



**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Parasitologia**

Ana Carolina de Araújo Leão

**Família MASP de *Trypanosoma cruzi*: expressão gênica, variabilidade antigênica e participação na infectividade do parasito**

Belo Horizonte/MG

Abril de 2019

**Ana Carolina de Araújo Leão**

**Família MASP de *Trypanosoma cruzi*: expressão gênica, variabilidade antigênica e participação na infectividade do parasito**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do Título de Doutora em Parasitologia.

Orientadora: Profa. Dra. Daniella Castanheira Bartholomeu

Área de concentração: Imunoparasitologia

Belo Horizonte/MG

Abril de 2019

Esta tese foi desenvolvida no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos, Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG, sob a orientação da Professora Dra. Daniella Castanheira Bartholomeu.

**Colaboradores:**

Prof. Dr. Sérgio Schenkman (UNIFESP/SP)

Prof. Dr. Miguel Navarro (IPBLN/Espanha)

Dra. Andréa Teixeira de Carvalho (CPqRR-Fiocruz/MG)

Dra. Gabriela Luiz (UFSC/SC)

Dra. Mariana Santos Cardoso (UFMG/MG)

Dr. Agostinho Viana (UFMG/MG)

Dra. Amaranta Malvezzi (UNIFESP/SP)

Dra. Normanda Souza (UNIFESP/SP)

Dra. Fernanda Fortes (CPqRR-Fiocruz/MG)

Dr. Ramon Brito (UFAM/AM)

Luiz Severino da Silva (UNIFESP/SP)

Marina Ribeiro (UFMG/MG)

**Instituições Parceiras:**

Universidade Federal de Minas Gerais

Universidade Federal de São Paulo

Centro de Pesquisas René Rachou- Fiocruz Minas

Instituto de Parasitologia y Biomedicina "Lopez-Neyra" (Granada, ES)

**Suporte Financeiro:**

FAPEMIG- Bolsa de Doutorado

CAPES

CNPq

*Ao Foguinho e Tiago,  
por tornarem tudo mais leve, alegre e divertido.*

“Fui ensinada que o caminho do progresso não é nem rápido nem fácil.”

Marie Curie

“Uma vez que aceitamos nossos limites, vamos além deles.”

Albert Einstein

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Dra. Daniella Castanheira Bartholomeu, por ter me recebido em seu laboratório para a minha iniciação científica, e de lá para cá ter aceitado me formar cientista, passando pelo mestrado até a conclusão do meu doutorado. Por ter dividido comigo um projeto tão importante e instigante, que me permitiu aprender e desenvolver diversas habilidades e técnicas, tornando minha formação acadêmica ainda mais rica. Por possibilitar o desenvolvimento deste projeto da melhor forma possível, permitindo que não nos faltasse os recursos necessários. Pela construção de um ambiente saudável e estimulante entre a sua equipe que torna o trabalho mais proveitoso e produtivo. Pela orientação presente, aberta e comunicativa, que nos incentiva e conduz pelo melhor caminho científico. Por todo seu profissionalismo, dedicação e ética na condução de seu trabalho, sendo um exemplo de cientista competente e bem-sucedida.

Ao Prof. Dr. Ricardo Fujiwara e à Profa. Dra. Lilian Bueno, por sempre estarem de portas abertas para me receber, com minhas dúvidas e questionamentos, e estimularem a troca científica de ótima qualidade, sendo sempre muito respeitosos e atenciosos com os estudantes. Por contribuírem com o ambiente instigante e colaborativo em nosso laboratório. Além de trabalharem para fornecer um laboratório de excelente qualidade para o desenvolvimento de nossos projetos.

Aos colaboradores deste trabalho: à aluna de iniciação científica Marina Ribeiro (UFMG), por ter sido meu braço direito nos últimos anos, me auxiliando de diversas formas no desenvolvimento do meu projeto. À Dra. Gabriela Luiz (UFSC), por ter realizado as análises de bioinformática deste projeto, por ser sempre tão prestativa e dedicada, e pela amizade ao longo destes anos. À Dra. Mariana Cardoso (UFMG) por todos os ensinamentos e colaborações ao longo da minha formação. Ao Dr. Agostinho Viana (UFMG) por ter me auxiliado com meus experimentos de citometria de fluxo, ser um ótimo amigo e parceiro de laboratório. Às Dras. Andréia Teixeira e Fernanda Fortes (CPqRR-Fiocruz/MG) pela colaboração nos experimentos de acoplamento de *beads* às proteínas. Ao Prof. Dr. Sérgio Schenkman, por ter me recebido tão bem em seu laboratório e fornecido todos os recursos necessários para o desenvolvimento dos meus experimentos. Além dos debates e trocas científicas sempre tão ricas e estimulantes. À toda equipe do professor Sérgio que me recebeu e me ajudou durante as minhas estadias em São Paulo, em especial, às doutoras Amaranta Malvezzi e Normanda Melo, que além de me auxiliarem com os meus experimentos, me receberam de braços abertos em suas casas, e por isto serei sempre muito grata. Agradeço

também ao técnico Luiz Severino da Silva por toda sua dedicação e empenho com os ensaios de infecção experimental de camundongos.

A todos os amigos do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos (LIGP/ICB/UFMG), pela convivência bem-humorada, paciência e colaboração no dia a dia. Em especial, agradeço à Michele e à Vanessa pelo suporte indispensável que nos dão para o desenvolvimento de nossos trabalhos. Pela parceria forte ao longo de todos estes anos agradeço ao João Luís, Laila, Fernando Dias, Anderson, Gabrielle, Marianna Clímaco, Ana Clara, Denise Nogueira, Thaís Elói, Williane, Lucas, Raianna, Fabrício, Raquel, Chiara, Flaviane, Ana Cris, Isabella e Rayane.

À minha família, por todo amor que me envolvem. Por me permitirem trabalhar com o que eu amo e persistir numa carreira tão cheia de adversidades. Por acreditarem em mim, me incentivarem e fornecerem todos os meios possíveis e impossíveis para que eu trilhe o meu caminho. Pelos valores que eu carrego, por todo impulso para seguir adiante e por serem também meu porto seguro. Meu muito obrigada mais especial sempre será de vocês e com vocês divido todas as minhas conquistas.

Aos meus amigos, antigos e recentes, de perto ou de longe, dos mais variados nichos e esferas, que de alguma forma estão ou estiveram presentes durante a minha trajetória. Muito obrigada pelo carinho, pelo apoio e por acreditarem em mim. Em especial agradeço ao Geraldo e todo seu grupo, e ainda à Fátima Cristina, por todo suporte psicológico, emocional e espiritual à minha caminhada.

Ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia (ICB/UFMG), na pessoa do coordenador Prof. Ricardo Fujiwara, a todos os professores que contribuíram ricamente para a minha formação e a todos os funcionários, em especial à Sumara e Sibebe, pelo apoio e agradável convivência.

Ao Departamento de Parasitologia (ICB/UFMG) e todos seus funcionários, na pessoa do chefe Prof. Stefan Geiger. Um agradecimento especial ao Seu Nery.

Ao Instituto de Ciências Biológicas (ICB/UFMG) e todos os seus funcionários, na pessoa do diretor Prof. Carlos Rosa.

À Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), na pessoa da reitora Sandra Regina Goulart.

Às agências financiadoras: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## RESUMO

*Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas (DC), é uma espécie heterogênea com alta diversidade genética e fenotípica, que circula entre insetos vetores e diferentes espécies de hospedeiros mamíferos. O sequenciamento do genoma do clone CL Brener de *T. cruzi* revelou que há uma expansão massiva de genes que codificam para famílias de proteínas de superfície, como as trans-sialidasas, mucinas, gp63 e as MASP. MASP compõem a segunda maior família multigênica de *T. cruzi*, com cerca de 1400 membros, o que sugere que esta família seja de grande importância para a biologia do parasito. As proteínas MASP contêm domínios N- e C- terminais altamente conservados que são removidos da proteína madura e uma região central extremamente variável, exposta na superfície do parasito. O elevado grau de polimorfismo da família MASP associado com a sua localização na superfície de formas infectivas de *T. cruzi* sugere que MASP participe de mecanismos de interação hospedeiro-parasito. Neste contexto, este trabalho tem como objetivo aprofundar os estudos sobre a expressão gênica, antigenicidade, além de investigar o possível envolvimento de MASP na infectividade de *T. cruzi*. Inicialmente, os membros da família foram divididos em 7 subgrupos baseados em similaridade de sequência proteica e o membro mais representativo de cada subgrupo foi escolhido para expressão heteróloga. Estas proteínas denominadas M1, M2, M3, M4, M5, M6 e M7 foram acopladas a diferentes *beads* fluorescentes e utilizadas em ensaios uniplex e multiplex de citometria de fluxo com soros de camundongos infectados com *T. cruzi* ao longo da fase aguda. Esta técnica apresentou alta sensibilidade e permitiu diferenciar a reatividade de cada MASP ao longo da infecção em um único ensaio. Na segunda parte do trabalho, foi realizada a análise da expressão e variabilidade antigênica de MASP. A seleção dos membros utilizados nesta etapa foi baseada nos níveis de expressão por RNA-seq e predição de antigenicidade, assim foram selecionadas as proteínas MASPs M9, M12, M13, M14, M18, M19 e M20. Anticorpos policlonais contra estas proteínas foram gerados e a expressão em células individuais analisada em ensaios de citometria de fluxo e imunofluorescência realizados utilizando tripomastigotas de CL Brener. Os resultados demonstraram que estas MASP não são expressas na superfície de todos parasitos na população e que estes anticorpos marcaram parasitos na população com diferentes intensidades, provavelmente devido ao compartilhamento de epítomos polimórficos que existe entre as proteínas de MASP. O próximo passo foi a produção de anticorpos monoclonais (mAb) contra membros M2, M14 e M18. Os mAbs anti-M2 e anti-M14 foram usados para enriquecer uma população de tripomastigotas para a expressão de M2 e M14, respectivamente, e os parasitos enriquecidos utilizados em ensaios de infecção experimental de camundongos em comparação com a população WT não enriquecida. Os resultados demonstraram um perfil bem distinto entre as curvas de parasitemia das populações enriquecidas em comparação a dos camundongos WT, indicando que a expressão mais homogênea de MASP na população de parasitos facilita o controle da infecção por parte do hospedeiro. Por fim, foi investigada a influência de diferentes proteínas de MASP na invasão de células hospedeiras. Foi realizado um ensaio de ligação de MASP em células L6 e resultados sugerem que alguns membros de MASP são capazes de se ligar na superfície da célula hospedeira. Ensaio de invasão com células L6 também foram realizados e, após o tratamento com as proteínas recombinantes de MASP M2, M13, M18 e M19, a infecção por *T. cruzi* nestas células foi reduzida de maneira significativa.



## ABSTRACT

*Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas' disease (DC), is a heterogeneous species with high genetic and phenotypic diversity that circulates between insect vectors and different species of mammalian hosts. Sequencing of the *T. cruzi* CL Brener genome revealed that there is a massive expansion of genes encoding for surface protein families, such as trans-sialidases, mucins, gp63 and MASPs. MASP is the second largest multigene family of *T. cruzi*, with about 1400 members, which suggests that this family is very important for the biology of the parasite. MASP proteins contain highly conserved N- and C-terminal domains that are removed from the mature protein and a highly variable central region exposed on the parasite surface. The high degree of polymorphism of the MASP family associated with its location on the surface of infective forms of *T. cruzi* suggests that MASP participates in mechanisms of host-parasite interaction. In this context, this work aims at deepen the studies on gene expression, antigenicity, and investigate the possible involvement of MASP in the infectivity of *T. cruzi*. Initially, family members were divided into 7 subgroups based on protein sequence similarity and the most representative member of each subgroup was chosen for heterologous expression. These proteins named M1, M2, M3, M4, M5, M6 and M7 were coupled to different fluorescent beads and used in uniplex and multiplex flow cytometry assays with sera from *T. cruzi* infected mice throughout the acute phase. This technique showed high sensitivity and allowed to differentiate the reactivity of each MASP throughout the infection in a single assay. In the second part of the work, the analysis of expression and antigenic variability of MASP was performed. The selection of the members used in this step was based on expression levels by RNA-seq and antigenicity prediction, thus the MASP proteins M9, M12, M13, M14, M18, M19 and M20 were selected. Polyclonal antibodies against these proteins were generated and expression in individual trypomastigotes of CL Brener analyzed by flow cytometry and immunofluorescence assays. The results demonstrated that these MASPs are not expressed on the surface of all parasites in the population and that these antibodies marked parasites in the population with different intensities, probably due to the sharing of polymorphic epitopes that exist among MASP proteins. The next step was the production of monoclonal antibodies (mAbs) against M2, M14 and M18 members. Anti-M2 and anti-M14 mAbs were used to enrich a trypomastigote population for the expression of M2 and M14, respectively, and the enriched parasites used in experimental mice infection assays as compared to the non-enriched WT population. The results showed a very distinct profile among the parasitemia curves of the enriched populations compared to the WT mice, indicating that the more homogeneous expression of MASP in the parasite population facilitates infection control by the host. Finally, the influence of different MASP proteins on invasion of host cells was investigated. A MASP binding assay was performed on L6 cells and the results suggest that some MASP members are capable of binding on the surface of the host cell. Invasion assays with L6 cells were also performed and after treatment with the recombinant MASP proteins M2, M13, M18 and M19 *T. cruzi* infection in these cells was significantly reduced.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fases clínicas da doença de Chagas.....	3
Figura 2: Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> .....	4
Figura 3: Sequência proteica consenso de MASP.....	8
Figura 4: Expressão e localização das MASPs no <i>T. cruzi</i> . (A).....	10
Figura 5: Gráfico multidimensional scaling (MDS) das sequências proteicas de MASP. .....	36
Figura 6: Proporção de subgrupos MASP no imunorranqueamento com base na predição de epítomos de células B. ....	37
Figura 7: Confirmação do acoplamento das proteínas recombinantes M1 a M7 às microesferas fluorescentes por citometria de fluxo.....	40
Figura 8: Padronização do ensaio multiplex com as proteínas MASP M1 a M7 acopladas às diferentes microesferas fluorescentes. ....	41
Figura 9: Avaliação do perfil de reatividade competitiva dos membros da família MASP de diferentes subgrupos por citometria de fluxo. ....	42
Figura 10: Avaliação da reatividade dos soros de camundongos infectados com tripomastigotas do clone CL Brener e as proteínas recombinantes M1 a M7 por intensidade média de fluorescência (MFI). ....	45
Figura 11: Antigenicidade dos membros de MASP durante a fase aguda da infecção pelo <i>T. cruzi</i> em camundongos.....	47
Figura 12: Expressão gênica diferencial de MASP ao longo do ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> .. .....	50
Figura 13: Expressão diferencial de membros distintos da família MASP pelas formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> . ....	50
Figura 14: Representação no multidimensional scaling (MDS) das proteínas de MASPs selecionadas para expressão. ....	52
Figura 15: SDS-PAGE das expressões heterólogas das proteínas recombinantes.....	54
Figura 16: Frações das purificações por cromatografia de afinidade das proteínas recombinantes de MASP. ....	54
Figura 17: Avaliação da reatividade de proteínas MASP com soros de fase aguda de animais infectados por <i>T. cruzi</i> .....	55
Figura 18: Avaliação da reatividade de proteínas MASP com soros de animais infectados pelo <i>T. cruzi</i> .....	56

Figura 19: Percentual de tripomastigotas marcadas com anticorpos policlonais anti-MASP. ....	59
Figura 20: Localização celular das proteínas MASP M2 e M18 na superfície de <i>T. cruzi</i> . ....	61
Figura 21: Reatividade cruzada dos anticorpos policlonais anti-MASP com as proteínas recombinantes de MASP. ....	62
Figura 22: Mapeamento de peptídeos de MASP reconhecidos pelos respectivos mAbs. ....	63
Figura 23: Marcação das formas tripomastigotas com mAbs anti-MASP purificados. .	64
Figura 24: Marcação das formas tripomastigotas com mAbs anti-MASP purificados e conjugados a diferentes fluoróforos. ....	65
Figura 25: Enriquecimento de uma população de tripomastigotas utilizando mAbs anti-MASP AF488. ....	66
Figura 26: Curva de parasitemia e sobrevivência de camundongos infectados com uma população de parasitos de <i>T. cruzi</i> enriquecida para expressão de M2. ....	67
Figura 27: Curva de parasitemia e sobrevivência de camundongos infectados com uma população de parasitos de <i>T. cruzi</i> enriquecida para expressão de M14. ....	68
Figura 28: Ligação de proteínas MASP recombinantes às células L6. ....	71
Figura 29: Ensaio de invasão com parasitos do clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> após o tratamento com proteínas MASP recombinantes. ....	73
Figura 30: Ensaio de invasão com parasitos do clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> após o tratamento com a proteínas MASP recombinantes.....	74
Figura 31: Ensaio de invasão com parasitos do clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> após o tratamento com as proteínas MASP recombinantes. ....	75
Figura 32: Ensaio de invasão com parasitos do clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> simultâneo ao tratamento com as proteínas de MASP recombinantes.. ....	76

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: <i>Primers</i> utilizados para expressão dos genes de MASP selecionados.. .....	20
Tabela 2: Posição das MASP representativas de cada subgrupo no imunorranqueamento dos antígenos do clone CL Brener.....	38
Tabela 3: MASP selecionadas para expressão heteróloga.....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	Bovine Serum Albumin
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleosídeo trifosfato
DTUs	Subdivisões Genéticas Discretas
DTT	1,4-Dithiothreitol
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HFF	Human foreskin fibroblasts
His	Histidina
IFA	Imunofluorescência
IgM	Imunoglobulina M
IgG	Imunoglobulina G
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo
kDA	Kilodaltons
MASP	Proteína de superfície associada a mucina
MDS	Escalonamento multidimensional
OD	Densidade Ótica
OPD	o-Phenylenediamine (dihydrochloride)
PAGE	PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
Pb	Pares de base
PBS	Tampão salina fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PM	Padrão de peso molecular
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride
RNA	Ácido ribonucleico
ROC	operação do receptor
RPKM	Reads Per Kilobase Million
SAPA	Antígeno de fase aguda secretado
SAPE	Streptavidin, R-Phycoerythrin Conjugate

SDS Dodecil sulfato de sódio  
TBS Tampão tris-salina  
TcSMP *Trypanosoma cruzi* Surface Membrane Proteins  
TEMED Tetrametil-etilenodiamina  
Th1 Células T auxiliares secretoras de citocinas do padrão um  
TLR Receptores do tipo Toll  
TM Temperatura de melting  
TNF-  $\alpha$  Fator de Necrose Tumoral Alfa  
TS Trans-sialidase  
U Unidade  
UTR Untranslated region  
WT wild type

