitação não comprometeu significativamente os objetivos e nem a qualidade das inferências obtidas.

Estudos transcriptômicos recentes demonstram que as proteínas de superfície de *T. cruzi* atuam como importantes fatores de virulência, uma vez que a remodelação dos componentes de superfície do parasito, especialmente em sua forma infectiva, é essencial para processos como diferenciação, infectividade, adesão e invasão celular, além de protegê-lo dos mecanismos de defesa do hospedeiro (Belew et al., 2017; Berná et al., 2017; Oliveira et al., 2022). Essas proteínas pertencem a famílias multigênicas que, podem variar sua expressão de acordo com as necessidades do ambiente ou da célula (por exemplo, vetor ou hospedeiro), tornando-se interessantes alvos para estudo.

Neste estudo, foram conduzidos também experimentos *in vitro* e *in vivo* utilizando a cepa Y expressando Luciferase de *T. cruzi*, mantida por passagens consecutivas em duas linhagens celulares distintas: LLCMK2 (epitelial de rim de macaco) e AC16 (cardiomiócitos humanos imortalizados). O principal objetivo foi investigar alterações no perfil de expressão de proteínas de superfície associadas à potencial adaptação do parasito a diferentes tipos celulares. Os dados obtidos evidenciaram variações nos padrões de infecção em função da linhagem celular utilizada, evidenciando um acentuado tropismo e maior eficiência invasiva da cepa Y em cardiomiócitos. Tal achado está em concordância com o tropismo intrínseco previamente descrito para essa cepa, amplamente conhecido e documentado tanto em infecções naturais em humanos quanto em modelos experimentais (Silvestrini et al., 2024a; Zingales; Bartholomeu, 2022). Logo, acreditamos que devido ao elevado tropismo que a cepa possui pelo tecido cardíaco, quando comparadas todas as linhagens utilizadas durante o experimento, não foi possível observar evidências de adaptação desses parasitos nas linhagens celulares que estavam sendo mantidos. Em contrapartida, análises específicas de cada linhagem celular revelaram uma tendência sugestiva de aumento na taxa de invasão nas células em que os parasitos foram previamente mantidos, ou seja, provavelmente os parasitos mantidos em células LLCMK2 apresentaram, nas infecções em LLCMK2, maior taxa invasão de P5 para P15. Assim como os parasitos mantidos em AC16, mostraram maior invasão em AC16 após a 15ª passagem em comparação com a 5ª passagem. Esses dados sugerem um possível processo de adaptação progressivo das tripomastigotas no tipo celular em que são cultivados *in vitro*, aumentando sua eficiência invasiva com as passagens sucessivas. Embora a diferença ainda não tenha atingido uma significância estatística, a tendência observada aponta para um efeito biológico compatível com a

plasticidade fenotípica de *T. cruzi*, aspecto que merece investigações mais aprofundadas em estudos futuros.

Este estudo buscou também reproduzir resultados de um trabalho anterior, ainda não publicado, conduzido por nosso grupo, no qual parasitos da cepa CL Brener, após sucessivas passagens em diferentes linhagens celulares (L6: mioblastos de rato e LLCMK2), demonstraram aumento na taxa de invasão nas células onde haviam sido mantidos. Naquele experimento, análises transcriptômicas revelaram alterações significativas na expressão gênica, especialmente em genes localizados na região disruptiva, evidenciando um possível remodelamento da superfície parasitária. Contudo, algumas diferenças importantes devem ser destacadas entre os dois trabalhos. A primeira diz respeito à cepa utilizada: nesta investigação optamos pela cepa Y, altamente infectiva e associada a manifestações cardíacas e digestivas em pacientes e modelos experimentais *in vivo* (Silvestrini et al., 2024b). A segunda diferença é o uso dos cardiomiócitos (linhagem AC16), uma célula altamente suscetível à infecção *in vitro*, o que possivelmente possa ter afetado na interpretação dos resultados. Estas variações metodológicas dificultam a comparação direta entre os estudos e ajudam a explicar os resultados distintos. De fato, ao comparar diretamente os ensaios de invasão dos dois estudos, conduzidos com protocolos idênticos, observamos que a cepa Y apresentou taxas de invasão significativamente superiores às da CL Brener, entre 50 e 350 parasitos/100 células (intervalo dos resultados encontrados com a cepa Y), contra 1 a 30 parasitos/100 células (intervalo dos resultados encontrados com a cepa CL Brener). Esses achados reforçam a reconhecida heterogeneidade entre isolados de diferentes cepas, observada tanto entre DTUs distintas quanto dentro de uma mesma DTU (Callejas-Hernández et al., 2018; Ferreira Cura das Neves et al., 2020; Herreros-Cabello et al., 2025).