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1.	<i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas.....	1
1.2.	O ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> .....	3
1.3.	Mecanismos de invasão celular por <i>T. cruzi</i> .....	5
1.4.	A família multigênica Mucin-Associated Surface Proteins (MASP) de <i>T. cruzi</i> .....	7
2.	JUSTIFICATIVA.....	15
3.	OBJETIVOS.....	16
3.1.	Objetivo geral.....	16
3.2.	Objetivos específicos.....	16
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
4.1.	Parasitas.....	17
4.1.1.	Obtenção das formas tripomastigotas de cultura celular.....	17
4.1.2.	Preparação do antígeno bruto.....	17
4.2.	Clusterização hierárquica e representação gráfica multidimensional scaling (MDS) da família multigênica MASP.....	17
4.3.	Imunorranqueamento do proteoma predito do clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> .....	18
4.4.	Seleção dos genes da família MASP para análise da expressão e estudo da variabilidade antigênica da família.....	18
4.5.	Desenho de <i>primers</i> para a amplificação dos genes da família MASP.....	19
4.6.	Amplificações, clonagens e subclonagens.....	21
4.6.1.	Extração do DNA genômico de <i>T. cruzi</i> .....	21
4.6.2.	Amplificações por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).....	21
4.6.3.	Clonagem dos produtos de PCR no vetor pGEM-T Easy e subclonagem no vetor de expressão pET-28a-TEV.....	21
4.7.	Transformação de bactérias competentes por eletroporação e análise dos transformantes.....	22
4.8.	Sequenciamento dos insertos clonados em pGEM-T <i>Easy</i> e pET-28a-TEV.....	22
4.9.	Indução da expressão de proteínas recombinantes em <i>E. coli</i> .....	23
4.10.	Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).....	23
4.11.	Lise das bactérias e purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade.....	23
4.12.	Produção de proteínas recombinantes MASP correspondentes aos membros centrais de cada subgrupo da família.....	24
4.13.	Soros utilizados.....	24
4.13.1.	Soros de camundongos controles.....	25
4.13.2.	Geração de anticorpos policlonais a partir de camundongos BALB/c imunizados com proteínas recombinantes de MASP.....	25

4.13.3.	Soros de camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> (CL Brener) de fase aguda .....	25
4.13.4.	Soros de camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> (CL Brener) de fase crônica .....	25
4.14.	ELISA ( <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> ).....	25
4.15.	Acoplamento das proteínas recombinantes M1 a M7 a microesferas fluorescentes .....	26
4.15.1.	Preparação das microesferas fluorescentes.....	26
4.15.2.	Preparação das proteínas recombinantes .....	26
4.15.3.	Acoplamento da proteína com as microesferas fluorescentes .....	27
4.16.	Citometria de fluxo com as microesferas fluorescentes acopladas às proteínas recombinantes de MASP .....	27
4.17.	Anticorpos monoclonais anti-MASP .....	28
4.18.	Immunoblot com mAb anti-MASP.....	28
4.19.	Purificação dos anticorpos monoclonais de sobrenadante de cultura .....	29
4.20.	Marcação de anticorpos monoclonais.....	29
4.21.	Imunofluorescência das formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	29
4.21.1.	Marcação das formas tripomastigotas com anticorpos policlonais anti-MASP: .....	29
4.21.2.	Marcação das formas tripomastigotas com mAbs anti-MASP purificados: .....	30
4.22.	Citometria de fluxo das formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	31
4.22.1.	Marcação das formas tripomastigotas com anticorpos policlonais anti-MASP: .....	31
4.22.2.	Marcação das formas tripomastigotas com mAbs anti-MASP conjugados a fluoróforos:.....	31
4.23.	Enriquecimento de parasitos reconhecidos pelos mAbs anti-MASP.....	31
4.24.	Infecção experimental de camundongos com <i>T. cruzi</i> .....	32
4.25.	Ensaio de ligação de proteínas MASP a células L6.....	32
4.26.	Ensaio de invasão celular pelo <i>T. cruzi</i> .....	33
4.27.	Análises estatísticas .....	34
5.	CAPÍTULO 01: .....	35
5.1.	Resultados.....	36
5.1.1.	Seleção de membros da família MASP baseado no padrão de diversidade das suas sequências proteicas .....	36
5.1.2.	O imunorranqueamento do proteoma CL Brener sugere que os membros de MASP são altamente antigênicos.....	36
5.1.3.	Padronização de uma metodologia baseada em citometria de fluxo para o estudo do perfil de antigenicidade de proteínas MASP .....	38
5.1.4.	Ensaio multiplex com os 7 membros representativos da família MASP .....	41



5.1.5.	Ensaio de citometria de fluxo com as proteínas MASP M1 a M7 acopladas às microesferas fluorescentes e soros de camundongos em fase aguda da infecção .....	43
5.1.6.	Avaliação da variação do perfil de reconhecimento de proteínas MASP durante a fase aguda da infecção.....	45
6.	CAPÍTULO 02: .....	48
6.1.	Resultados.....	49
6.1.1.	Seleção dos membros de MASP para estudo baseado no padrão de expressão e antigenicidade.....	49
6.1.2.	Expressão em <i>E. coli</i> de proteínas recombinantes de MASP .....	53
6.1.3.	Purificação das proteínas recombinantes de MASP .....	54
6.1.4.	Avaliação da reatividade das proteínas MASP com soros de animais infectados com <i>T. cruzi</i> .....	55
6.1.5.	Obtenção dos soros de camundongos BALB/c imunizados com as proteínas recombinantes de MASP .....	56
6.1.6.	Citometria de fluxo das formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> utilizando anticorpos policlonais anti-MASP .....	57
6.1.7.	Imunofluorescência (IFA) das formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> utilizando anticorpos policlonais anti-MASP .....	60
6.1.8.	Anticorpos monoclonais anti-MASP.....	62
6.1.9.	Immunoblot com mAb anti-MASP .....	63
6.1.10.	Imunofluorescência das formas tripomastigotas com mAbs anti-MASP purificados.....	63
6.1.11.	Citometria de fluxo das formas tripomastigotas com mAbs anti-MASP purificados e conjugados a fluoróforos .....	64
6.1.12.	Enriquecimento de uma população de tripomastigotas reconhecidas pelos mAbs anti-MASP .....	65
6.1.12.	Avaliação do papel de proteínas MASP na infectividade de <i>T. cruzi</i> através de ensaios de infecção <i>in vivo</i> .....	67
7.	CAPÍTULO 03: .....	70
7.1.	Resultados.....	71
7.1.1.	Capacidade de ligação das proteínas recombinantes MASP a mioblasto .....	71
7.1.2.	Análise da taxa de invasão de tripomastigotas após o tratamento com as proteínas da família MASP .....	72
8.	DISCUSSÃO.....	77
9.	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	94
10.	BIBLIOGRAFIA.....	95

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

A doença de Chagas (DC) é uma antropozoonose causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. Tanto o protozoário quanto a doença foram, inicialmente, descritos pelo médico, pesquisador e sanitarista Carlos Ribeiro Justiniano Chagas em 1909 (Chagas 1909).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), DC é classificada entre as 17 “doenças tropicais negligenciadas”. A OMS também estima que aproximadamente 8 milhões de pessoas estejam infectadas com *T. cruzi* em todo o mundo, com quase 100 milhões em risco de infecção; além disso, mais de 10.000 mortes por ano podem ser atribuídas à DC, tornando-a um sério problema de saúde pública (Echeverria and Morillo 2019; WHO 2018). Pessoas infectadas pela DC são encontradas, sobretudo, em áreas endêmicas de 21 países latino-americanos (WHO, 2018). Porém, principalmente devido à migração, casos recentes da doença têm sido reportados também em outras áreas, como Europa, América do Norte, Japão e Austrália (Balouz, Buscaglia, and Aires 2017; Chatelain 2017; Echeverria and Morillo 2019).

Segundo dados do Ministério da Saúde, estima-se que existam no Brasil, atualmente, pelo menos um milhão de pessoas infectadas por *T. cruzi* (Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde 2019). Em 2006 o Brasil recebeu a certificação internacional da interrupção da transmissão vetorial pelo *Triatoma infestans*, espécie exótica e responsável pela maior parte da transmissão vetorial no passado, devido a ações de controle de vetores realizadas a partir de 1970. Estas ações alteraram o quadro epidemiológico da DC no país que promoveram mudanças nas medidas de vigilância epidemiológica. Entretanto, o risco de transmissão vetorial da doença de Chagas continua, isto se dá em função da existência de outras espécies de triatomíneos autóctones com elevado potencial de colonização, como também pela presença de reservatórios de *T. cruzi* e da aproximação cada vez mais frequente das populações humanas a esses ambientes, além da persistência de focos residuais de *T. infestans*, ainda existentes em alguns municípios dos estados da Bahia e do Rio Grande do Sul (Bello Corassa et al. 2017). Outros fatores também contribuem para manutenção da transmissão da DC no Brasil, como a ocorrência de casos e surtos por transmissão oral pela ingestão de alimentos (caldo de cana, açaí, bacaba, entre outros) contaminados com os insetos vetores infectados; pela transmissão vetorial domiciliar sem colonização, e vetorial

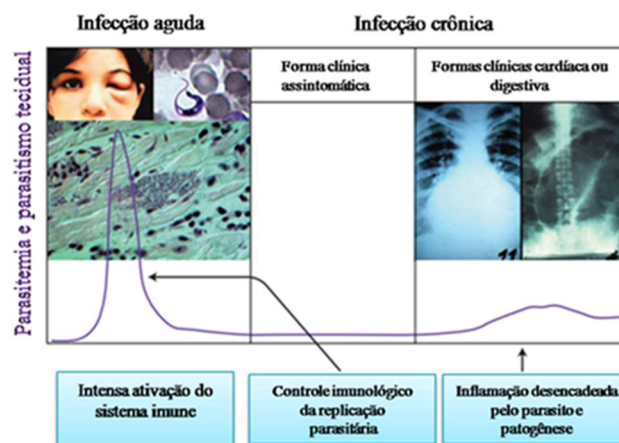
extradomiciliar, principalmente na Amazônia Legal (Martins-Melo et al., 2018). Dados do Ministério da Saúde também revelaram que entre o período de 2008 a 2017 foram registrados casos confirmados de doença de Chagas aguda na maioria dos estados brasileiros. Sendo que a maior distribuição, cerca de 95%, concentra-se na região Norte, e destes, o estado do Pará é responsável por 83% dos casos. Em relação às principais formas de transmissão ocorridas no país, 72% foram por transmissão oral, 9% por transmissão vetorial e em 18% não foi identificada a forma de transmissão (Bello Corassa et al. 2017).

A partir disto, é possível concluir que mesmo com programas de controle de ocorrência de novos casos da doença, a magnitude da DC no Brasil permanece relevante. Apesar de não haver dados sistemáticos relativos à prevalência da doença, em estudos recentes as estimativas de prevalência variaram de 1,0 a 2,4% da população, o equivalente a 1,9 a 4,6 milhões de pessoas infectadas por *T. cruzi*. Reflexo disso é a elevada carga de mortalidade por DC no país, representando uma das quatro maiores causas de mortes por doenças infecciosas e parasitárias (Martins-Melo et al. 2018).

Mesmo diante deste quadro, atualmente, ainda existem apenas duas drogas tripanocídicas, benznidazol e nifurtimox, disponíveis para quimioterapia da DC. Ambas são nitroheterocíclicos, compostos orais que requerem administração prolongada, podem apresentar efeitos adversos graves, não podem ser utilizados para tratar mulheres grávidas devido aos seus incertos riscos teratogênicos e, o mais importante, apresentam alta eficácia apenas se administrados no início da infecção (Carlier e Truyens, 2015; Rassi, Rassi and Marin-Neto, 2010; Viotti et al., 2006). As perspectivas para o desenvolvimento de uma vacina eficaz para fins profiláticos e/ou terapêuticos, por outro lado, ainda estão obscurecidas por importantes desafios científicos e socioeconômicos (Beaumier et al., 2016; Bustamante e Tarleton, 2015).

A doença de Chagas tem efetivamente duas fases clínicas (Figura 1). A fase aguda (fatal para 2-8% das pessoas infectadas), dura até 2 meses e, podendo ser assintomática. A carga de parasitos atinge o pico nesta fase e podem ser detectados no sangue através de exame direto usando microscopia ou técnicas mais sensíveis como PCR (Chatelain 2017). Aparentemente, *T. cruzi* é capaz de invadir qualquer célula nucleada do hospedeiro vertebrado e, portanto, atinge diferentes tecidos e órgãos. Após alguns ciclos de infecção celular, o sistema imune é então ativado, resultando em uma redução drástica na carga parasitária com controle subsequente da infecção, sem eliminação do parasito (Chatelain

2017). Neste estágio da infecção, a carga parasitária é de difícil detecção por métodos microscópicos. O controle altamente eficiente do parasito é o resultado de uma intensa resposta inflamatória com produção de anticorpos ativos e ativação da resposta imune inata (células natural killer, macrófagos e células dendríticas) levando a produção de citocinas pró-inflamatórias Th1, como o TNF- $\alpha$  e o IFN- $\gamma$  (Echeverria and Morillo 2019; Pérez-Molina and Molina 2017). Em seguida, as pessoas infectadas entram então na chamada fase crônica da doença que pode ser dividida em dois estágios: o crônico assintomático (ou indeterminado) que pode durar décadas após a infecção, no qual os pacientes são positivos nos testes diagnósticos, principalmente naqueles sorológicos, mas não apresentam sintomatologia clínica evidente. Nesta fase, a infecção é controlada, mas o sistema imune pode não prevenir a progressão da doença. Parte dos chagásicos assintomáticos se convertem então em sintomáticos, em geral décadas após a infecção, o que corresponde a 10 a 40% dos pacientes infectados, com cardiomiopatias e patologias do trato digestivo (Chatelain 2017; Coura and Borges-Pereira 2010; Echeverria and Morillo 2019).



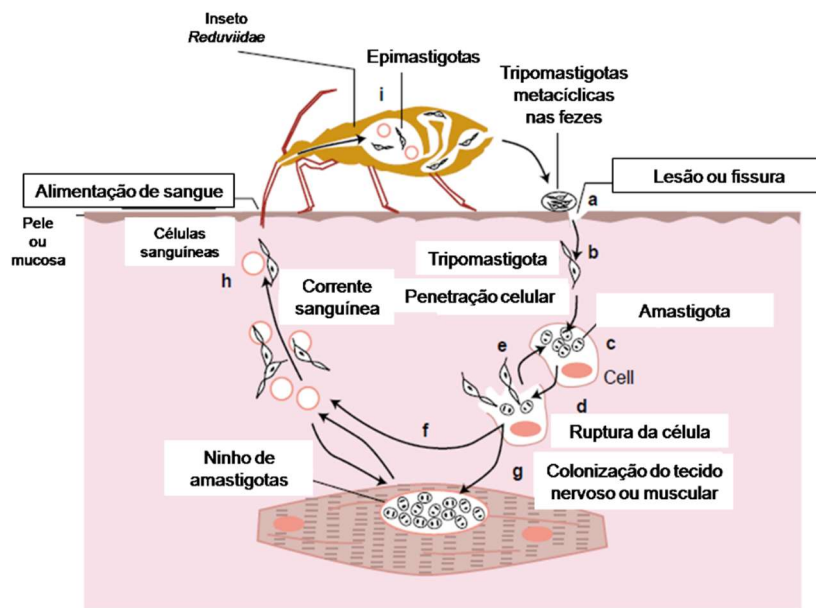
**Figura 1: Fases clínicas da doença de Chagas.** Retirada e modificada de Junqueira et al., 2010.

## 1.2. O ciclo de vida de *T. cruzi*

*T. cruzi* é uma espécie heterogênea com alta diversidade genética e fenotípica. Circula entre insetos vetores e diferentes espécies de hospedeiros mamíferos, e atualmente é classificada em seis grupos (TcI a TcVI), conhecidos como *discrete typing units* (DTU). Essa diversidade genética tem sido relacionada à distribuição geográfica, patogênese, características clínicas e resposta à terapia (Pérez-Molina and Molina 2017; Zingales et al. 2012).

O ciclo biológico de *T. cruzi* é do tipo heteroxênico passando o parasito por uma fase de multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado que inclui o homem e diversos outros mamíferos, e uma fase extracelular no inseto vetor, que são triatomíneos da família Reduviidae (Chagas 1909; Coura and Borges-Pereira 2010).

*T. cruzi* se replica como forma epimastigota no intestino de diferentes espécies de triatomíneos e se desenvolve na forma infectante tripomastigota metacíclica quando alcança a porção retal, sendo excretado junto com as fezes e/ou urina do barbeiro. A infecção de mamíferos ocorre, geralmente, com a inoculação das formas metacíclicas na mucosa ocular ou através de alguma lesão da pele (De Souza, De Carvalho, and Barrias 2010). Uma vez no hospedeiro vertebrado, as formas metacíclicas podem invadir diversos tipos de células nucleadas, transformando-se em amastigotas que sofrem vários ciclos de divisão binária no citoplasma da célula parasitada. Após 4-5 dias, as amastigotas se diferenciam novamente em tripomastigotas que são liberadas no sangue pelo rompimento da célula infectada. As tripomastigotas sanguíneas podem invadir novas células ou, eventualmente, serem ingeridas pelo inseto vetor durante sua alimentação dando continuidade ao ciclo de vida do parasito (Figura 2) (Brenner 1973).



**Figura 2: Ciclo de vida do *T. cruzi*.** a) Tripomastigotas metacíclicas são excretadas nas fezes ou urina do triatomíneo e penetram o hospedeiro vertebrado b) Tripomastigotas metacíclicas invadem as células. c) E se transformam em amastigotas. d) Amastigotas se multiplicam por divisão binária dentro das células. e,f) Amastigotas intracelulares se transformam em tripomastigotas, rompem a célula e caem na corrente sanguínea. g) Amastigotas colonizam tecidos nervosos ou musculares h) Triatomíneos ingerem as formas tripomastigotas durante o repasto sanguíneo. i) Epimastigotas no intestino do vetor se multiplicam e se transformam em tripomastigota metacíclica (Macedo, Oliveira, and Pena 2003).

### 1.3. Mecanismos de invasão celular por *T. cruzi*

O protozoário *T. cruzi* pode infectar diversos tipos de células nucleadas no hospedeiro vertebrado. Nos estágios iniciais da infecção intracelular, o parasito se localiza em um vacúolo parasitóforo, porém depois de algumas horas é encontrado livre no citosol, onde se multiplica como forma amastigota. O baixo pH do vacúolo parasitóforo é necessário para ativar os mecanismos de escape do parasito deste ambiente, uma vez que foi demonstrado que o aumento do pH bloqueia a saída do parasito para o citoplasma (Ley et al. 1990). Especula-se que uma molécula secretada por *T. cruzi*, uma hemolisina otimamente ativa em pH 5,5, participe do processo de ruptura do vacúolo, apesar deste componente do parasito não ter sido identificado molecularmente até o momento (Norma W Andrews, Charles K Abrams, Stephen L Slatin 1990).