Outro ponto relevante foi o impacto da alta MOI utilizada nos experimentos. Observamos que os cardiomiócitos infectados com tripomastigotas da cepa Y Luciferase apresentaram maior fragilidade, com tendência ao descolamento celular, possivelmente devido à sua elevada susceptibilidade à infecção. Apesar disso, a realização dos experimentos em triplicata e a alta infectividade da cepa contribuíram para a confiabilidade dos dados obtidos. No entanto, observou-se marcações inespecíficas com o anticorpo secundário Alexa488 em alguns casos, possivelmente associadas ao alto grau de injúria celular, um fator que pode ter comprometido parcialmente a distinção entre parasitos internalizados e aderidos na membrana. A

ausência de quantificação direta da integridade celular durante os experimentos limita uma conclusão mais precisa sobre esse aspecto.

Para contornar essas limitações e aumentar a robustez dos resultados, propomos, em experimentos futuros, a utilização de MOI reduzida e a padronização de novos ensaios de invasão com imunofluorescência. Outra alternativa, aproveitando a expressão da Luciferase, seria adotar métodos baseados na bioluminescência dos parasitos, o que permitiria quantificação mais precisa e menos suscetível à subjetividade da análise microscópica.

Por fim, nossos resultados *in vivo* demonstraram que as tripomastigotas da cepa Y Luciferase mantêm sua capacidade infectiva mesmo após múltiplas passagens *in vitro* em células AC16 ou LLCMK2. Embora os padrões de bioluminescência nos animais não tenham revelado diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

Ponderando todas essas observações, aliadas à ausência de significância estatística nos principais resultados, optamos por adiar o sequenciamento até que análises mais robustas e consistentes fossem realizadas. Essa decisão visa garantir que os recursos financeiros investidos na etapa de sequenciamento sejam direcionados a amostras que representem, de fato, adaptações biológicas relevantes, sustentadas por dados estatísticos e reprodutíveis. Uma vez realizados novos experimentos de adaptação a diferentes tipos celulares, pretendemos prosseguir com as análises transcriptômicas das linhagens adaptadas a fim de identificar possíveis diferenças na expressão dos diversos membros das famílias de proteínas de superfície.

Em conjunto, os resultados destes estudos reforçam o papel central das proteínas de superfície na biologia de *T. cruzi*, não apenas como elementos estruturais de adesão ou invasão, mas como componentes altamente plásticos e reguláveis que respondem a pressões ambientais, participando ativamente dos mecanismos que garantem a sobrevivência, disseminação e patogenicidade do parasito nos diferentes contextos celulares e hospedeiros.