O mecanismo que dá origem ao vacúolo contendo *T. cruzi* diferencia-se da fagocitose clássica. Schenkman et al. 1988 demonstraram que em células epiteliais e fibroblastos não são observados pseudópodes ou outras alterações superficiais durante a entrada do parasito. Estas observações levantaram a questão de como se dá a entrada de *T. cruzi* na célula hospedeira uma vez que os filamentos de actina e o mecanismo clássico de "zíper" não estão envolvidos. Foi então demonstrado por Tardieux et al., 1992 que os lisossomos se agregam progressivamente em torno do parasito no processo de invasão celular e que esta fusão com os lisossomos seria um requisito para a formação do vacúolo parasitóforo, uma vez que o comprometimento da competência da fusão lisossômica resultava na inibição da entrada de *T. cruzi*.

Em seguida, Tardieux, et al., 1994 demonstraram que as formas tripomastigotas induziam aumentos de cálcio livre no citosol ( $[Ca^{2+}]_i$ ) em fibroblastos, o que sugeriu que a sinalização de  $Ca^{2+}$  era necessária para a invasão e que o influxo de  $Ca^{2+}$  é um componente necessário do processo de sinalização induzido pelo parasito (Tardieux et al., 1994). Foi mostrado também que a elevação inicial  $[Ca^{2+}]_i$  era mediada pela fosfolipase C (PLC), pela formação do inositol 1,4,5-trisfosfato ( $IP_3$ ) e liberação de  $Ca^{2+}$  dos reservatórios intracelulares. O aumento resultante em  $[Ca^{2+}]_i$  induzia uma reorganização transitória de microfilamentos de actina, em um padrão consistente com um papel na facilitação da invasão do parasito (Rodríguez, Rioult, and Ora 1995). Posteriormente, foi revelado que esta elevação de  $[Ca^{2+}]_i$  em células hospedeiras mediada por  $IP_3$  (Rodríguez et al. 1996) requeria uma serina-peptidase citosólica do parasito, a oligopeptidase B (OpdB) (Burleigh et al. 1997).

Um segundo caminho de entrada envolvendo a membrana plasmática foi sugerido por estudos morfológicos (Schenkman and Mortara 1992) e caracterizado após a inibição do recrutamento e fusão lisossômica precoce por inibidores da fosfoinositol (PI) 3-quinase (Woolsey et al. 2003). Em células tratadas com wortmanina, a via de entrada lisossômica é abolida, mas a invasão de parasitos ainda é detectada. Os parasitos entram nas células envolvidos em vacúolos contendo marcadores de membrana plasmática, por um mecanismo independente da polimerização de actina das células hospedeiras (Woolsey et al., 2003). Esta população de vacúolos parasitóforos derivados da membrana plasmática também adquire gradualmente marcadores lisossômicos, através de um processo de maturação único que não está bloqueado pelos inibidores da PI<sub>3</sub>-quinase (Woolsey et al. 2003).

A demonstração de que *T. cruzi* promove a exocitose de lisossomos dependente de Ca<sup>2+</sup> em vários tipos de células (Tardieux et al., 1992, 1994; Rodriguez et al., 1995; Burleigh et al., 1997) sugeriu que essas organelas, uma vez consideradas como compartimentos terminais da via endocítica, também poderiam funcionar como vesículas secretoras reguladas capazes de se fundir com a membrana plasmática. Uma investigação desta questão demonstrou que o influxo de Ca<sup>2+</sup> desencadeava um mecanismo de reparo da membrana plasmática em que os lisossomos são exocitados e enzimas lisossômicas são rapidamente liberadas no meio extracelular, um processo que coincide com a recuperação celular e a prevenção da liberação de proteínas citosólicas (Idone et al., 2008). Além disso, imagem de células vivas revelou que a exocitose dos lisossomos não é o único evento de tráfico de membrana desencadeado durante o reparo da membrana plasmática. Uma forma rápida de endocitose é observada segundos após a formação de poros em condições que permitem o reparo da membrana plasmática (na presença de Ca<sup>2+</sup> extracelular). Portanto, os estudos sobre a invasão celular por *T. cruzi* revelaram que o processo de invasão pelo parasito se assemelha ao mecanismo pelo qual as células de mamíferos reparam lesões em sua membrana plasmática (Idone et al., 2008; Tam et al., 2010), demonstrando que os parasito subverte um mecanismo *housekeeping* fundamental para infectar seus hospedeiros (revisado por Fernandes and Andrews, 2012).

O envolvimento de ligantes do parasito e/ou receptores das células hospedeiras na invasão pelo *T. cruzi* tem sido amplamente estudado (Fernandes and Andrews 2012; Maeda, Cortez, and Yoshida 2012). Várias moléculas de superfície do parasito já foram identificadas por interagirem com componentes do hospedeiro para invadir as células de

mamíferos. Ruiz et al. 1998 demonstraram que a gp82 purificada se liga de forma menos eficiente às células HeLa do que gp90 ou gp35/50, mas que a gp82 é capaz de ativar a sinalização  $Ca^{2+}$  nesta célula. (revisado por De Souza, De Carvalho and Barrias, 2010). Algumas proteases de *T. cruzi* também foram implicadas nas infecções celulares do hospedeiro, como cruzipaina, oligopeptidase B e Tc80. Entre as moléculas também conhecidas por induzir sinalização celular estão o pequeno antígeno de superfície de tripomastigotas (TSSA-*Trypomastigote Small Surface Antigen*) e a família de proteínas de superfície de membrana de *T. cruzi* (TcSMP) (Cámara et al. 2017; Martins et al. 2015).

#### **1.4. A família multigênica Mucin-Associated Surface Proteins (MASP) de *T. cruzi***

O sequenciamento do genoma do clone CL Brener de *T. cruzi* revelou que o genoma haploide é composto por aproximadamente 12.000 genes, sendo que uma parte expressiva deste é composta por genes que codificam para famílias de proteínas de superfície, tais como as trans-sialidades (TS), mucinas, metaloproteases gp63 e a família multigênica MASP (Najib M El-Sayed et al. 2005). As MASP apenas foram identificadas após o sequenciamento do genoma e, como a maioria dos seus membros estão localizados *downstream* das mucinas TcMUC II, a família foi denominada *Mucin-Associated Surface Protein* (MASP) (El-Sayed et al., 2005; Bartholomeu et al., 2009). Dos 1377 genes de MASP identificados, 771 estavam intactos, contendo domínios conservados de N- e C-terminal de MASP, e 433 eram pseudogenes. Foi observado também a existência de quimeras (26) que contêm o domínio conservado N- ou C-terminal de MASP combinado com o domínio N- ou C-terminal de mucina ou o domínio C-terminal da superfamília TS. A existência de algumas destas quimeras foi confirmada por sequenciamento de bibliotecas de cDNA (Bartholomeu et al., 2009). É possível que essas sequências quiméricas tenham se originado por meio de conversão de genes segmentados, favorecidos pelo agrupamento de genes de proteínas de superfície no genoma do parasito. Os eventos de recombinação dentro e entre famílias de genes podem gerar um repertório ilimitado de proteínas do parasito exposta ao hospedeiro (Bartholomeu et al. 2009; Najib M El-Sayed et al. 2005).

Os membros de MASP contêm domínios N- e C- terminais altamente conservados que codificam para um peptídeo sinal e um sítio de adição de âncora GPI, respectivamente, que direcionam a proteína para a superfície do parasito. A região central dessas proteínas é variável tanto em sequência quanto em comprimento, variando de 176



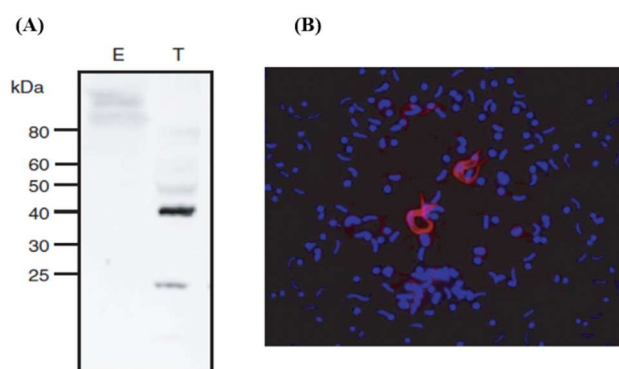


variáveis (VSG e VAR, respectivamente) são frequentemente subteloméricos nos megacromossomos (Berriman et al. 2005; Gardner et al. 2002).

O agrupamento de genes de proteínas de superfície de *T. cruzi* internamente nos cromossomos pode correlacionar-se com a ausência de variação antigênica clássica. O mecanismo de variação antigênica existente em alguns patógenos se caracteriza pelo fato dos organismos possuírem uma "família" de proteínas altamente imunogênicas que recobrem toda sua superfície e que apresentam expressão monoalélica, ou seja, um único gene da família é expresso em cada indivíduo, em um dado momento (McCulloch et al. 2017; Mugnier, Stebbins, and Papavasiliou 2016). À medida que a parasitemia no hospedeiro vertebrado aumenta e níveis altos anticorpos são produzidos contra a variante expressa, fatores genéticos ou epigenéticos levam a uma mudança de expressão para outro membro da mesma família que não é reconhecido pelos anticorpos direcionados para a variante anterior, e novo aumento de parasitemia é observado (Morrison, McCulloch, and Hall 2014). Na infecção de hospedeiros mamíferos pelo *T. brucei*, o parasito "altera" a expressão da VSG (*Variant Surface Glycoprotein*) ao longo da infecção, a partir de um repertório genômico de mais de 1.000 genes da família (Cestari and Stuart 2018; Mugnier et al. 2016; Santos et al. 2018). Em *T. b. brucei*, cerca de 80% deste repertório consiste de genes incompletos ou pseudogenes, que participam de processos de recombinação contribuindo para a geração de variabilidade (Berriman et al. 2005; Cross, Kim, and Wickstead 2014).

Em *T. cruzi*, diferentemente desta expressão monoalélica da VSG que ocorre na superfície do *T. brucei*, o revestimento das tripomastigotas é formado pela expressão de diversas proteínas de superfície, como as mucinas *O*-glicosiladas, as trans-sialidase (TS), as MASPs, as glicoproteínas de superfície gp85, o antígeno de superfície pequeno de tripomastigota (TSSA), dentre outras. Todas estas proteínas de superfície são codificadas por famílias de genes altamente polimórficos e são co-expressos em uma população de parasitos em um dado momento (Agüero F1, Abdellah KB, Tekiel V, Sánchez DO 2004; Bartholomeu et al. 2009; Buscaglia et al. 2004). Especula-se que esta variabilidade de componentes de superfície confira ao parasito a capacidade de interagir com diferentes constituintes da membrana celular hospedeira e/ou matriz extracelular, como também evadir do sistema imune do hospedeiro vertebrado (revisado por Mucci, Lantos, Buscaglia, Leguizamón, & Campetella, 2016).

Em relação à família multigênica MASP, análises de uma biblioteca de cDNA de tripomastigotas demonstrou a expressão simultânea de múltiplos membros de MASPs, porém com a tendência de maior expressão de um subgrupo em particular (Bartholomeu et al. 2009). Além disso, ensaios de imunofluorescência (Figura 4B) também revelaram que a expressão de MASP na superfície das formas tripomastigotas é heterogênea na população de parasito. Isso porque, somente 5% dos parasitos de uma população expressaram membros MASP contendo o peptídeo 7 (Figura 4B), que está presente em 14% de todas as proteínas MASP codificadas por genes intactos. Esses achados demonstram que a expressão de algumas MASP em particular na membrana celular é limitada a algumas células da população de parasitos (Bartholomeu et al. 2009). Se um tripomastigota individual expressa um único gene de MASP, co-expressa diferentes membros da família ou pode não expressar MASP ainda precisa ser investigado.



**Figura 4: Expressão e localização das MASPs no *T. cruzi*.** (A) Western blot de extratos de epimastigotas e tripomastigotas utilizando anticorpo contra o peptídeo 7, que é específico de MASP. (B) Imunofluorescência de tripomastigotas incubados com o anticorpo anti-MASP e anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com Texas Red (Molecular Probes). Regiões em azul correspondem ao núcleo e cinetoplasto do parasito corado com DAPI. Extraído de Bartholomeu et al. 2009).

A hipótese formulada pelo nosso grupo é que o grande repertório de peptídeos MASP pode contribuir para a capacidade de *T. cruzi* infectar e/ou sobreviver dentro de vários tipos de células hospedeiras e/ou participar de mecanismos de evasão imune do hospedeiro (Bartholomeu et al., 2009; dos Santos et al., 2012). Para começar a investigar essa hipótese, sete bibliotecas de expressão, a partir de tripomastigotas de cultura de tecidos derivadas de dois tipos celulares (células epiteliais e mioblastos) e de tripomastigotas sanguíneos recuperados após passagens sequenciais em camundongos, foram construídas (dos Santos et al. 2012). Para todas as bibliotecas, o perfil de amplificação por *nested* RT-PCR utilizando primers que codificavam para as regiões conservadas de MASP, do *spliced leader* e 3'UTR, apresentou um *smear* indicando a co-

expressão de vários transcritos MASP com diferentes comprimentos (dos Santos et al. 2012). Os tripomastigotas sanguíneos derivados de uma dada passagem indicaram a expressão de genes MASP pertencentes a cinco subgrupos diferentes, indicando uma ampla expressão de diferentes genes MASP. Para melhor acessar a variabilidade de expressão de MASP nestas bibliotecas, para todas as MASP possíveis foram desenhados primers específicos para análise por qRT-PCR (dos Santos et al. 2012). A expressão diferencial significativa foi observada por qRT-PCR para algumas MASP entre os tripomastigotas sanguíneos a partir de passagens sequenciais em camundongos. MASP2 e MASP27 foram significativamente mais expressas em tripomastigotas sanguíneas após 10 passagens em camundongos em comparação com tripomastigotas após duas passagens. Em contraste, a MASP16 foi significativamente mais expressa nas formas de circulação sanguínea após duas passagens em camundongos. Estes resultados indicam que o perfil de expressão de genes MASP distintos é heterogêneo e pode variar após passagens sequenciais em camundongos (dos Santos et al. 2012).

Para investigar se os tripomastigotas de cultura de tecidos tinham um perfil de expressão de MASP distinto em comparação com as formas de circulação sanguínea, parte da população de tripomastigotas coletadas após duas passagens em camundongos foi usada para infectar células mioblastos (L6) e epiteliais (LLC-MK2), e após 4 passagens em cultura, o RNA foi extraído para construção da biblioteca. Ambas as bibliotecas, mostraram um padrão de expressão muito semelhante, mas diferenças no perfil de expressão em comparação com as tripomastigotas sanguíneas após duas passagens em camundongos foram observadas e confirmadas por qRT-PCR. Alterações significativas na expressão de MASP ao comparar tripomastigotas das células hospedeiras (células L6 e LLC-MK2) só foi observada após um maior número de passagens do mesmo tipo celular (14 passagens). Semelhante ao observado nas outras bibliotecas, também foi observada a co-expressão de genes MASP em cinco grupos diferentes. Foi observado por qRT-PCR que MASP2, MASP14 e MASP16 foram mais expressas em tripomastigotas derivadas de L6 quando comparado às tripomastigotas derivadas de LLC-MK2 após 14 passagens (dos Santos et al. 2012). Se esses membros específicos de MASP estão implicados na invasão, replicação e/ou sobrevivência de tripomastigotas nas células L6 ainda são necessárias maiores investigações. No entanto, ao realizar ensaios de invasão, dos Santos et al., 2012 puderam perceber uma associação entre o perfil de MASP e a infectividade de tripomastigotas derivados de L6 através da

avaliação da taxa de invasão de células L6 e LLC-MK2 pela mesma população de tripomastigotas que foram mantidas por 17 passagens consecutivas em células L6. A taxa de invasão de células L6 foi maior em comparação com LLC-MK2, sugerindo que passagens sucessivas de tripomastigotas em uma determinada célula hospedeira podem configurar um perfil de expressão específico que otimize a taxa de invasão (dos Santos et al. 2012).

Em seguida, também foi investigado o perfil antigênico das proteínas MASP utilizando soros de camundongos infectados ao longo da fase aguda infecção, e os resultados mostraram que diferentes membros da família MASP são expressos durante a infecção aguda por *T. cruzi* e que as MASP constituem antígenos do parasito reconhecidos por anticorpos IgG e IgM. Os resultados também indicaram que peptídeos MASP distintos podem desencadear diferentes respostas de anticorpos e que o nível de anticorpo contra um determinado peptídeo pode variar após as passagens sequenciais em camundongos (dos Santos et al. 2012).

A expansão maciça de genes de MASP no genoma de *T. cruzi*, sugere que esta família possa ser crítica para a sobrevivência do parasito. A capacidade de *T. cruzi* de infectar uma variedade de tipos de células é uma característica essencial na estratégia de sobrevivência do parasito e o distingue de outros parasitos protozoários da família Trypanosomatidae. Nós especulamos que a região central MASP altamente variável pode contribuir para um grande repertório de peptídeos que podem interagir com diferentes receptores de uma pluralidade de tipos de células hospedeiras (Bartholomeu et al. 2009; De Pablos and Osuna 2012; dos Santos et al. 2012). Além disso, a expressão desta família nas formas infecciosas do parasito, nos levam a acreditar que algumas proteínas codificadas por esses genes podem estar envolvidas no processo de invasão e no estabelecimento do parasito no interior da célula hospedeira.

Outra possível função de MASP que pode explicar o alto nível de polimorfismo da família seria seu envolvimento em mecanismos de evasão do sistema imune. Além do seu polimorfismo extremo, a localização na superfície de tripomastigotas e as propriedades de *shedding*, outra característica que reforça essa hipótese é o grande repertório de motivos repetitivos distintos das proteínas MASP (Najib M El-Sayed et al. 2005). Já foi demonstrado que a expressão de proteínas repetitivas é um fenômeno comum entre os parasitos que evitam persistentemente a sua destruição pelo sistema imune dos hospedeiros. Várias proteínas de *Leishmania* e *T. cruzi* contendo motivos de

aminoácidos repetitivos foram descritas como alvos da resposta imune de células, as proteínas de superfície de *Leishmania* A2 (Fernandes et al., 2014) e HSP (Depledge et al., 2010), ambas contendo grandes domínios repetitivos, foram identificadas como antígenos que são fortemente reconhecidos por anticorpos de indivíduos infectados. Entre as proteínas de superfície de *T. cruzi* contendo aminoácidos repetitivos em tandem, os antígenos B13 (Duranti et al., 2012), TS (Freitas et al., 2011), mucinas (Giorgi e de Lederkremer, 2011) e as MASP (dos Santos et al., 2012), são alvos já descritos da resposta imune humoral do hospedeiro. A família MASP, juntamente com outras proteínas de superfície de *T. cruzi*, pode contribuir para a ativação de linfócitos policlonais que leva a hipergamaglobulinemia e a resposta imune humoral específica tardia, característica da fase aguda da doença de Chagas (Durante et al. 2017; dos Santos et al. 2012). Estes fenômenos são sugeridos como um mecanismo de evasão imune (Bermejo et al. 2011; Cardoso, Reis-Cunha, and Bartholomeu 2016; Minoprio 2001). A ativação de linfócitos B policlonais pode levar ao desenvolvimento de uma resposta imune pouco específica evitando a geração de anticorpos com propriedades neutralizantes contra o parasito e sua eliminação completa.