6. CONCLUSÕES

- A análise dos genes da família aTS alvos do nocaute, foram encontrados dados que corroboram a interrupção da expressão gênica em alguns genes de *trans*-sialidases ativas, após o nocaute, apesar de *reads* terem sido detectadas mapeando os demais genes aTS alvos para nocaute.
- Nas análises de genes diferencialmente expressos realizadas para o compartimento *core*, o conjunto das evidências sugerem que o nocaute para aTS em tripomatigotas da cepa CL Brener de *T. cruzi* não promoveu alterações significativas no metabolismo dos parasitos mutantes.
- Nas análises de genes diferencialmente expressos realizadas para o compartimento disruptivo, foi observado um número maior de genes com expressão aumentada comparado com as análises realizadas para o compartimento *core*. Destes genes, a grande maioria pertence à família MAPs e *trans*-sialidases, sugerindo um possível papel compensatório dessas famílias.
- As análises de genes diferencialmente expressos realizadas com sequências dos compartimentos “*core*” e disruptivo, mostraram um predomínio de genes com expressão diminuída.
- No contexto deste trabalho, uma MOI de 20:1 foi mais eficiente para aumentar a carga parasitária nas células hospedeiras e, conseqüentemente, otimizar a extração de RNA de amastigotas intracelulares.
- Os ensaios de invasão, com as infecções realizadas *in vitro*, forneceram evidências que sugerem que tripomastigotas da cepa Y Luciferase apresentam maior tropismo e eficiência de invasão em cardiomiócitos (AC16) do que em células epiteliais (LLCMK2), independentemente da linhagem celular em que estes parasitos estavam sendo mantidos.
- Em infecções experimentais *in vivo*, os achados mostram que mesmo após múltiplas passagens *in vitro* em células AC16 ou LLCMK2, a cepa Y Luciferase, manteve a capacidade de infectar os animais e apresentar padrão de bioluminescência similar por ambos os grupos.

7. PERSPECTIVAS

7.1. Perspectivas para o estudo das alterações no perfil da expressão gênica em parasitos nocautes para uma família de superfície

- Realização da comparação dos perfis transcriptômicos de parasitos *adddback* e nocautes para aTS. A comparação desses perfis permitirá identificar com maior precisão os genes diferencialmente expressos em resposta à ausência dos genes aTS e, principalmente, os genes que possivelmente contribuem para a alteração observada na capacidade infectiva dos parasitos nocaute.

Sobre a análise dos genes da família TS alvos do nocaute:

- Futuramente, investigaremos com maior robustez quais genes ocorreram a transcrição da sequência do *primer* M13 com o *stop* códon inseridos para o molde de reparo, quando realizado o nocaute.
- Também, com o objetivo de investigar mais profundamente e trazer novas evidências sobre o processo transcricional e o amadurecimento dos transcritos dos genes aTS alvos do nocaute, será realizado a montagem do transcriptoma e delimitadas as regiões 5' e 3' UTRs para identificar com precisão os sítios de *trans-splicing* e poliadenilação presentes ou não nestes genes.

7.2. Perspectivas para o estudo da adaptação à diferentes tipos celulares da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* expressando Luciferase

Sobre os parasitos adaptados em diferentes linhagens celulares:

- Experimentos adicionais de ensaios de invasão são necessários para confirmar e aprofundar as observações previamente encontradas.
- Também, com o objetivo de investigar a cinética das infecções por parasitos adaptados em diferentes linhagens celulares, será realizado ensaios de multiplicação de amastigotas em diferentes tempos.
- Após realização e interpretação dos resultados das análises citadas acima, será realizado o RNA-Seq e analisado os transcriptomas dos parasitos adaptados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA-SERRANO, A. The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: structure and biological roles. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 114, n. 2, p. 143–150, maio 2001.
- ALMEIDA, I. C. *et al.* Lytic anti- α -galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas' disease recognize novel O -linked oligosaccharides on mucin-like glycosyl-phosphatidylinositol-anchored glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical Journal**, v. 304, n. 3, p. 793–802, 15 dez. 1994.
- AMAYA, María Fernanda *et al.* Structural Insights into the Catalytic Mechanism of *Trypanosoma cruzi* trans-Sialidase. **Structure**, v. 12, n. 5, p. 775–784, maio 2004.
- ANDERS, Simon; HUBER, Wolfgang. Differential expression analysis for sequence count data. **Genome biology**, v. 11, n. 10, p. R106, 2010.
- ANDREWS S. **FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data.**
- ARAÚJO, Patricia R.; TEIXEIRA, Santuza M. Regulatory elements involved in the post-transcriptional control of stage-specific gene expression in *Trypanosoma cruzi*: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 3, p. 257–266, maio 2011.
- ASLETT, Martin *et al.* TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. suppl_1, p. D457–D462, jan. 2010.
- ATWOOD, J. A. *et al.* The *Trypanosoma cruzi* Proteome. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 473–476, 15 jul. 2005.
- AZUAJE, Francisco J.; RAMIREZ, Jose L.; DASILVEIRA, Jose F. In silico, biologically-inspired modelling of genomic variation generation in surface proteins of *Trypanosoma cruzi*. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v. 6, n. 1, p. 6, 10 dez. 2007.
- BARRETO-BERGTER, Eliana; B VERMELHO, Alane. Structures of Glycolipids Found in Trypanosomatids_Contribution to parasite functions. **The open parasitology Journal**, v. 4, p. 84–97, 2010.
- BARRY, J. D. *et al.* Why are parasite contingency genes often associated with telomeres? **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 1, p. 29–45, jan. 2003.
- BARTHOLOMEU, Daniella C. *et al.* Genomic organization and expression profile of the mucin-associated surface protein (masp) family of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 10, p. 3407–3417, jun. 2009.
- BAYER-SANTOS, Ethel *et al.* Proteomic Analysis of *Trypanosoma cruzi* Secretome: Characterization of Two Populations of Extracellular Vesicles and Soluble Proteins. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 2, p. 883–897, 1 fev. 2013.
- BELEW, A. Trey *et al.* Comparative transcriptome profiling of virulent and non-virulent *Trypanosoma cruzi* underlines the role of surface proteins during infection. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 12, p. e1006767, 14 dez. 2017.

BERNÁ, Luisa *et al.* Transcriptomic analysis reveals metabolic switches and surface remodeling as key processes for stage transition in *Trypanosoma cruzi*. **PeerJ**, v. 5, p. e3017, 8 mar. 2017.

BERNÁ, Luisa *et al.* Expanding an expanded genome: long-read sequencing of *Trypanosoma cruzi*. **Microbial genomics**, v. 4, n. 5, 1 maio 2018.

BIANCAZINGALES, Daniella Bartholomeu. *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease: diversity, progress and challenges. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 117, 2022.

BJÖRK, Petra; WIESLANDER, Lars. Integration of mRNP formation and export. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 16, p. 2875–2897, 17 ago. 2017.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma Cruzii*. **Annual Review of Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 347–382, out. 1973.

BRENER, Z. ; Chiari, E. Variações morfológicas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 5, p. 220–224, 1963.

BURLE-CALDAS, Gabriela Assis *et al.* Assessment of two CRISPR-Cas9 genome editing protocols for rapid generation of *Trypanosoma cruzi* gene knockout mutants. **International Journal for Parasitology**, v. 48, n. 8, p. 591–596, jul. 2018.

BURLE-CALDAS, Gabriela de A. *et al.* Disruption of Active Trans-Sialidase Genes Impairs Egress from Mammalian Host Cells and Generates Highly Attenuated *Trypanosoma cruzi* Parasites. **mBio**, v. 13, n. 1, 22 fev. 2022.

BUSCAGLIA, Carlos A. *et al.* *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 229–236, mar. 2006b.

BUSCHIAZZO, Alejandro *et al.* The Crystal Structure and Mode of Action of Trans-Sialidase, a Key Enzyme in *Trypanosoma cruzi* Pathogenesis. **Molecular Cell**, v. 10, n. 4, p. 757–768, out. 2002.

CALLEJAS-HERNÁNDEZ, Francisco *et al.* Genomic assemblies of newly sequenced *Trypanosoma cruzi* strains reveal new genomic expansion and greater complexity. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 14631, 2 out. 2018.

CALLEJAS-HERNÁNDEZ, Francisco *et al.* Analysis of mRNA processing at whole transcriptome level, transcriptomic profile and genome sequence refinement of *Trypanosoma cruzi*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 17376, 22 nov. 2019.

CANO, Maria Isabel N. Telomere biology of Trypanosomatids: more questions than answers. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 9, p. 425–429, set. 2001.

CARO, Florence *et al.* Protein interactions within the TcZFP zinc finger family members of *Trypanosoma cruzi*: Implications for their functions. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 333, n. 3, p. 1017–1025, ago. 2005.