Outras funções também foram atribuídas às repetições em tandem de aminoácidos de *T. cruzi*. Vários estudos mostraram que a repetição SAPA (antígeno secretado de fase aguda), de um subgrupo da família de proteínas TS, é um antígeno independente de células T do tipo I, um mitógeno de células B que atua atraindo anticorpos para longe do sítio catalítico das TS (Risso et al., 2007; Dc-Rubin e Schenkman, 2012). As proteínas ribossômicas de parasitos que contêm repetições de aminoácidos estão também entre os antígenos altamente imunogênicos identificados em estudos em que foram utilizados soros de indivíduos com leishmaniose e doença de Chagas (Ramírez et al., 2013; Longhi et al., 2014). Um desses antígenos é a proteína homóloga de *T. cruzi* à proteína ribossômica L7a de eucariotos, um componente da grande subunidade do ribossomo. Estudos recentes de imunização em conjunto com os resultados de ensaios de proliferação *in vitro* indicaram que o domínio repetitivo em *T. cruzi* da proteína L7a possui propriedades reguladoras da imunidade que ajudam o parasito a evadir da resposta imune específica do hospedeiro (Toro Acevedo et al. 2017).

Em vista do que foi exposto acima, ainda permanece sem resposta várias questões fundamentais sobre a função das MASPs. Entender se de fato existe uma relação entre a expansão do número de membros desta família, bem como o seu elevado polimorfismo,

com a capacidade do *T. cruzi* de infectar qualquer célula nucleada no hospedeiro vertebrado, é de verdadeira relevância na compreensão da função destas proteínas, bem como contribuirá para um melhor entendimento sobre processos biológicos associados ao sucesso evolutivo do parasito. Neste contexto, será que diferentes membros de MASP são expressos preferencialmente quando o parasito infecta diferentes tipos celulares? Esta é uma das perguntas que pretendemos esclarecer para elucidar se existe um papel primordial das MASPs na invasão celular por *T. cruzi*.

Outro aspecto importante seria tentar entender se a expansão massiva no genoma de *T. cruzi* desta família tão polimórfica, repetitiva e expressa na superfície das formas tripomastigotas circulantes estaria relacionada com mecanismos de evasão do sistema imune. Algo semelhante ao que acontece com as VSG de *T. brucei*, mesmo que a estratégia de *T. cruzi* seja diferente e não utilize a expressão monoalélica. Será que o parasito co-expressa diferentes membros de MASP como uma forma de impedir o hospedeiro de montar uma resposta imune mais eficiente nas fases iniciais da infecção e assim levar à cronificação da doença? Será que a resposta imune do hospedeiro vertebrado poderia levar à seleção de subpopulações de parasitos expressando diferentes membros de MASP ao longo da infecção, favorecendo a sobrevivência do parasito no hospedeiro vertebrado? São também importantes interrogações que ainda precisam ser melhor compreendidas sobre a família MASP de *T. cruzi*.

## 2. JUSTIFICATIVA

MASP é a mais polimórfica e a segunda maior família multigênica de *T. cruzi*, com cerca de 1400 membros. Os membros de MASP contêm domínios N- e C- terminais altamente conservados, que codificam motivos de direcionamento da proteína para a superfície do parasito, porém a região central dessas proteínas é extremamente variável tanto em sequência quanto em tamanho. O elevado grau de polimorfismo da família MASP associado com a sua localização na superfície de formas tripomastigotas infectivas de *T. cruzi* sugerem que MASP possa participar de mecanismos de interação hospedeiro-parasito (Bartholomeu et al. 2009; Najib M El-Sayed et al. 2005). Entretanto, ainda não sabemos quais são as funções da família MASP.

Várias questões relacionadas às implicações do polimorfismo e padrão de expressão de MASP na infectividade de *T. cruzi* ainda não são compreendidas. Variações na expressão ao longo da infecção associadas à expressão heterogênea de MASP na população de parasitos poderiam configurar um mecanismo de evasão do sistema imune e/ou participar de interações específicas com diferentes células hospedeiras.

Neste contexto, estudos que visam compreender melhor a antigenicidade desta família multigênica, assim como, avaliar se a expressão de diferentes membros antigênicos de MASP na população de parasitos pode contribuir para o estabelecimento de uma infecção mais eficiente no hospedeiro vertebrado, se fazem necessários. Somando-se a isso, analisar como seria o padrão de infectividade *in vivo* de uma população de tripomastigotas enriquecida para uma dada variante de MASP, como também, investigar a influência destas proteínas em mecanismos de invasão de células hospedeiras, são importantes questões a serem compreendidas para um maior entendimento da função biológica de membros da família MASP.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Analisar a variabilidade da expressão e antigenicidade de membros da família MASP de *Trypanosoma cruzi*, assim como investigar o papel de membros da família na infectividade pelo parasito.

#### 3.2. Objetivos específicos

-Avaliar o reconhecimento diferencial dos membros centrais representativos dos subgrupos de MASP acoplados a beads fluorescentes por soro de camundongos infectados com *T. cruzi* coletados ao longo da fase aguda da infecção através de citometria de fluxo;

-Selecionar membros da família MASP por análise de expressão por RNA-seq e predição de antigenicidade para expressão heteróloga e produção de anticorpos policlonais e monoclonais correspondentes;

-Avaliar a expressão dos membros de MASP em tripomastigotas individuais e na população de parasitos usando os anticorpos produzidos através de ensaios de citometria de fluxo e imunofluorescência;

- Enriquecer uma população de *T. cruzi* com um membro específico de MASP e analisar a capacidade de infecção *in vivo* de tripomastigotas selvagens e enriquecidas com um membro específico de MASP;

- Investigar o envolvimento de membros da família MASP na invasão de células hospedeiras por *T. cruzi*;

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Parasitos

#### 4.1.1. Obtenção das formas tripomastigotas de cultura celular

Tripomastigotas do clone CL Brener de *T. cruzi* foram obtidas a partir da infecção de células L6 em meio de cultura RPMI suplementado com 2% de soro fetal bovino, 100µg de estreptomicina/mL e 100 unidades de penicilina/mL, e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Para obtenção dos tripomastigotas de sobrenadante de cultura, cerca de 5 dias após a infecção das células, o meio foi coletado das garrafas de cultivo celular e centrifugado a 600xg por 10min a temperatura ambiente para eliminação das células hospedeiras soltas/debris que ficaram no sedimento da centrifugação. Após no mínimo 2h na estufa, as formas tripomastigotas extracelulares móveis de *T. cruzi* foram coletadas do sobrenadante de cultura.

#### 4.1.2. Preparação do antígeno bruto

O antígeno bruto de tripomastigotas do clone CL Brener de *T. cruzi* foi preparado da seguinte maneira: os parasitos foram lavados uma vez com PBS 1X e ressuspensos para uma concentração final de  $5 \times 10^5$  parasitos/µL em tampão de fracionamento (Hepes-KOH 20mM; KCl 10mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5mM; sacarose 250mM; DTT 1mM; PMSF 0,1mM; coquetel inibidor de protease 1X) e submetidos à lise através de quinze ciclos de congelamento no nitrogênio líquido e de descongelamento a 37°C. A concentração de proteínas foi determinada pelo kit *Pierce BCA Protein Assay* (Thermo Scientific), de acordo com as recomendações do fabricante.

### 4.2. Clusterização hierárquica e representação gráfica multidimensional scaling (MDS) da família multigênica MASP

Devido ao extremo polimorfismo e ao elevado número de membros da família MASP, se faz necessária uma seleção racional destes membros a fim de se avaliar o padrão de antigenicidade e a variabilidade da família. Para tanto, foi realizada a identificação de subgrupos da família MASP e os membros centrais de cada subgrupo foram escolhidos para representar a diversidade da família. A identificação dos subgrupos foi feita através de uma clusterização hierárquica baseada em similaridade de sequências. Nesta análise foram utilizadas 810 sequências proteicas (traduzidas a partir de sequências de genes anotados no genoma do clone CL Brener de *T. cruzi* como MASP, excluindo os pseudogenes e genes parciais, obtidas a partir do banco de dados TriTrypDB (<http://tritrypdb.org>). Para identificar subgrupos (*clusters*) da família MASP, as

sequências proteicas foram alinhadas par-a-par usando o programa ClustalW e a distância entre as sequências foi calculada utilizando o pacote PHYLIP (Felsenstein J 1989, 2005), gerando uma matriz de dissimilaridade. Para gerar uma representação visual desta matriz de distâncias, foi utilizado o *multidimensional scaling plot* (MDS) com duas dimensões (2D), esta técnica é utilizada na exploração visual dos dados com base no número de dimensões a serem exploradas (localização no gráfico e cores, por exemplo) e permite uma visualização global do padrão de diversidade das sequências. Através dela foi possível visualizar os subgrupos (representados pelas cores). O método k-means (Hartigan and Wong 1979) foi usado na definição de 7 subgrupos ou *clusters*: M1 (Black), M2 (Blue), M3 (Green), M4 (Magenta), M5 (Red), M6 (Orange 1) e M7 (Orange 2). No gráfico MDS, cada ponto corresponde a um membro de MASP e a sua localização corresponde à similaridade entre as suas sequências (quanto maior a distância entre dois pontos ou membros, maior a divergência entre os mesmos). A definição da posição central de cada grupo foi realizada computando-se a média dos valores de X e Y para todos os membros do grupo. A distância euclidiana de todos os membros do grupo em relação à posição central foi então determinada e o membro com a menor distância foi selecionado como representante do grupo.

#### **4.3. Imunorranqueamento do proteoma predito do clone CL Brener de *T. cruzi***

As proteínas presentes no proteoma predito de CL Brener foram ranqueadas com base na abundância de epítomos de células B preditos pelo programa BepiPred utilizando a ferramenta IMMUNORANK, desenvolvida pelo nosso grupo (Lobo et al., em preparação). A proporção das proteínas MASP, de cada subgrupo, presentes no top 10, 100 e 1000 do imunorranqueamento foi obtida através de *scripts* em bash.

#### **4.4. Seleção dos genes da família MASP para análise da expressão e estudo da variabilidade antigênica da família**

Genes da família MASP foram selecionados para o estudo usando como critérios: (i) o nível de expressão dos genes da família a partir de análises de RNA-seq do clone CL Brener (Belew et al. 2017); e (ii) análises de predição de epítomos utilizando a ferramenta IMMUNORANK (Lobo et al., em preparação). Os genes, MASP 11- TcCLB.509979.270, MASP 12- TcCLB.509977.30, MASP 13- TcCLB.509977.80 e MASP 14- TcCLB.510037.10, foram selecionados entre os dez genes mais expressos na forma tripomastigota do parasito de acordo com os dados de RNA-seq (Belew et al. 2017). Outros quatro genes, MASP 17 - TcCLB.508541.90, MASP 18 -

TcCLB.506321.120, MASP 19 -TcCLB.506955.99 e MASP 20 -TcCLB.508539.110, foram selecionados utilizando a ferramenta IMMUNORANK, em que as proteínas presentes no proteoma predito de CL Brener foram ranqueadas com base na densidade de epítomos de células B preditos pelo programa BepiPred. Os genes selecionados se encontravam entre os cem mais bem posicionados tanto no ranking gerado pelo IMMUNORANK quanto por aquele gerado a partir do nível de expressão pela análise do transcriptoma.

#### **4.5. Desenho de *primers* para a amplificação dos genes da família MASP**

*Primers* específicos para a amplificação dos genes MASP 11- TcCLB.509979.270, MASP 12- TcCLB.509977.30, MASP 13- TcCLB.509977.80, MASP 14- TcCLB.510037.10, MASP 17 - TcCLB.508541.90, MASP 18 - TcCLB.506321.120, MASP 19 -TcCLB.506955.99 e MASP 20 -TcCLB.508539.110 do clone CL Brener foram desenhados de modo a amplificar apenas a região que codifica a parte madura da proteína que é expressa na superfície do parasito (Tabela 2). Como as regiões 5' e 3' conservadas nos genes de MASP codificam, respectivamente, peptídeo sinal e sítio de adição de âncora de GPI, que são clivados na proteína madura, estas não foram incluídas na região amplificada pelos *primers*. O programa SignalP 4.1 (Petersen et al. 2011) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) foi utilizado para identificar o peptídeo sinal e o programa GPI-SOM (Fankhauser and Mäser 2005) (<http://gpi.unibe.ch/>) para identificar o sítio de adição de âncora GPI. Para facilitar a transferência dos amplicons entre os vetores de clonagem, pGEM-T *Easy* (Promega), e de expressão, pET28a-TEV (CeBiME, Campinas/SP), foram adicionados sítios de restrição às extremidades 5' dos *primers forward* e *reverse*. Além disso, foram acrescentadas 3 bases na região 5' aos sítios de restrição, o que aumenta a eficiência de clivagem da extremidade dos amplicons sem que eles estejam ligados a um vetor (Tabela 1).

**Tabela 1: Primers utilizados para expressão dos genes de MASP selecionados.** O código da proteína recombinante codificada pelo gene, assim como o tamanho do amplicon, a sequência dos primers *forward* e *reverse* na orientação 5'-3', as temperaturas de *melting* (Tm) e as enzimas de restrição adicionadas para cada primer estão descritos na tabela. As sequências em roxo correspondem ao sítio de restrição de *NheI*, as em verde, ao sítio de *HindIII* e em vermelho, ao de *SacI*. As regiões sublinhadas correspondem ao *stop* códon, correspondendo ao fim da tradução da proteína recombinante.

Código da Proteína Recombinante	Amplicon (pb)	Orientação	Sequência do primer	Tm (°C)	Sítio da enzima de restrição
M11	501 pb	Fwd	5'- TTTGCTAGCTGGGATTCAACAAC GATT -3'	60	<i>NheI</i>
		Rev	5'- TTTGAGCTCTCAGTCACTCTCGTC AGGCGTC-3'	60	<i>SacI</i>
M12	642 pb	Fwd	5'- TCTGCTAGCTGGGATTTGGCAGA GAAAAC -3'	60	<i>NheI</i>
		Rev	5'- TTTGAGCTCTCAGTCACTCTCGTC AGGCGTC -3'	60	<i>SacI</i>
M13	411 pb	Fwd	5'- TTTGCTAGCTGGGATTCAACGAC GAATC -3'	60	<i>NheI</i>
		Rev	5'- TTTGAGCTCTCAGTCACTCTCGTC AGGCGTC -3'	60	<i>SacI</i>
M14	390 pb	Fwd	5'- TTTGCTAGCGCGTGGGATTTGGC AGCG -3'	60	<i>NheI</i>
		Rev	5'- TTTGAGCTCTCAGTCACTCTCGTC AGGCGTCC -3'	60	<i>SacI</i>
M17	738pb	Fwd	5'- TTTGCTAGCGGTGGATGTGACGG GGGAGA-3'	60	<i>NheI</i>
		Rev	5'- TTTAAGCTTTCAGTCACTGTCCG AGGCGTCG-3'	60	<i>HindIII</i>
M18	1035 pb	Fwd	5'- TTTGCTAGCGAGGATGTCGATGTT GTTTC-3'	60	<i>NheI</i>
		Rev	5'- TTTAAGCTTTCAGTCACTGTCCG AGATTAG-3'	60	<i>HindIII</i>
M19	666 pb	Fwd	5'- TCTGCTAGCGAACGATCTGAAAC AACTCC-3'	60	<i>NheI</i>
		Rev	5'- TTTAAGCTTTCAGTCACTGTCCG AGGCGTCG-3'	60	<i>HindIII</i>
M20	618 pb	Fwd	5'- TCTGCTAGCGAAACAACCTCTCCG GCTTC-3'	60	<i>NheI</i>
		Rev	5'- TTTAAGCTTTCAGTCACTGTCCG AGTCCGTCG-3'	60	<i>HindIII</i>

## **4.6. Amplificações, clonagens e subclonagens**

### **4.6.1. Extração do DNA genômico de *T. cruzi***

A extração do DNA genômico do clone CL Brener, que foi utilizado como molde para as reações de amplificação dos genes de interesse por PCR, foi realizada utilizando o kit *NucleoSpin Tissue* (Macherey-Nagel), seguindo as orientações do fabricante.

### **4.6.2. Amplificações por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)**

As amplificações por PCR foram realizadas utilizando 100ng de DNA genômico do clone CL Brener, tampão *Green GoTaq Reaction Buffer* (Promega) 1X, 0,2mM de dNTP, 0,5µM de cada *primer* e 1U de *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Life Technologies) em um volume final de 20µL de reação. O programa utilizado para a amplificação consiste em desnaturação inicial a 94°C por 5min, 30 ciclos de 94°C por 30s, temperatura de anelamento de 60°C por 30s e extensão a 68°C por 1min; além de uma extensão final a 68°C por 10min. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0% em tampão TAE 1X, contendo 0,5µg/mL de brometo de etídio, e visualizados em luz UV.

### **4.6.3. Clonagem dos produtos de PCR no vetor pGEM-T Easy e subclonagem no vetor de expressão pET-28a-TEV**

Para clonagem, os produtos obtidos nas reações de amplificação foram submetidos à separação em gel de agarose. As bandas de tamanho esperado foram excisadas dos géis e purificadas utilizando o kit *QIAquick gel Extraction* (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante. Após a purificação, os fragmentos foram ligados ao plasmídeo pGEM-T *Easy* (Promega), através de incubação por 16h a 4°C com a enzima T4 DNA ligase (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, a reação de ligação foi utilizada na transformação de bactérias XL1 Blue eletrocompetentes através de eletroporação.

As subclonagens dos genes de MASP no plasmídeo pET-28a-TEV (CeBiME, Campinas/SP) foram feitas mediante clivagem do vetor pGEM-T *Easy* com enzimas de restrição específicas, seguida de purificação e ligação dos insertos no vetor de expressão. As reações de ligação foram feitas em um volume final de 10µL, empregando-se 1µL de T4 DNA ligase (Promega), 1µL de tampão 10x da ligase (300mM Tris-HCl, pH 7,8; 100mM MgCl<sub>2</sub>; 100mM DTT; 10mM ATP), 100ng do vetor, 500ng do produto purificado e água para completar o volume. As reações foram incubadas a 4°C durante 16h. Após a

incubação, o produto de ligação foi utilizado na transformação por eletroporação de bactérias BL21-Star (Life Technologies).

#### **4.7. Transformação de bactérias competentes por eletroporação e análise dos transformantes**

Cerca de 3µL dos sistemas de ligação foram incubados por 5min no gelo com 50µL de bactérias eletrocompetentes *Escherichia coli* das cepas XL1 Blue (Phoneutria) ou BL21-Star (Life Technologies). Após este período, as amostras foram transferidas para Micro Pulser *Cuvettes* (Bio-Rad) de 0,1 cm e submetidas a um pulso (2,50 kV) em um eletroporador Micro Pulser (Bio-Rad). Após a eletroporação, foram adicionados 300µL do meio de cultura 2xYT líquido (1,6% de bacto-triptona, 1% de extrato de levedura, 0,5% de NaCl, pH 7,4), seguido por incubação durante 1h a 37°C sob agitação a 180 rpm. Após a incubação, as amostras foram plaqueadas em meio sólido 2xYT sólido (1,5% de ágar) contendo ampicilina (100µg/mL) para o vetor pGEM-T *Easy* (Promega) ou kanamicina (50µg/mL) para o vetor pET-28a-TEV (CeBiME, Campinas/SP). As placas foram colocadas em estufa durante 12-16 h para crescimento bacteriano.

Para a análise dos transformantes, foram selecionadas algumas colônias crescidas nas placas e a confirmação da transformação foi feita por PCR, utilizando *primers* M13 (F:5'CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC3';R:5'TCACACAGGAAACAGCTATGAC 3') quando o vetor utilizado foi o pGEM-T *Easy* (Promega) ou T7 (F: 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'; R: 5' GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3'), quando o vetor foi o pET-28a-TEV (CeBiME, Campinas/SP). As colônias que apresentaram a amplificação do produto esperado foram inoculadas em meio 2xYT líquido contendo ampicilina (100µg/mL) ou kanamicina (50µg/mL) e incubadas a 37°C por 16h sob agitação de 180 rpm. Após o crescimento, as bactérias foram aliqüotadas em glicerol 25% e armazenadas a -80°C.

#### **4.8. Sequenciamento dos insertos clonados em pGEM-T *Easy* e pET-28a-TEV**

O sequenciamento dos clones positivos foi realizado pela empresa Macrogen (Seul, Coréia do Sul) em sequenciador automático ABI Prism®3730xl DNA *Analyser* (Applied Biosystems), utilizando os *primers* M13 *forward* e *reverse* para o vetor pGEM-T *Easy* (Promega) e T7 *forward* e *reverse* para o vetor pET-28a-TEV (CeBiME, Campinas/SP). As sequências obtidas foram processadas pelo *software* Sequencher® versão 4.4.1 de análise de sequência de DNA (Gene Codes Corporation), para formação de *contigs*, retirada de sequências de baixa qualidade e sequências do vetor. As sequências

de DNA obtidas foram comparadas com as sequências depositadas nos bancos de dados do TriTrypDB (<http://tritrypdb.org>) e a busca por similaridades foi feita usando o algoritmo BLASTN e BLASTX (Altschul et al. 1990).

#### **4.9. Indução da expressão de proteínas recombinantes em *E. coli***

Colônias isoladas de BL21-Star, contendo o plasmídeo pET-28a-TEV com os fragmentos dos genes de MASPs foram inoculadas em 3 ou 100mL de meio 2xYT líquido contendo kanamicina (50µg/mL) e incubadas por 3 h sob a agitação de 180 rpm. Após este período, os inóculos foram diluídos 1:20 em 10 ou 2000mL de meio 2xYT com kanamicina (50µg/mL) e incubados a 37°C a 180rpm. Ao atingir a densidade ótica (OD600) de 0,6, alíquotas de 1mL foram coletadas antes de iniciar a indução (0h) e, no restante da cultura, foram adicionados IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) (Life Technologies), na concentração final de 1mM, para induzir a expressão das proteínas recombinantes. Após incubação a 37°C por 3h sob agitação, as culturas foram centrifugadas a 6000xg por 15min a 4°C e armazenada a -80°C.

#### **4.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)**

As amostras obtidas nas expressões e purificações foram submetidas à separação por eletroforese em gel de poliacrilamida utilizando bis-acrilamida 40%. O gel de separação 12,5% foi preparado utilizando Tris-HCl 1,5M pH 8,8 e SDS 0,4%; persulfato de amônio 0,5% (v/v) e TEMED 0,05% (v/v). O gel de concentração foi preparado de modo semelhante ao de separação, mas utilizando o tampão Tris-HCl 0,5M pH 6,8.

Às amostras obtidas da indução foi adicionado o tampão de amostra (SDS 10%; Tris-HCl 0,5M pH 6,8; azul de Bromofenol 0,05%; β-mercaptoetanol 5%; glicerol 10%), fervidas durante 5min para desnaturação das proteínas e aplicadas no gel para separação eletroforética. A eletroforese foi realizada em tampão de corrida Tris-HCl 25mM; glicina 192mM; SDS 0,1% e pH 8,3; à voltagem constante de 150 V. Após a corrida, os géis foram corados por incubação por 2-16h com a solução de Coomassie Blue (Coomassie Brilliant Blue G-250 0,1%; metanol 50%; ácido acético 10%), e então, descorados em solução contendo 30% de metanol e 10% de ácido acético.

#### **4.11. Lise das bactérias e purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade**

As bactérias crescidas em 2L de cultura, utilizadas para a purificação das proteínas, foram ressuspensas em 200mL PBS 1X com 30mM de imidazol com 2mL de lisozima (10mg/mL) e incubadas por 30min no gelo. As bactérias foram lisadas



utilizando o homogeneizador EmulsiFlex-C (Avestin, Inc.), que promove a lise através de vários ciclos aplicando pressão mecânica sobre a solução contendo as bactérias expressando as proteínas recombinantes.

A purificação das proteínas recombinantes foi realizada por cromatografia de afinidade em colunas HisTrap HP 5mL (GE Healthcare Life Sciences), no sistema ÄKTAprimeplus (GE Healthcare Life Sciences). As colunas utilizadas possuem em seu interior uma matriz de níquel-sefarose, que consiste em esferas de agarose contendo em sua superfície íons  $\text{Ni}^{+2}$  imobilizados. As proteínas recombinantes contêm na região N-terminal uma cauda de histidina, que possui uma grande afinidade pelo íon  $\text{Ni}^{+2}$ , ficando retidas na coluna por afinidade, ao passo que as demais proteínas passam direto pela coluna sem ficarem retidas.

Os extratos proteicos provenientes do lisado bacteriano contendo as proteínas recombinantes foram aplicados na coluna HisTrap HP de 5mL (GE Healthcare Life Sciences) para a purificação das proteínas recombinantes contendo cauda de histidina. Para a remoção de proteínas da bactéria, a coluna foi lavada com 10 volumes do tampão contendo PBS 1X com 30mM de imidazol. Já a eluição das proteínas recombinantes foi realizada utilizando um gradiente de concentração do tampão contendo PBS 1X com 500 mM de imidazol, partindo de 0% de concentração e atingindo 100% de concentração em 20mL de corrida. A eluição é possível devido à competição do imidazol com a cauda de histidina pela ligação aos íons de níquel presentes na coluna permitindo assim que a proteína recombinante seja liberada da coluna.

#### **4.12. Produção de proteínas recombinantes MASP correspondentes aos membros centrais de cada subgrupo da família**

A expressão e purificação das proteínas MASP correspondentes aos membros centrais de cada um dos 7 subgrupos de MASP: Black (M1), Blue (M2), Green (M3), Magenta (M4), Red (M5), Orange 1 (M6) e Orange 2 (M7), que também foram utilizadas neste trabalho, foram realizadas pela estudante do laboratório, Laila Viana, seguindo o mesmo protocolo utilizado na expressão das proteínas M9, M12, M13, M14, M18, M19 e M20, descrito acima.

#### **4.13. Soros utilizados**

Para a obtenção dos soros dos camundongos, o sangue coletado foi mantido em repouso por 30min a temperatura ambiente para ocorrer a coagulação e depois centrifugado a 5000xg por 15min. Os soros coletados foram armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.13.1. Soros de camundongos controles**

Dez camundongos machos C57BL/6 e BALB/c com 6-8 semanas de idade não infectados com *T. cruzi* foram utilizados como grupo controle.

#### **4.13.2. Geração de anticorpos policlonais a partir de camundongos BALB/c imunizados com proteínas recombinantes de MASP**

Cinco camundongos BALB/c machos com 6-8 semanas de idade foram imunizados com cada uma das proteínas purificadas recombinantes de MASP. A imunização foi feita em três etapas com um intervalo de 15 dias entre elas. Em cada passo, usou-se 25µg da proteína recombinante purificada solúvel em PBS 1X. Na primeira imunização foram utilizados 250µL de adjuvante completo de Freund (Sigma) mais 250µL da solução contendo a proteína recombinante. Na segunda e terceira imunização, foram utilizados 250µL de adjuvante Freund incompleto mais 250µL da solução contendo a proteína recombinante. O sangue de animais imunizados foi coletado 15 dias após a terceira imunização para obtenção do soro.

#### **4.13.3. Soros de camundongos infectados com *T. cruzi* (CL Brener) de fase aguda**

Seis camundongos C57BL/6 machos com 6-8 semanas de idade foram infectados com 80 tripomastigotas/inóculo do clone CL Brener de *T. cruzi*. Os camundongos tiveram soros coletados durante a fase aguda, com 5, 10, 15, 20,25 e 30 dias após infecção e a reatividade dos soros contra as proteínas recombinantes e extratos proteicos do parasito foram avaliados individualmente por ELISA.

#### **4.13.4. Soros de camundongos infectados com *T. cruzi* (CL Brener) de fase crônica**

Vinte camundongos C57BL/6 machos, com 6 semanas de vida, foram infectados intraperitonealmente com 100 parasitos/inóculo do clone CL Brener de *T. cruzi*. Para obter soros que representassem a fase crônica, camundongos infectados com CL Brener tiveram o soro coletado após 4 meses de infecção.

#### **4.14. ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)**

Os ensaios de ELISA foram realizados utilizando as proteínas MASP recombinantes purificadas e antígeno bruto do clone CL Brener de *T. cruzi*. Placas de ELISA (Thermo Fisher Scientific) foram sensibilizadas por 12-16h a 4°C com 0,5µg de MASP ou 2 µg de antígeno bruto diluídos em 100µL de tampão carbonato (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,16%, NaHCO<sub>3</sub> 0,24% e pH 9,6) por poço. Após a sensibilização, a placa foi bloqueada

com 200µL de PBS 1X com 5%BSA durante 1h a 37°C. Depois do bloqueio, a solução contida nos poços foi aspirada e em seguida foram adicionados 100µL do anticorpo primário, policlonal contra as proteínas de MASP gerados em camundongo, diluídos 1:500 em PBS 1X com 2,5%BSA, ou pool de soro de animais infectados de fase aguda ou crônica diluídos 1:100 na mesma solução, e as placas incubadas a 37°C por 1h. Após este tempo, as placas foram lavadas 4 vezes com PBS 1X com 0,05% Tween20 e posteriormente incubadas com 100µL do anticorpo secundário anti-IgG conjugado com peroxidase (Sigma), diluído 1:5000 em PBS 1X com 2,5% BSA. Após a incubação a 37°C por 1h, as placas foram novamente lavadas 4 vezes com PBS 1X com 0,05% Tween20 e por fim foi adicionado 100µL da solução reveladora (ácido cítrico 0,1 M, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 M, OPD 0,05% e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,1%). As placas foram incubadas a 37°C ao abrigo de luz por 15min com a solução reveladora, quando a reação foi interrompida pela adição de 100µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M. A absorbância resultante foi lida em leitor de ELISA a 490nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

#### **4.15. Acoplamento das proteínas recombinantes M1 a M7 a microesferas fluorescentes**

##### **4.15.1. Preparação das microesferas fluorescentes**

As microesferas fluorescentes BD CBA Functional Bead: A4 (BD Bioscience- Cat. No.558578), A6 (BD Bioscience- Cat.No560032)., C5 (BD Bioscience- Cat. No.558648), C6 (BD Bioscience- Cat. No.558582), C7 (BD Bioscience- Cat. No.558587), E4 (BD Bioscience- Cat. No. 558584) e E7 (BD Bioscience- Cat. No. 560039), selecionadas para o acoplamento foram sonicadas por 1min a 40 Hertz em um banho ultrassônico e em seguida levadas ao vortex por 30s. Transferiu-se 75µL da solução para um microtubo de 1,5mL protegido da luz, onde foi adicionado 1,9µL DTT (Ditiotreitol 1M) (Pierce). Em seguida a amostra foi incubada em um agitador orbital por 1h a temperatura ambiente. No final da incubação, 1,0mL de tampão *Coupling Buffer* (BD Bioscience) foi adicionado, o tubo levado ao vortex por 5s e centrifugado 900xg por 3min. Depois o sobrenadante foi descartado e as microesferas fluorescentes lavadas três vezes com *Wash Buffer* (BD Bioscience) e o *pellet* ressuspensionado em 20µL do *Coupling Buffer* (BD Bioscience).

##### **4.15.2. Preparação das proteínas recombinantes**

Em um microtubo de 1,5ml foram adicionados 90µL da proteína recombinante purificada solúvel em PBS 1X na concentração de 1mg/ml e 2µL de uma solução aquosa

de Sulfo-SMCC (Sulfosuccinimidil 4-N-maleimidometil ciclohexano 1-carboxilato 2mg/ml) (Pierce), preparada imediatamente antes do uso. A mistura foi incubada em um agitador orbital por 1h a temperatura ambiente protegida da luz.

#### **4.15.3. Acoplamento da proteína com as microesferas fluorescentes**

Toda a solução contendo a proteína foi transferida para o microtubo contendo as microesferas fluorescentes preparadas como descrito acima e este foi levado ao vortex por 5s. Em seguida o tubo foi incubado em um agitador orbital por 1h a temperatura ambiente e protegido da luz. Após o período de incubação, foram adicionados 2µL de NEM (N-Etilmaleimide) (Pierce) 2mg/ml em DMSO ao tubo que foi levado novamente ao vortex por 5s e incubado em um agitador orbital por 15min a temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 1mL *Coupling Buffer* (BD Bioscience) e o microtubo centrifugado 900xg por 3min. O sobrenadante foi descartado e a lavagem com o *Coupling Buffer* (BD Bioscience) foi repetida três vezes. As microesferas foram ressuspensas em 500µL de tampão *Storage Buffer* (BD Bioscience) na concentração final de aproximadamente  $6 \times 10^6$  microesferas/mL, seguido de incubação por 18 horas a 4°C.

#### **4.16. Citometria de fluxo com as microesferas fluorescentes acopladas às proteínas recombinantes de MASP**

Os ensaios de citometria de fluxo foram realizados utilizando as microesferas fluorescentes acopladas às proteínas recombinantes de MASP M1 a M7. Esses ensaios foram realizados de duas maneiras: na forma uniplex, cada proteína acoplada à uma microesfera diferente foi incubada individualmente com o soro; e na forma multiplex, na qual as sete proteínas acopladas a microesferas com diferentes fluorescências foram incubadas ao mesmo tempo com as amostras de soro. Em ambos, as microesferas acopladas foram bloqueadas usando 150µL de PBS com Tween 0,125% e BSA a 3% durante 1h a temperatura ambiente em placas de poliestireno com fundo em U (Falcon). Os soros de camundongos utilizados foram diluídos 1:100 em PBS Wash (0,5% de BSA e 0,1% de azida de sódio) e incubados durante 2h a temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas com 200µL de PBS Wash e incubadas durante 2h a temperatura ambiente com anticorpo secundário anti-IgM de camundongo (BD Bioscience) conjugado com biotina na diluição de 1:800 em PBS Wash, quando foram utilizados os soros de camundongos infectados com *T. cruzi*, ou anti-IgG de camundongo (Sigma) conjugado com biotina na diluição de 1:2000 em PBS Wash, quando utilizados os anticorpos policlonais gerados contra as proteínas recombinantes de MASP. Ao anticorpo

secundário foi adicionado 20µL do conjugado de Streptavidina R-Ficoeritrina (SAPE) (Sigma) na diluição de 1:400 no mesmo tampão. Após este período, as amostras foram homogeneizadas com 150µl de PBS Wash e centrifugadas a 400xg durante 10 min a 18°C. As microesferas foram analisadas por citometria de fluxo no equipamento FACS Verse (BD Bioscience) e usando o software FlowJo (Tree Stars). Os controles internos da reação foram incluídos nos experimentos para monitorar a ligação não específica. Para tanto, as microesferas foram incubadas na ausência dos soros primários, mas na presença dos anticorpos secundários conjugados com biotina e SAPE. Os valores de cutoff foram obtidos a partir da curva ROC.

#### **4.17. Anticorpos monoclonais anti-MASP**

Anticorpos monoclonais (mAb) anti-MASP 2, 14 e 18, selecionados pelo perfil de expressão e antigenicidade, foram gerados em colaboração com o laboratório do Prof. Dr. Miguel Navarro do Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra (Granada, Espanha), como previamente descrito (Bart et al. 2015; Cordon-Obras et al. 2013; Landeira et al. 2009). Resumidamente, camundongos BALB/c foram imunizados em três etapas utilizando 50µg de MASP purificada e esplenócitos normais produtores de anticorpos foram fundidos com células de mieloma imortalizadas. Os hibridomas produtores de anticorpos desejados foram identificados por ELISA, Western Blot e IFA.

#### **4.18. Immunoblot com mAb anti-MASP**

Utilizando o equipamento ResPep RS (Intavis) para promover a síntese química de peptídeos sobre uma membrana porosa de celulose, foram sintetizadas membranas contendo os peptídeos que compõe as proteínas M2, M14 e M18. Para as membranas M2 e M18 foi utilizada uma janela deslizante de 3 aminoácidos na síntese e para a membrana da M14 a janela deslizante foi apenas de 1 aminoácido. Para a realização do immunoblot, as membranas foram incubadas *overnight* em solução de bloqueio, PBS 1X contendo 5% de BSA e 4% de sacarose. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas três vezes com solução de lavagem (PBS 1X com 0,1% de Tween20) por 10 min. Em seguida, incubadas com o mAb anti-MASP, diluído 1:1000 em solução de lavagem, durante 2h. Posteriormente, foram realizadas três lavagens com solução de lavagem por 10min, seguido de incubação com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma), na diluição de 1:5000 em solução de lavagem, durante 1h. As membranas foram então lavadas mais três vezes por 10min com solução de lavagem e revelada por quimiluminescência por ECL (ECL Plus Western Blotting Detection System

- GE-Healthcare). Para regeneração das membranas, estas foram lavadas três vezes com N,N-dimetilformamida (DMF) por 10 min. e incubadas por 12-16 h com a solução desnaturante (uréia 8 M e SDS 1, %). Após a incubação, as membranas foram lavadas mais duas vezes com a solução desnaturante por 30 min. Para retirada do excesso de solução desnaturante, as membranas foram lavadas com água deionizada por 2 min, e logo após lavadas três vezes com a solução ácida (55% de etanol, 35% de água deionizada e 10% de ácido acético) por 10 min. Para finalizar, as membranas foram lavadas com água deionizada por 2 min, seguida de duas lavagens com etanol para retirar a umidade por 5 min. Após secar completamente a temperatura ambiente, as membranas foram armazenadas a 4 °C.