CARO, Florence *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Analysis of the complete PUF RNA-binding protein family. **Experimental Parasitology**, v. 113, n. 2, p. 112–124, jun. 2006.

CARVER, Tim *et al.* Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 4, p. 464–469, 15 fev. 2012.

CHEN, Shifu *et al.* fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. **Bioinformatics**, v. 34, n. 17, p. i884–i890, 1 set. 2018.

CLAYTON, Christine; SHAPIRA, Michal. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 156, n. 2, p. 93–101, dez. 2007.

COURA, José Rodrigues. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 277–282, 2 dez. 2014.

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

DE GAUDENZI, Javier G.; D'ORSO, Iván; FRASCH, Alberto C. C. RNA Recognition Motif-type RNA-binding Proteins in *Trypanosoma cruzi* Form a Family Involved in the Interaction with Specific Transcripts in Vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 21, p. 18884–18894, maio 2003.

DE MARCHI, Claudia R. *et al.* Evaluation of a Recombinant *Trypanosoma cruzi* Mucin-Like Antigen for Serodiagnosis of Chagas' Disease. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, n. 11, p. 1850–1855, nov. 2011.

DE PABLOS, Luis Miguel *et al.* Differential Expression and Characterization of a Member of the Mucin-Associated Surface Protein Family Secreted by *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 10, p. 3993–4001, out. 2011.

DE PABLOS, Luis Miguel; OSUNA, Antonio. Multigene Families in *Trypanosoma cruzi* and Their Role in Infectivity. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 7, p. 2258–2264, jul. 2012.

DI NOIA, Javier M. *et al.* High Diversity in Mucin Genes and Mucin Molecules in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 50, p. 32078–32083, dez. 1996.

DI NOIA, Javier M. *et al.* AU-rich Elements in the 3'-Untranslated Region of a New Mucin-type Gene Family of *Trypanosoma cruzi* Confers mRNA Instability and Modulates Translation Efficiency. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 14, p. 10218–10227, abr. 2000.

DI NOIA, Javier M. *et al.* 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**, v. 195, n. 4, p. 401–413, 18 fev. 2002.

DOS SANTOS, Sara Lopes *et al.* The MASP Family of *Trypanosoma cruzi*: Changes in Gene Expression and Antigenic Profile during the Acute Phase of Experimental Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 8, p. e1779, 14 ago. 2012.

EL-SAYED, Najib M. *et al.* The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 409–415, 15 jul. 2005.

EL-SAYED, Najib M. *et al.* Comparative Genomics of Trypanosomatid Parasitic Protozoa. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 404–409, 15 jul. 2005.

FERREIRA CURA DAS NEVES, Roberta *et al.* *Trypanosoma cruzi*: cell surface dynamics in trypomastigotes of different strains. **Parasitology**, v. 147, n. 3, p. 310–321, 18 mar. 2020.

FRASCH, A. C. C. Functional Diversity in the Trans-sialidase and Mucin Families in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Today**, v. 16, n. 7, p. 282–286, jul. 2000.

FREITAS, Leandro M. *et al.* Genomic Analyses, Gene Expression and Antigenic Profile of the Trans-Sialidase Superfamily of *Trypanosoma cruzi* Reveal an Undetected Level of Complexity. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, p. e25914, 19 out. 2011.

FREVERT, U.; SCHENKMAN, S.; NUSSENZWEIG, V. Stage-specific expression and intracellular shedding of the cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 6, p. 2349–2360, jun. 1992.

GERSTBERGER, Stefanie; HAFNER, Markus; TUSCHL, Thomas. A census of human RNA-binding proteins. **Nature Reviews Genetics**, v. 15, n. 12, p. 829–845, 4 dez. 2014.

HAILE, Simon; PAPADOPOULOU, Barbara. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 569–577, dez. 2007.

HENDRIKS, Edward F.; MATTHEWS, Keith R. Disruption of the developmental programme of *Trypanosoma brucei* by genetic ablation of TbZFP1, a differentiation-enriched CCCH protein. **Molecular microbiology**, v. 57, n. 3, p. 706–16, ago. 2005.