#### **4.19. Purificação dos anticorpos monoclonais de sobrenadante de cultura**

Para a purificação de IgG, correspondente aos mAbs gerados contra as proteínas MASP, foi utilizada a coluna *Protein G sepharose 4 fast flow* (GE Healthcare Life Sciences). A coluna foi equilibrada com 40mL de tampão fosfato pH=7 (20mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), em seguida foi aplicado o sobrenadante de cultura contendo o mAb, e realizada uma lavagem com 25mL de tampão fosfato acrescido de NaCl 0,5M. Para eluição foi utilizado 1,2mL de tampão citrato pH=2,7 (50mM de ácido cítrico) e as amostras de aproximadamente 200µL coletadas em tubos contendo 37µL de tampão borato pH=10 (1M de ácido bórico) para neutralização do pH. A dosagem de IgG purificadas foi realizada utilizando NanoDrop 2000c *Spectrophotometer* (Thermo Scientific).

#### **4.20. Marcação de anticorpos monoclonais**

Os mAbs purificados gerados contra as proteínas MASP foram marcados com o fluoróforo Alexa Fluor 488 utilizando o kit Alexa Fluor 488 *Protein Labeling* (Thermo Scientific) ou Alexa Fluor 647 utilizando o kit Alexa Fluor 647 *Antibody Labeling* (Thermo Scientific). As marcações foram feitas seguindo as instruções do fabricante e foi utilizado aproximadamente 200µg de IgG purificada de cada mAb por marcação.

#### **4.21. Imunofluorescência das formas tripomastigotas de *T. cruzi***

##### **4.21.1. Marcação das formas tripomastigotas com anticorpos policlonais anti-MASP:**

Formas tripomastigotas de cultura do clone CL Brener de *T. cruzi* foram centrifugadas a 2000xg por 10min a 4°C, lavadas uma vez com tampão PBS 1X e ressuspendidas em PBS 1X com 2% de paraformaldeído. Os parasitos foram depositados

em lâminas de vidro e, após incubação por 1 h a 4°C para fixação foram incubados por 15min em PBS 1X com 50mM de NH<sub>4</sub>Cl e, em seguida, lavados duas vezes com PBS 1X. As células fixadas foram bloqueadas com 5% de soro fetal bovino em PBS1X por 1h a temperatura ambiente. E a marcação das proteínas MASP foi feita pela adição às lâminas do anticorpo primário policlonal, gerados em camundongo, diluído 1:500 em PBS 1X com 5% de soro fetal bovino, seguido de incubação por 16h a 4°C. Após três lavagens com PBS 1X, o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa Fluor 488 (Life Technologies), diluído 1:1000, foi incubado por 1h a temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas e o núcleo e o cinetoplasto dos parasitos foram corados com 1µg/mL de DAPI (Life Technologies) por 5min a temperatura ambiente. Após cinco lavagens com PBS 1X, as lâminas foram montadas com o reagente ProLong Gold (Life Technologies) e cobertas por uma lamínula. As imagens foram obtidas com Microscópio Óptico de Fluorescência – Axio Imager Z2-ApoTome 2 Zeiss, Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais (CM-UFMG), no Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN).

#### **4.21.2. Marcação das formas tripomastigotas com mAbs anti-MASP purificados:**

Formas tripomastigotas de cultura do clone CL Brener de *T. cruzi* foram centrifugadas a 2.000xg por 10min a 4°C, lavadas uma vez com tampão PBS 1X e ressuspendidas em PBS 1X com 2% de paraformaldeído. Os parasitos foram depositados em lâminas de vidro e, após incubação por 1h a 4°C para fixação, foram incubados por 15min em PBS 1X com 50mM de NH<sub>4</sub>Cl e, em seguida, lavados duas vezes com PBS 1X. As células fixadas foram bloqueadas com 3% de BSA em PBS1X por 1h a temperatura ambiente. Em seguida, a marcação das proteínas MASP foi feita pela adição às lâminas do mAb purificado anti-MASP diluído 1:5 em solução de bloqueio, seguido de incubação por 2h a temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS 1X, o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa Fluor 488 (Life Technologies), diluído 1:500, foi incubado por 1h a temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas e o núcleo e o cinetoplasto dos parasitos foram corados com 1µg/mL de DAPI (Life Technologies) por 5min a temperatura ambiente. Após cinco lavagens com PBS 1X, as lâminas foram montadas com o reagente ProLong Gold (Life Technologies) e cobertas por uma lamínula. As imagens foram obtidas com Microscópio Óptico de Fluorescência – Olympus (BX-61), pertencente ao Prof. Dr. Sergio Schenkman da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

## **4.22. Citometria de fluxo das formas tripomastigotas de *T. cruzi***

### **4.22.1. Marcação das formas tripomastigotas com anticorpos policlonais anti-MASP:**

Formas tripomastigotas de cultura do clone CL Brener de *T. cruzi* foram centrifugadas a 2000xg por 10min a 4°C, lavadas com PBS 1X e ressuspendidas em PBS 1X com 2% de paraformaldeído. Em seguida, os parasitos foram lavados 2 vezes com PBS 1X e bloqueados com 5% de soro fetal bovino em PBS 1X por 30min a temperatura ambiente. Após esta etapa, foram incubados com o anticorpo policlonal de MASP diluído 1:1000 em PBS com 5% de soro fetal bovino por 30min a temperatura ambiente, lavados com PBS 1X e incubados por 30min a temperatura ambiente com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa Fluor 488 (Life Technologies) diluído 1:1000 na solução de bloqueio. Em seguida, as células foram lavadas em PBS 1X e ressuspendidas em 150µL de PBS 1X para serem analisadas por citometria de fluxo no equipamento FACS Fortessa (BD Biosciences) utilizando o software FACSDiva (BD Biosciences). Posteriormente à aquisição dos dados, a análise foi realizada através do software FlowJo (Tree Stars). O experimento foi realizado em duplicata e para cada amostra foram adquiridos dados referentes a cinquenta mil eventos para realização da análise quantitativa.

### **4.22.2. Marcação das formas tripomastigotas com mAbs anti-MASP conjugados a fluoróforos:**

Formas tripomastigotas de cultura do clone CL Brener de *T. cruzi* foram centrifugadas a 2.000xg por 10min a 4°C, lavadas uma vez com meio RPMI e ressuspendidas em RPMI com 2% de soro fetal bovino na concentração final de  $5 \times 10^7$  parasitos/mL. Em seguida, foram incubados com os mAbs anti- MASP conjugado com Alexa Fluor 488 ou 647 diluído 1:100 em RPMI com 2% de soro fetal bovino. Após incubação por 30min no gelo, as células foram lavadas uma vez com RPMI gelado e ressuspendidas em RPMI com 2% de soro fetal bovino na concentração final de  $2 \times 10^7$  parasitos/mL. As análises foram feitas por citometria de fluxo no equipamento BD Accuri C6 (BD Biosciences) e utilizando o software FlowJo (Tree Stars). Para cada amostra foram adquiridos dados referentes a cinquenta mil eventos para realização da análise quantitativa.

## **4.23. Enriquecimento de parasitos reconhecidos pelos mAbs anti-MASP**

Aproximadamente  $1 \times 10^8$  formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram centrifugadas a 2000xg por 10min a 4°C, lavadas uma vez com meio RPMI e ressuspendidas em RPMI



com 2% de soro fetal bovino na concentração final de  $5 \times 10^7$  parasitos/mL. Em seguida, foram incubados com o mAb anti-MASP conjugado com Alexa Fluor 488 diluído 1:100 em RPMI com 2% de soro fetal bovino. Após incubação por 30min no gelo, as células foram lavadas uma vez com RPMI gelado e ressuspendidas em RPMI com 2% de soro fetal bovino na concentração final  $2 \times 10^7$  parasitos/mL. A aquisição de células marcadas com mAb anti-MASP para obtenção de uma população enriquecida expressando um membro específico foi realizada através do citômetro de fluxo FACS Aria (BD Biosciences) utilizando o software FACS Diva (BD Biosciences). Os experimentos de *sorting* foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Sergio Schenkman da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Os parasitos obtidos após o enriquecimento foram analisados por citometria de fluxo para obter a porcentagem de células expressando o membro de MASP selecionado e posteriormente utilizados em ensaios de infecção experimental de animais.

#### **4.24. Infecção experimental de camundongos com *T. cruzi***

Para os experimentos de infecção *in vivo* foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, os quais foram infectados por via intraperitoneal com 500 tripomastigotas. Três grupos de animais foram infectados, cada um com uma população distinta de tripomastigotas: (i) derivada de cultura do clone CL Brener WT (*wild type*); (ii) enriquecida com uma dada variante de MASP a partir do *sorting*; (iii) população não selecionada no *sorting* FT (*flow through*). A parasitemia dos animais foi avaliada a cada 2 dias ao longo de 40 dias. A partir do sangue da veia da cauda dos animais, foram coletados 5 $\mu$ L de sangue depositados em uma lâmina coberta por lamínula. A parasitemia foi determinada pela contagem de tripomastigotas sanguíneas presentes em 50 campos de cada lâmina observada em microscópio óptico.

#### **4.25. Ensaio de ligação de proteínas MASP a células L6**

As células L6 ( $5 \times 10^4$ ) colocadas em placas de cultura de 96 poços foram cultivadas por 24h em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, a solução contida nos poços foi aspirada, as células tratadas com 100 $\mu$ L das proteínas purificadas recombinantes de MASP na concentração de 20 $\mu$ g/mL em meio RPMI com 2% de soro fetal bovino. Como controle foi feita também a incubação das células apenas com 100 $\mu$ L de meio RPMI 2%SFB. Após 1h, as células foram fixadas com PFA 4% por 30min a temperatura ambiente, lavadas 2 vezes com PBS 1X e bloqueadas com 200 $\mu$ L de PBS 1X com 5% BSA durante 1h. Depois do bloqueio, a placa foi incubada com os

respectivos anticorpos policlonais contra as proteínas MASP utilizadas, tanto nos poços em que as células foram tratadas com as proteínas quanto nos controles, diluídos 1:500 em PBS 1X com 2,5% BSA por 1h. Após este tempo, as placas foram lavadas 4 vezes com PBS 1X com 0,05% Tween20 e posteriormente incubadas com 100µL do anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma) diluído 1:2000 em PBS 1X com 2,5% BSA. Após a incubação por 1h, as placas foram novamente lavadas 4 vezes com PBS 1X com 0,05% Tween20 e por fim foi adicionado 100 µL da solução reveladora contendo ácido cítrico 0,1M, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 M, OPD 0,05% e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,1%. As placas foram incubadas a 37°C ao abrigo de luz por 15min com a solução reveladora quando a reação foi interrompida pela adição de 30µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M. A absorbância resultante foi lida em leitor de ELISA a 490nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

#### **4.26. Ensaio de invasão celular pelo *T. cruzi***

Para os ensaios de invasão utilizando formas tripomastigotas do clone CL Brener de *T. cruzi*, 1x10<sup>5</sup> células L6 foram cultivadas em placas de 24 poços por 24h, contendo lamínulas de vidro redondas de 13 mm. Em seguida foram adicionados 500µL de um pool de proteínas MASP recombinantes purificadas na concentração de 40µg/mL ou 20µg/mL ou 20µg/mL das proteínas individuais de MASP diluídas em meio de cultura RPMI suplementado com 2% de soro fetal bovino. Como controle, foi feita também a incubação apenas com meio de cultura RPMI suplementado com 2% de soro fetal bovino. Após 1h, as células foram lavadas com RPMI, e a exposição aos parasitos foi realizada com uma MOI de 40 parasitos por célula por 1h à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com RPMI para a retirada dos parasitos não internalizados e fixadas com PFA 4% por 30min a temperatura ambiente.

Para a marcação com anticorpos, as lamínulas foram lavadas por 3 vezes com PBS 1X, em seguida incubadas durante 20min em PBS 1X com BSA 2%. Para a identificação dos parasitos extracelulares remanescentes, as lamínulas foram incubadas por 50min com anticorpo primário anti-*T. cruzi* (soro de camundongo infectado com tripomastigotas de *T. cruzi* coletado na fase crônica da infecção), como descrito previamente (Andrews et al. 1987), diluído 1:500 em PBS 1X com BSA 2%. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas 4 vezes com PBS 1X com BSA 2% e incubadas por 40min com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa Fluor 488 (Life Technologies) diluído 1:1000 em PBS com BSA 2%. Em seguida, as lamínulas foram lavadas 3 vezes

com PBS com BSA 2% e mais 3 vezes com PBS 1X. O DNA da célula hospedeira e do parasito foram marcados por incubação com DAPI diluído 1:1000 em PBS 1X durante 1 min e então as lamínulas foram lavadas cinco vezes com PBS 1X para a montagem sobre lâmina para microscopia com o reagente ProLong Gold (Life Technologies). As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência onde foram contados aproximadamente 18 campos por lamínula, garantindo a contagem de um número mínimo de 250 células. A quantificação das células infectadas e de parasitos intracelulares ocorreu através da contagem de parasitos marcados com DAPI, mas que não estavam marcados em sua superfície de verde com o anti-IgG conjugado a Alexa Fluor 488. Os parasitos marcados com ambos, DAPI e anti-IgG conjugado a Alexa Fluor 488, foram contabilizados como parasitos extracelulares. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

#### **4.27. Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas no software Prism 7.0 e Microsoft Excel. Para cada triplicata de experimentos de ELISA foram calculadas as médias e desvio padrão. Antes dos testes de comparação entre grupos experimentais e controle, foi utilizado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk para identificar se a distribuição dos dados é gaussiana ou não. Caso a distribuição seja gaussiana, a comparação entre dois grupos experimentais foi feita usando o teste T de Student não-pareado, enquanto que ANOVA foi utilizado para comparações de mais de dois grupos experimentais. Valores  $p < 0,05$  foram considerados como diferenças estatisticamente significativas. Os valores de corte dos experimentos de citometria de fluxo foram gerados pelas curvas de características de operação do receptor (ROC) que foram construídas ao traçar a sensibilidade no eixo y e o complemento de especificidade (especificidade 100) no eixo x. A curva ROC foi utilizada para selecionar o valor de corte para determinar porcentagens de esferas acopladas fluorescentes positivas.

## **5. CAPÍTULO 01:**

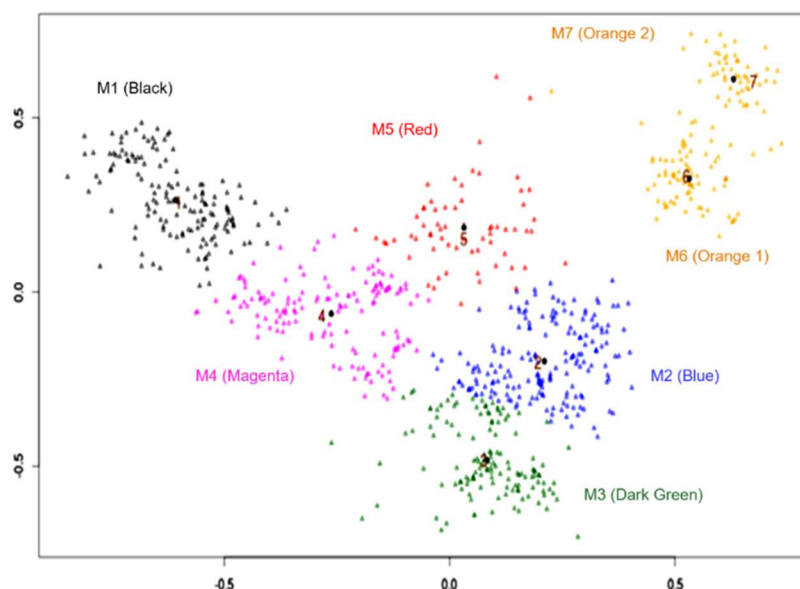
### **Análise da antigenicidade da família multigênica MASP e avaliação da reatividade de membros de diferentes subgrupos através de citometria de fluxo**

A grande diversidade da família MASP e suas características antigênicas podem ter implicações importantes para a sobrevivência de *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado. Devido ao grande número de membros de MASP, para investigar o padrão de antigenicidade da família se faz necessária uma seleção racional dos membros a serem avaliados. Neste capítulo, usando metodologias computacionais de agrupamento hierárquico baseado em similaridade de sequência proteica, selecionamos sete membros de MASP como representantes da diversidade da família, os quais foram submetidos a análises de antigenicidade.

## 5.1. Resultados

### 5.1.1. Seleção de membros da família MASP baseado no padrão de diversidade das suas sequências proteicas

Para identificarmos subgrupos dentro da família MASP, foi feito o alinhamento par-a-par de todas as 810 proteínas preditas como completas após eliminação de sequências parciais e pseudogenes. A matriz de distância obtida foi usada para gerar um gráfico de dimensionamento multidimensional (MDS) (Figura 5). O algoritmo k-means foi selecionado para gerar 7 *clusters* dentro da família MASP, denominados M1 a M7. Como a família MASP é extremamente polimórfica e tem um grande número de membros, foi escolhido um membro próximo ao centro de cada subgrupo para ser expresso de forma recombinante em *Escherichia coli* seguido da avaliação do perfil antigênico destes membros em diferentes tempos da infecção por *T. cruzi*.

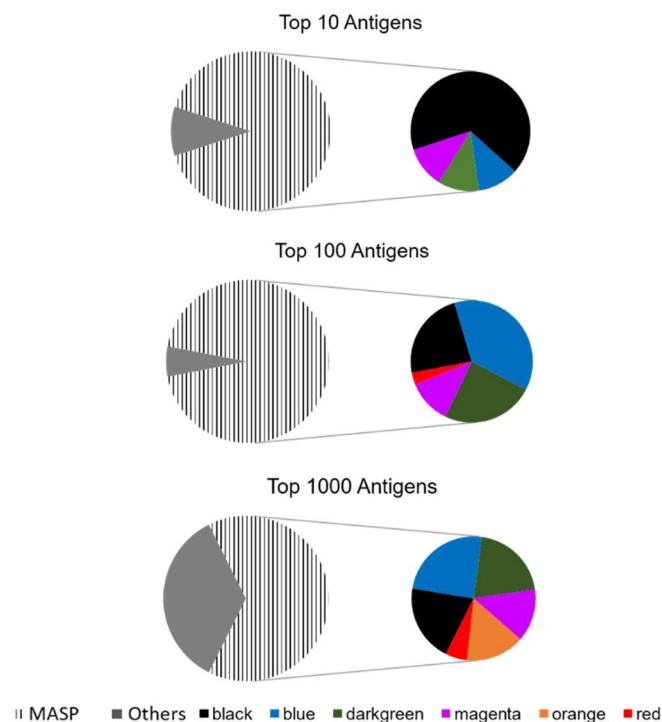


**Figura 5: Gráfico multidimensional scaling (MDS) das sequências proteicas de MASP.** O alinhamento par-a-par das sequências de proteínas MASP foi realizado e a matriz de distância foi usada para gerar a projeção MDS. O método K-means foi usado para definir os sete subgrupos de MASP. Cada subgrupo é representado por uma cor (Black, Blue, Dark Green, Magenta, Red, Orange 1 e Orange 2). O centro de cada grupo está indicado por um círculo preto e os membros de MASPs selecionados para expressão heteróloga estão indicados pelos números de 1 a 7.

### 5.1.2. O imunorranqueamento do proteoma CL Brener sugere que os membros de MASP são altamente antigênicos

O proteoma predito total de *T. cruzi* CL Brener foi submetido a predição de epítomos de células B utilizando a ferramenta IMMUNORANK desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa (Lobo et al., em preparação). Esta ferramenta combina o resultado de

diferentes preditores que avaliam várias características das sequências primárias das proteínas, tais como: hidrofobicidade, entropia, desordem estrutural, domínios proteicos extracelulares, dentre outros, e ranqueia as proteínas analisadas através de um índice de antigenicidade. Desta forma é possível comparar a antigenicidade predita das diferentes proteínas analisadas, permitindo priorizar as sequências mais antigênicas para estudos funcionais. O imunorranqueamento de todo o proteoma de CL Brener demonstrou que as proteínas MASP estão extremamente bem classificadas (Figura 6). É possível observar que entre os 10 antígenos preditos de CL Brener com as melhores posições no rank (top 10), MASP representa 90%, sendo a maioria do subgrupo M1 - Black. Ampliando para os top 100 antígenos preditos, ainda é possível ver o predomínio de MASP que representa 94% dos antígenos, entretanto, é possível observar o aumento de membros do subgrupo M2 - Blue, que assim continua até o top 1000. É interessante observar que na análise dos 1000 antígenos preditos mais bem ranqueados, as MASPs constituem mais da metade dos antígenos, representando 64,8%.



**Figura 6: Proporção de subgrupos MASP no imunorranqueamento com base na predição de epítomos de células B.** À esquerda, a área hachurada representa a proporção de MASP entre os antígenos preditos como mais antigênicos de acordo com o IMMUNORANK. No lado direito, estas MASP foram divididas nos subgrupos M1 a M7 representados pelas cores.

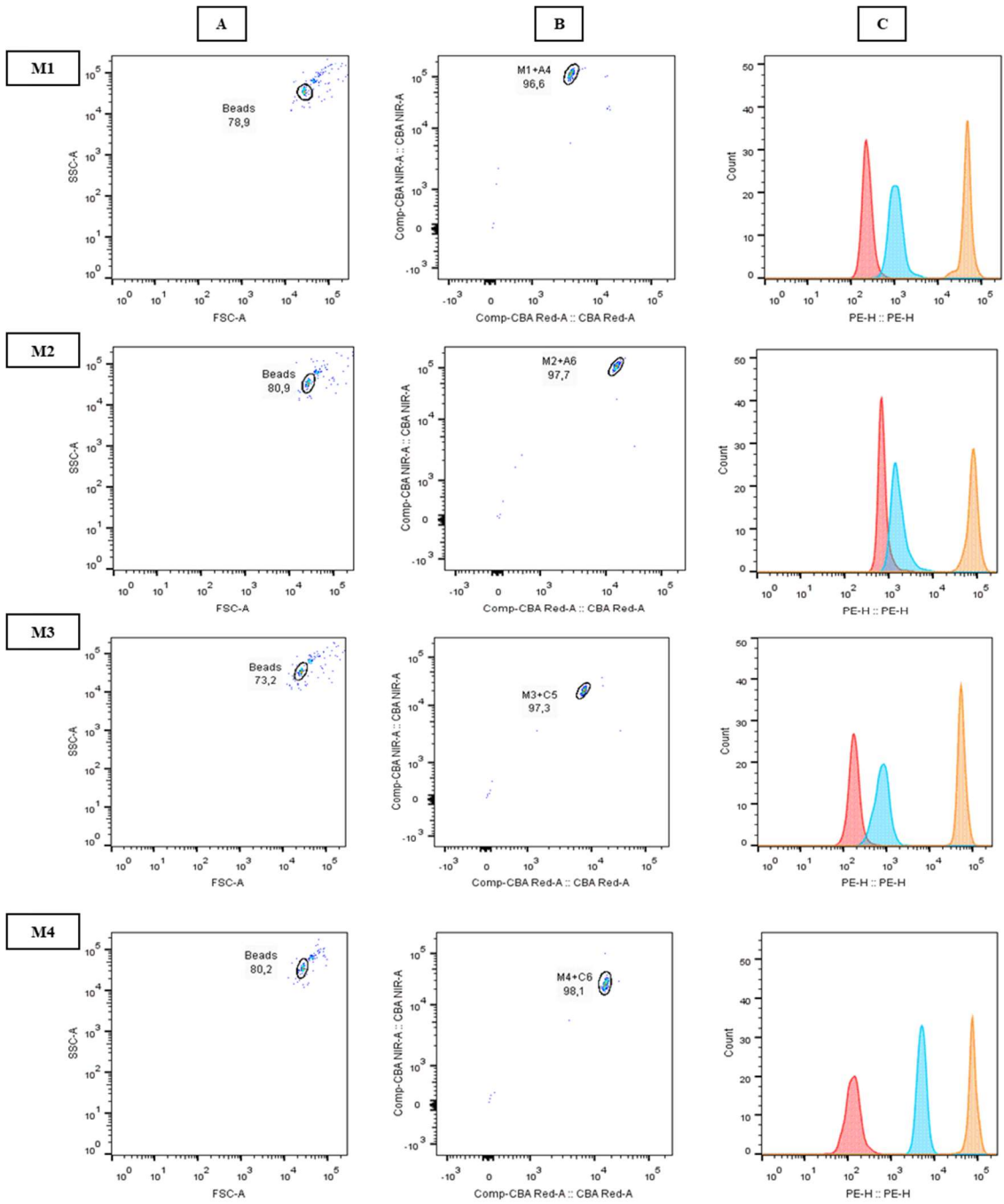
Em relação aos membros representativos de cada subgrupo de MASP escolhidos para expressão heteróloga em bactérias, é possível observar uma variação na posição dentro do ranqueamento por índice de antigenicidade. Alguns deles, como M2 (Azul) e M5 (Vermelho), estão bem classificados, enquanto outros com menor índice de antigenicidade, mas ainda posicionados entre os antígenos preditos top1000, como M3 (Dark Green) e M6 (Orange 1) (Tabela 2).

**Tabela 2: Posição das MASP representativas de cada subgrupo no imunorranqueamento dos antígenos do clone CL Brener.**

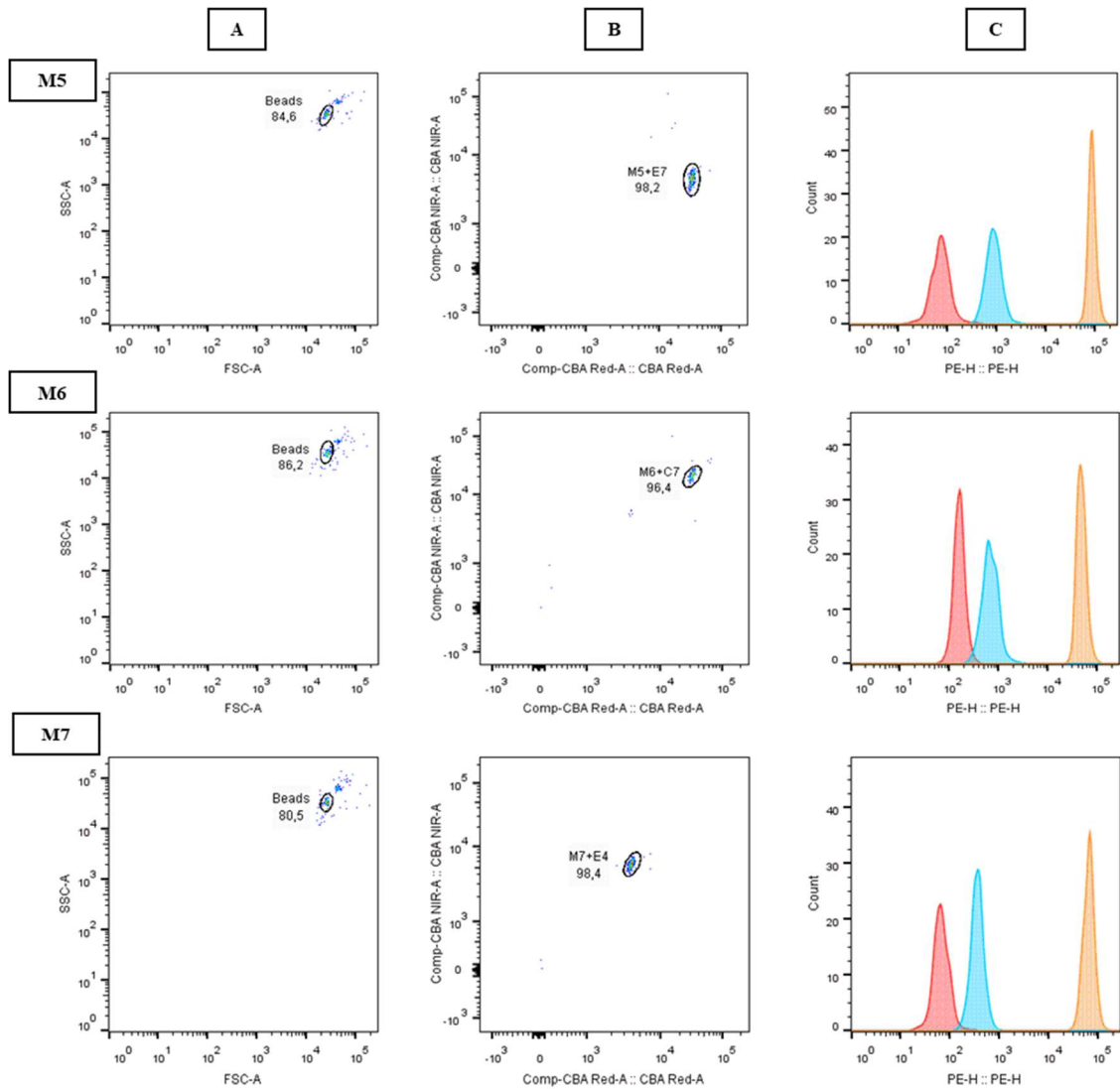
<b>MASP</b>	<b>Posição no immunorank</b>
M1 (Black)	265
M2 (Blue)	34
M3 (Dark Green)	709
M4 (Magenta)	468
M5 (Red)	155
M6 (Orange 1)	934
M7 (Orange 2)	640

### **5.1.3. Padronização de uma metodologia baseada em citometria de fluxo para o estudo do perfil de antigenicidade de proteínas MASP**

Com o objetivo de melhor avaliar o padrão de antigenicidade da família MASP, decidimos padronizar uma metodologia baseada em citometria de fluxo. A técnica consiste no acoplamento das proteínas MASP, M1 a M7, a diferentes microesferas fluorescentes que são incubadas com soros e a análise da reatividade é feita através de citometria de fluxo. Esta abordagem apresenta vantagens nas avaliações sorológicas devido à sua precisão e sensibilidade. Além disso, esta metodologia possibilita a realização de experimentos multiplex. Para confirmar o acoplamento das proteínas recombinantes M1 a M7 às diferentes microesferas fluorescentes, foram utilizados os anticorpos policlonais gerados em camundongos contra proteínas M1 a M7 (Figura 7). As análises confirmaram o acoplamento das proteínas MASP às diferentes microesferas fluorescentes pela intensidade média de fluorescência (MFI) observada nas microesferas acopladas incubadas com os respectivos soros anti-MASP, que foi superior ao controle negativo, que corresponde aos soros de animais não imunizados.



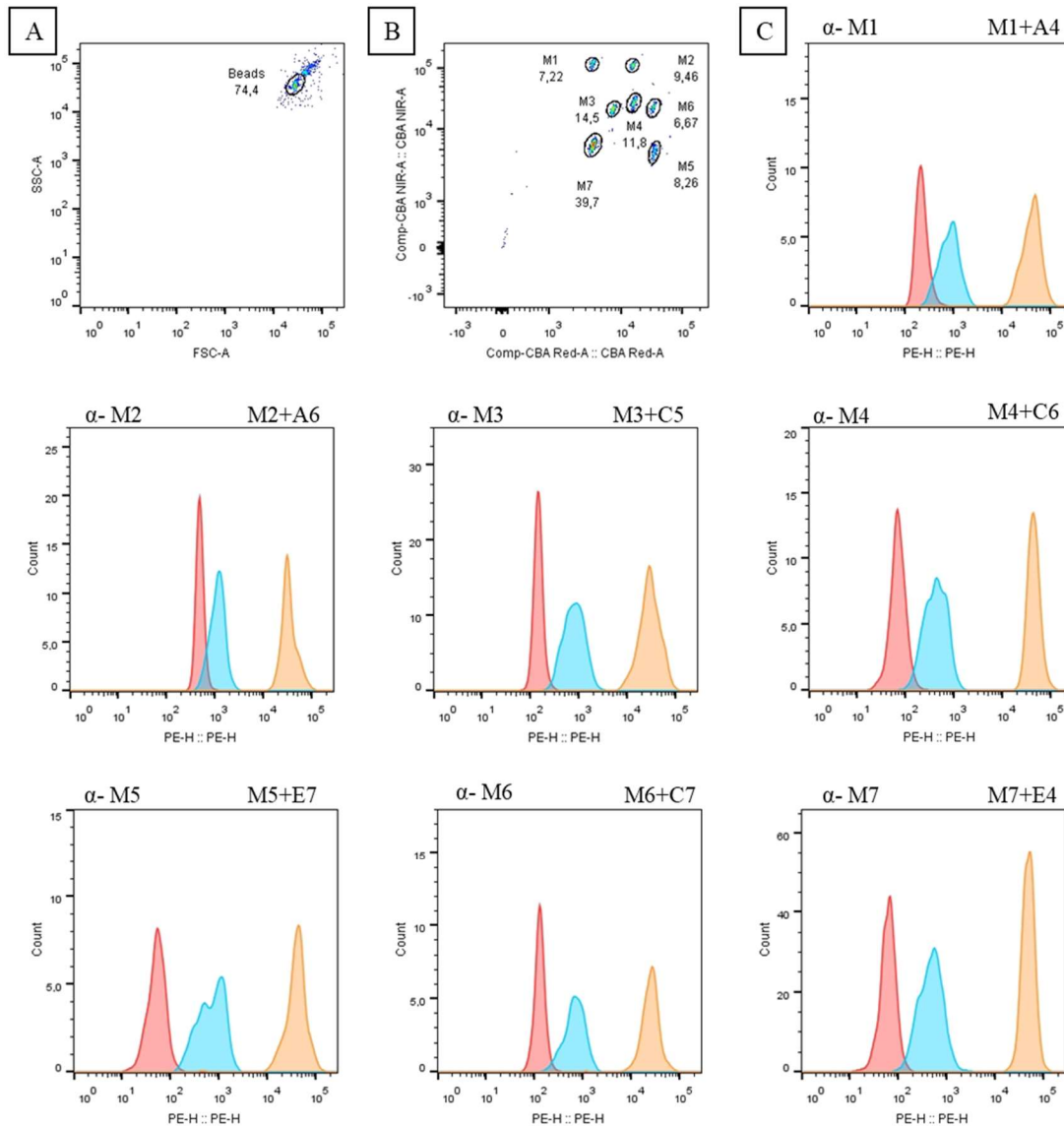




**Figura 7: Confirmação do acoplamento das proteínas recombinantes M1 a M7 às microesferas fluorescentes por citometria de fluxo.** Nas figuras: o *gate* (A), a porcentagem de microesferas de fluorescência acopladas com MASP (B) e a intensidade média de fluorescência (MFI) do não marcado em vermelho (microesferas acopladas a MASP incubadas com anti-IgG biotilado); o controle negativo em azul (microesferas acopladas a MASP após incubação com soro de camundongos não imunizados) e incubadas com soro anti-MASP em laranja (C). O anticorpo secundário utilizado foi anti-IgG de camundongo conjugado com biotina e SAPE.

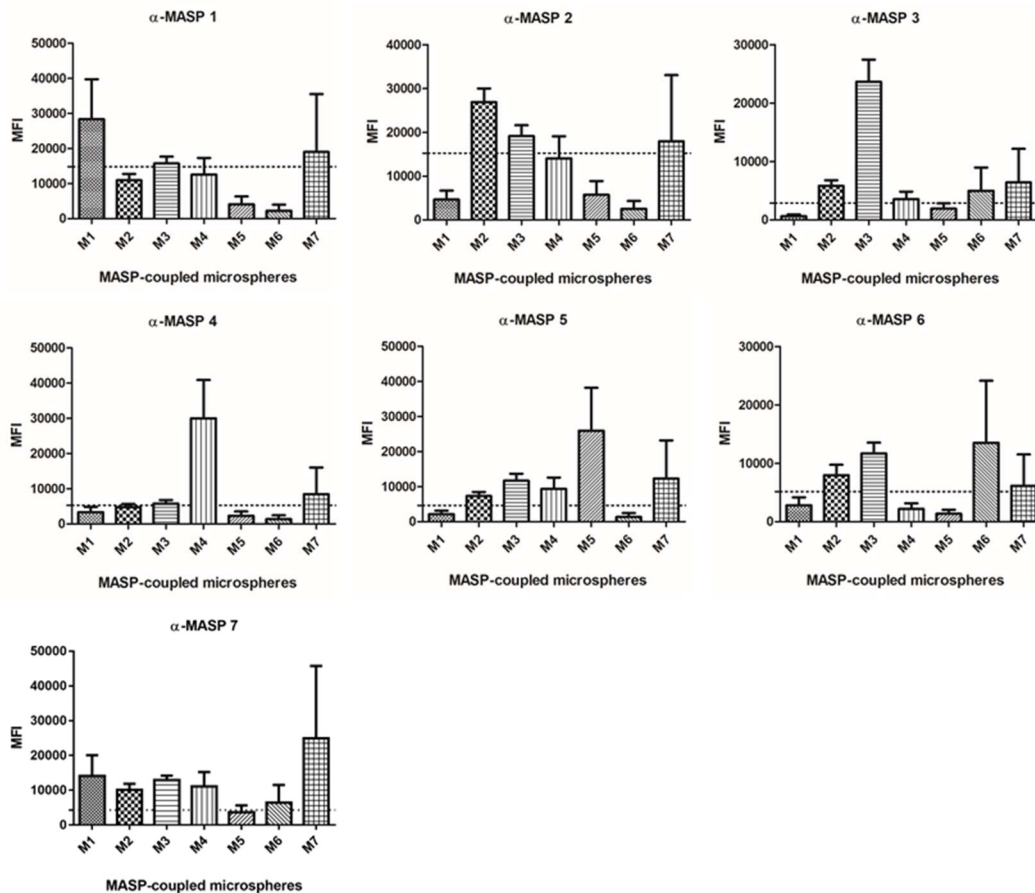
### 5.1.4. Ensaio multiplex com os 7 membros representativos da família MASP

A técnica também foi padronizada para um ensaio multiplex em que as sete proteínas MASP acopladas a diferentes microesferas fluorescentes foram incubadas simultaneamente com os anticorpos policlonais gerados contra proteínas M1 a M7 (Figura 8).