HERREROS-CABELLO, Alfonso *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Genomic Diversity and Structure. **Pathogens**, v. 14, n. 1, p. 61, 12 jan. 2025.

HUMMEL, Heidi S.; GILLESPIE, R. Dean; SWINDLE, John. Mutational Analysis of 3' Splice Site Selection during trans-Splicing. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 45, p. 35522–35531, nov. 2000.

JIMÉNEZ, Paula *et al.* A systematic review of the *Trypanosoma cruzi* genetic heterogeneity, host immune response and genetic factors as plausible drivers of chronic chagasic cardiomyopathy. **Parasitology**, v. 146, n. 3, p. 269–283, 13 mar. 2019.

JUNQUEIRA, Caroline *et al.* The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 12, p. e29, 15 set. 2010.

KIM, Dong *et al.* Telomere and subtelomere of *Trypanosoma cruzi* chromosomes are enriched in (pseudo)genes of retrotransposon hot spot and trans-sialidase-like gene families: the origins of *T. cruzi* telomeres. **Gene**, v. 346, p. 153–161, fev. 2005.

KOLEV, Nikolay G. *et al.* The Transcriptome of the Human Pathogen *Trypanosoma brucei* at Single-Nucleotide Resolution. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 9, p. e1001090, 9 set. 2010.

LANTOS, Andrés B. *et al.* Sialic Acid Glycobiology Unveils *Trypanosoma cruzi* Trypomastigote Membrane Physiology. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 4, p. e1005559, 8 abr. 2016.

LEBOWITZ, J. H. *et al.* Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. **Genes & Development**, v. 7, n. 6, p. 996–1007, jun. 1993.

LEWIS, Michael D. *et al.* A New Experimental Model for Assessing Drug Efficacy against *Trypanosoma cruzi* Infection Based on Highly Sensitive In Vivo Imaging. **SLAS Discovery**, v. 20, n. 1, p. 36–43, jan. 2015.

LI, Yuan *et al.* Transcriptome Remodeling in *Trypanosoma cruzi* and Human Cells during Intracellular Infection. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 4, p. e1005511, 5 abr. 2016.

LIAO, Yang; SMYTH, Gordon K.; SHI, Wei. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. **Bioinformatics**, v. 30, n. 7, p. 923–930, 1 abr. 2014.

LIDANI, Kárita C. F. *et al.* The Complement System: A Prey of *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 20 abr. 2017.

LOVE, Michael I.; HUBER, Wolfgang; ANDERS, Simon. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome biology**, v. 15, n. 12, p. 550, 2014.

MARCILI, Arlei *et al.* *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 5, p. 615–623, abr. 2009.

MARTIN P. VAZQUEZ. The Genetics and Genomics of *Trypanosoma cruzi*. **Vazquez, P.M., The Genetics and Genomics of Trypanosoma cruzi, International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, 2007.

MINNING, Todd A. *et al.* The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. **BMC Genomics**, v. 10, n. 1, p. 370, 7 dez. 2009.

NAKAYASU, Ernesto S. *et al.* GPIomics: global analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored molecules of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular Systems Biology**, v. 5, n. 1, 7 jan. 2009.

NAKAYASU, Ernesto S. *et al.* Improved proteomic approach for the discovery of potential vaccine targets in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of proteome research**, v. 11, n. 1, p. 237–46, 1 jan. 2012.

NARDY, Ana F. F. R. *et al.* Role of *Trypanosoma cruzi* Trans-sialidase on the Escape from Host Immune Surveillance. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 23 mar. 2016.

NILSSON, Daniel *et al.* Spliced Leader Trapping Reveals Widespread Alternative Splicing Patterns in the Highly Dynamic Transcriptome of *Trypanosoma brucei*. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 8, p. e1001037, 5 ago. 2010.

NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma Cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia clin, S. Paulo**: **208**, p. 191–208, 1953.

OLIVEIRA, Anny Caroline Silva *et al.* Biological and Molecular Effects of *Trypanosoma cruzi* Residence in a LAMP-Deficient Intracellular Environment. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 6 jan. 2022a.

OLIVEIRA, Antonio Edson R. *et al.* Gene expression network analyses during infection with virulent and avirulent *Trypanosoma cruzi* strains unveil a role for fibroblasts in neutrophil recruitment and activation. **PLOS Pathogens**, v. 16, n. 8, p. e1008781, 18 ago. 2020.

OLIVEIRA, Camila *et al.* Modulation of Virulence Factors during *Trypanosoma cruzi* Differentiation. **Pathogens**, v. 12, n. 1, p. 32, 25 dez. 2022.

OPPEZZO, Pablo *et al.* Crystal structure of an enzymatically inactive trans-sialidase-like lectin from *Trypanosoma cruzi*: The carbohydrate binding mechanism involves residual sialidase

activity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1814, n. 9, p. 1154–1161, set. 2011.

PALENCHAR, Jennifer B.; BELLOFATTO, Vivian. Gene transcription in trypanosomes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 146, n. 2, p. 135–141, abr. 2006.

PECH-CANUL, Ángel de la Cruz; MONTEÓN, Victor; SOLÍS-OVIEDO, Rosa-Lidia. A Brief View of the Surface Membrane Proteins from *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Parasitology Research**, v. 2017, p. 1–13, 2017.

PEREIRA, Karen Signori *et al.* Chagas' Disease as a Foodborne Illness. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 2, p. 441–446, fev. 2009.

PEREIRA, Miercio E. A Developmentally Regulated Neuraminidase Activity in *Trypanosoma cruzi*. **Science**, v. 219, n. 4591, p. 1444–1446, 25 mar. 1983.

PÉREZ-MOLINA, José A.; MOLINA, Israel. Chagas disease. **The Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82–94, jan. 2018.

REIS-CUNHA, Joao Luis; VALDIVIA, Hugo O.; BARTHOLOMEU, Daniella Castanheira. Gene and Chromosomal Copy Number Variations as an Adaptive Mechanism Towards a Parasitic Lifestyle in Trypanosomatids. **Current Genomics**, v. 19, n. 2, 12 jan. 2018.

SCHENKMAN, Sergio *et al.* 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**, v. 59, n. 2, p. 293–303, jun. 1993.

SILVESTRINI, Marina Malheiros Araújo *et al.* New insights into *Trypanosoma cruzi* genetic diversity, and its influence on parasite biology and clinical outcomes. **Frontiers in Immunology**, v. 15, 9 abr. 2024.

SOUZA, Renata T. *et al.* New *Trypanosoma cruzi* Repeated Element That Shows Site Specificity for Insertion. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 7, p. 1228–1238, jul. 2007.

SUDHAGAR, Arun; KUMAR, Gokhlesh; EL-MATBOULI, Mansour. Transcriptome Analysis Based on RNA-Seq in Understanding Pathogenic Mechanisms of Diseases and the Immune System of Fish: A Comprehensive Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, p. 245, 15 jan. 2018.

TEIXEIRA, Santuza M. R.; DAROCHA, Wanderson D. Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 2, n. 1, p. 148–58, 31 mar. 2003.

TEIXEIRA, Santuza M. R.; KIRCHHOFF, Louis V.; DONELSON, John E. *Trypanosoma cruzi*: Suppression of Tuzin Gene Expression by Its 5'-UTR and Spliced Leader Addition Site. **Experimental Parasitology**, v. 93, n. 3, p. 143–151, nov. 1999.

TONELLI, Renata R. *et al.* Role of the gp85/Trans-Sialidases in *Trypanosoma cruzi* Tissue Tropism: Preferential Binding of a Conserved Peptide Motif to the Vasculature In Vivo. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 11, p. e864, 2 nov. 2010.

World Health Organization (WHO). Disponível em: <<https://www.who.int/>>. Acesso em: 13 abr. 2023.

ZINGALES, Bianca *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 12, n. 2, p. 240–53, mar. 2012.

ZINGALES, Bianca. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. **Acta Tropica**, v. 184, p. 38–52, ago. 2018.

ZINGALES, Bianca; BARTHOLOMEU, Daniella C. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: impact on transmission cycles and Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 117, 2022.