**Figura 8:** Padronização do ensaio multiplex com as proteínas MASP M1 a M7 acopladas às diferentes microesferas fluorescentes. As sete proteínas MASP acopladas às microesferas com diferentes fluorescências e tamanhos (A4, A6, C5, C6, C7, E4 e E7) foram incubadas simultaneamente com os anticorpos policlonais gerados contra as proteínas M1 a M7. Na figura: A) o *gate*, B) a porcentagem de microesferas de fluorescência acopladas com cada MASP e C) a intensidade média de fluorescência (MFI) do não marcado em vermelho (microesferas acopladas a MASP incubadas com anti-IgG biotilado); o controle negativo em azul (microesferas acopladas a MASP após incubação com soro de camundongos não imunizados) e incubadas com soro anti-MASP em laranja. O anticorpo secundário utilizado foi anti-IgG de camundongo conjugado com biotina e SAPE.

Neste experimento, foi possível observar que os anticorpos reconhecem melhor as proteínas para a qual foram gerados, apesar de ocorrer alguma reação cruzada com outras MASP (Figura 9). Essas reações cruzadas provavelmente se devem ao compartilhamento de epítomos que existem entre estas proteínas MASP. Isso porque apesar da região central dessas proteínas ser altamente variável tanto em sequência quanto em comprimento, elas apresentam um grande repertório de motivos compartilhados entre seus membros (Najib M El-Sayed et al. 2005).

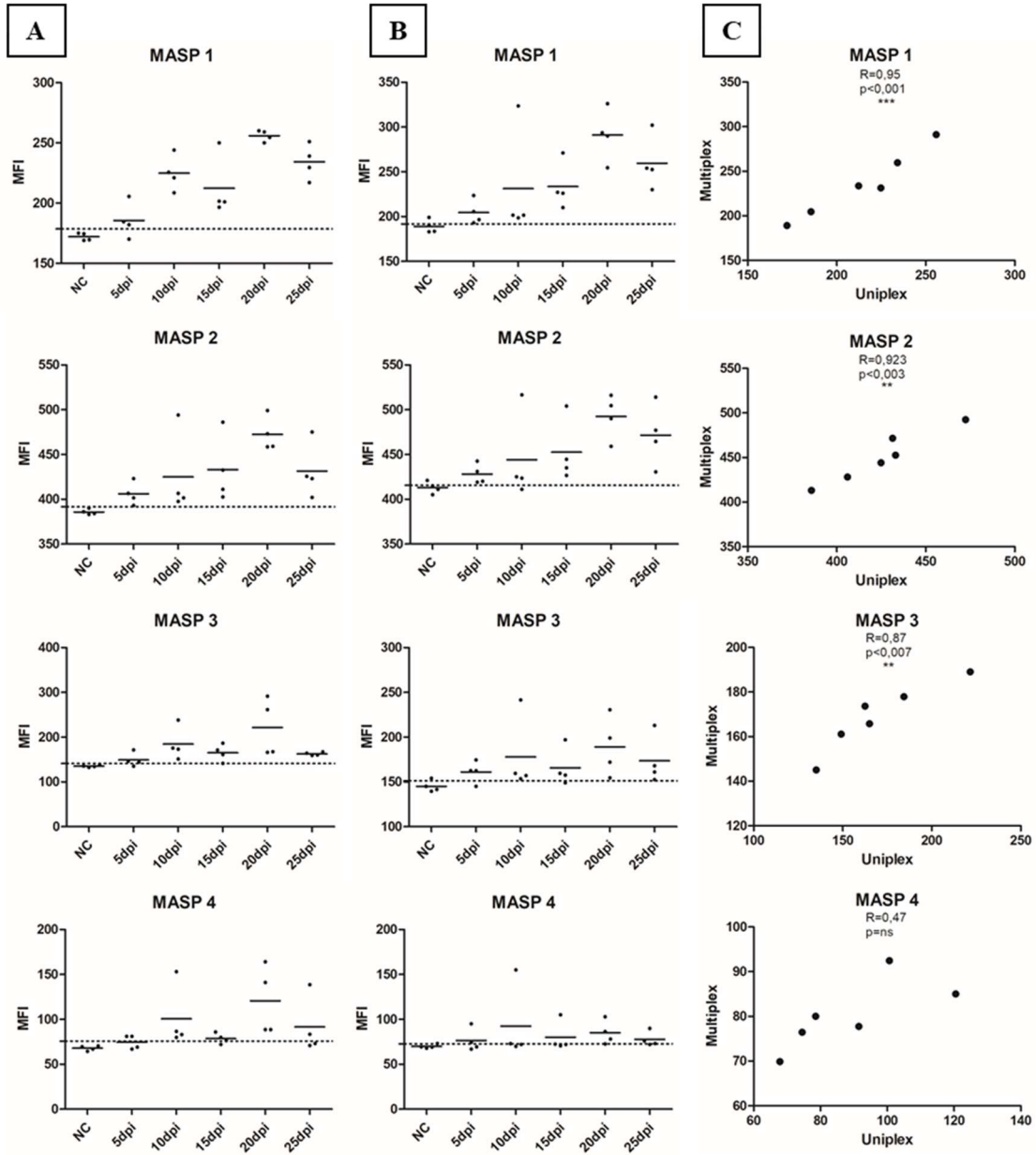


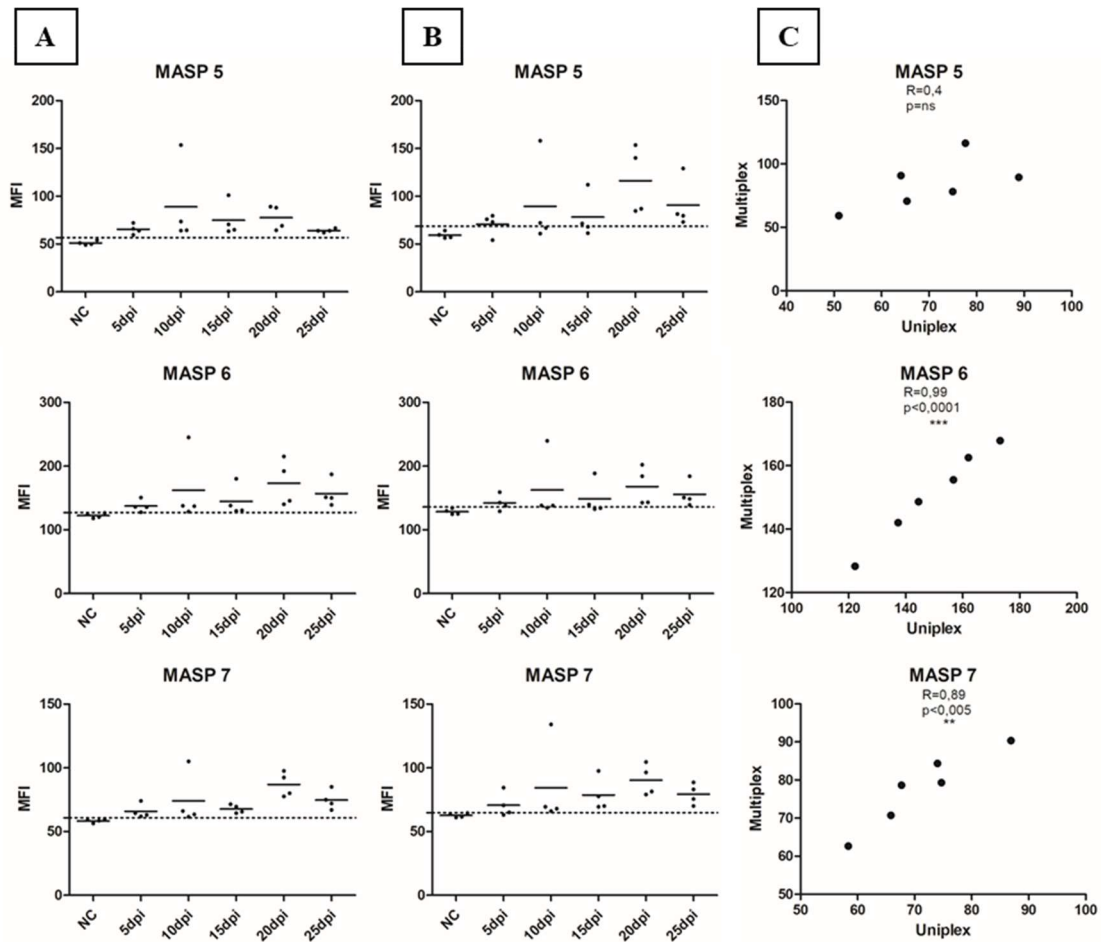
**Figura 9: Avaliação do perfil de reatividade competitiva dos membros da família MASP de diferentes subgrupos por citometria de fluxo.** Ensaio multiplex de citometria utilizando as diferentes microesferas fluorescentes acopladas às proteínas recombinantes de MASP incubadas simultaneamente com os anticorpos policlonais gerados contra as proteínas M1 a M7. Nos gráficos estão representadas a intensidade média de fluorescência (MFI) de cada uma das proteínas recombinantes de MASP incubadas ao mesmo tempo com o anticorpo policlonal anti-MASP indicado na parte superior de cada gráfico. O anticorpo secundário utilizado foi anti-IgG de camundongo conjugado com biotina e SAPE.

### **5.1.5. Ensaios de citometria de fluxo com as proteínas MASP M1 a M7 acopladas às microesferas fluorescentes e soros de camundongos em fase aguda da infecção**

Para avaliar melhor o padrão de antigenicidade da família MASP, as proteínas M1 a M7 acopladas às diferentes microesferas fluorescentes foram utilizadas em ensaios de citometria de fluxo com soros de camundongos infectados com parasitos do clone CL Brener de *T. cruzi*, coletados após 5, 10, 15, 20 e 25 dias da infecção. Os ensaios foram realizados na forma uniplex, onde cada proteína acoplada foi incubada separadamente com o soro, e na forma multiplex, em que as proteínas foram incubadas simultaneamente a mesma amostra de soro. Em ambos os ensaios, uniplex (Figura 10A) e multiplex (Figura 10B), foi observado que é possível diferenciar os soros de camundongos com apenas 5 dias de infecção daqueles que não foram infectados utilizando as proteínas MASP M1 a M7. Os valores de *cutoff* empregados foram gerados por curva ROC.

Uma análise de correlação foi realizada entre os resultados obtidos nos ensaios uniplex e multiplex utilizando os soros de camundongos em fase aguda da infecção para cada uma das proteínas de MASP M1 a M7 (Figura 10C). O resultado obtido demonstrou que os valores de MFI gerados, no uniplex e no multiplex, se correlacionam para a maioria das MASP, com exceção da M4 e M5, indicando que o ensaio pode ser realizado de ambas as formas sem prejuízo para avaliação da reatividade das proteínas para as proteínas M1 a M3 e M6 e M7. No caso das proteínas, M4 e M5, houve uma diferença de sensibilidade entre os ensaios uniplex e multiplex e por isso, não houve a correlação, entretanto, os resultados não apresentaram uma discrepância no perfil de reatividade das proteínas com soros.



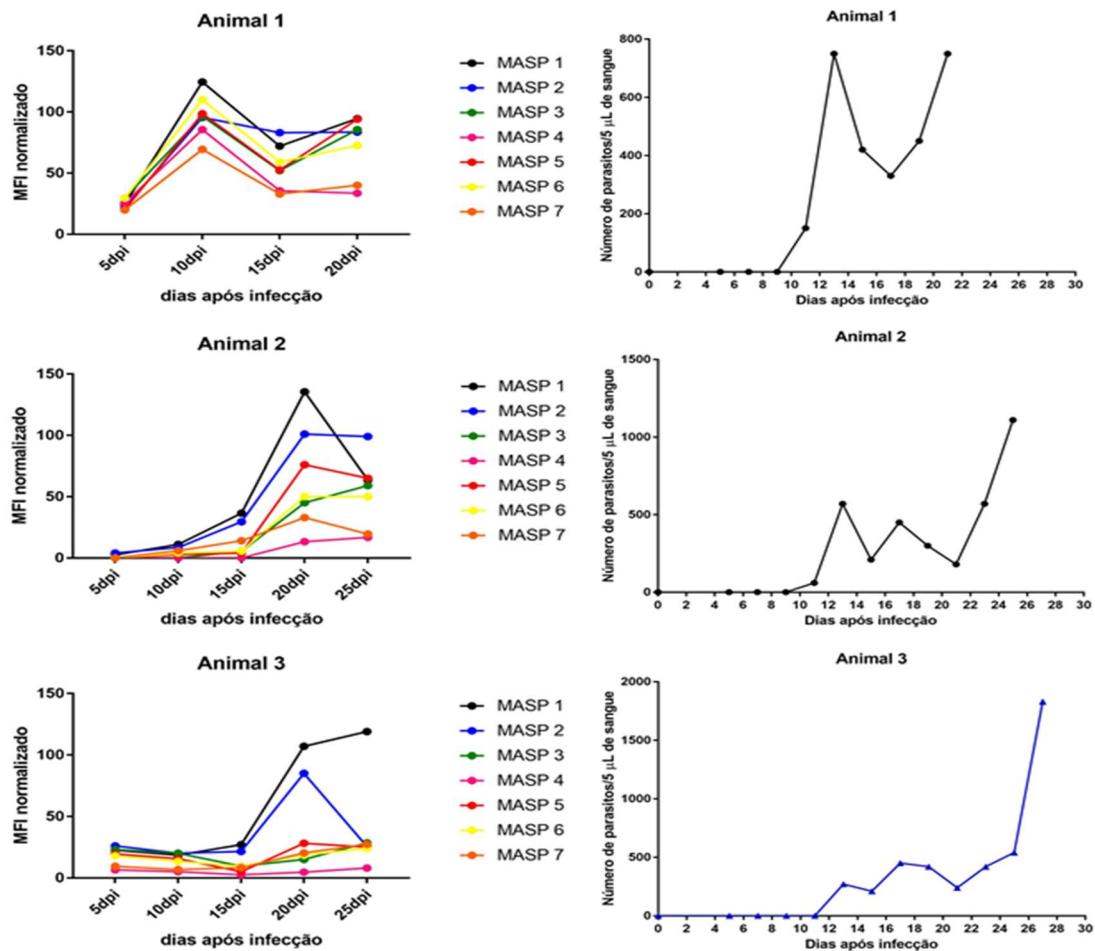


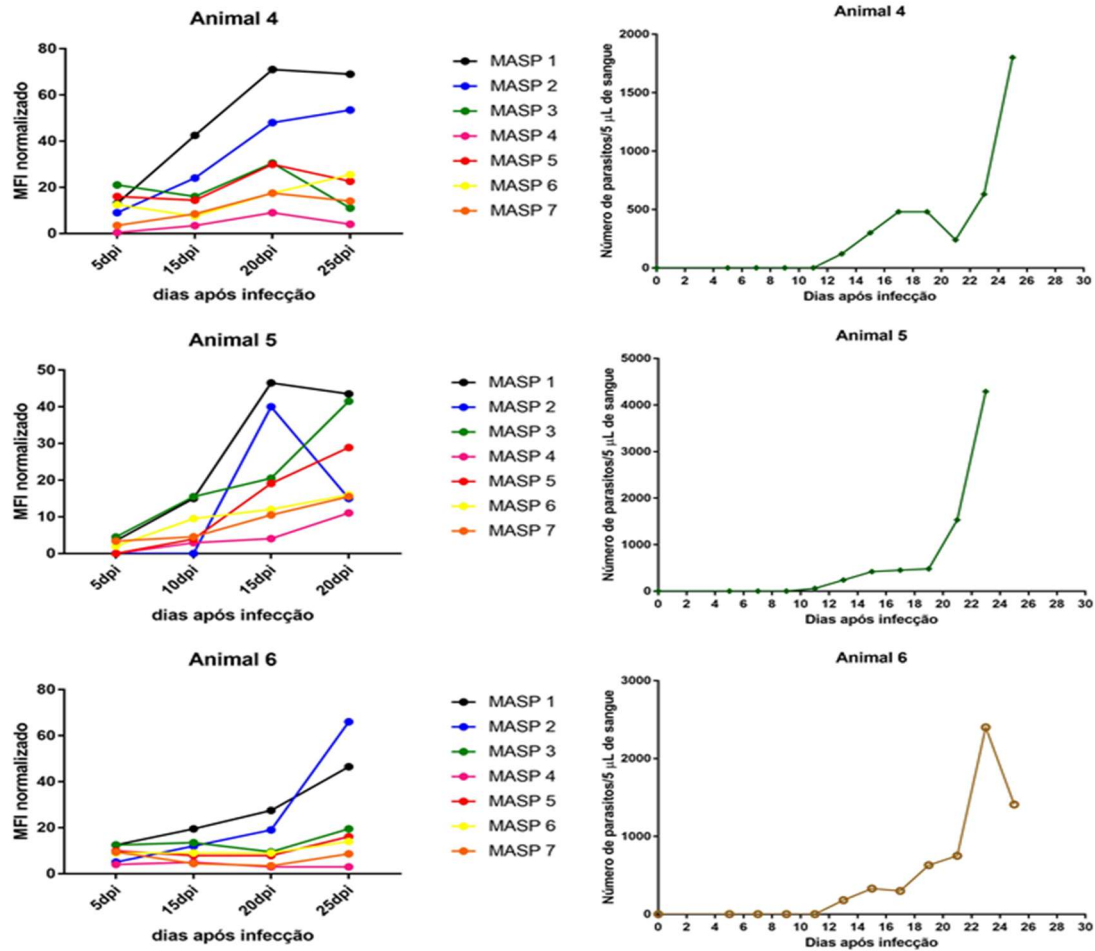
**Figura 10: Avaliação da reatividade dos soros de camundongos infectados com tripomastigotas do clone CL Brener e as proteínas recombinantes M1 a M7 por intensidade média de fluorescência (MFI). Ensaios de citometria de fluxo uniplex (A) e multiplex (B) foram realizados utilizando soros de camundongos coletados 5, 10, 15, 20 e 25 dias após a infecção. O anticorpo secundário utilizado foi anti-IgM de camundongo conjugado com biotina e SAPE. NC = soro de camundongos não infectados. Análises de correlação entre os resultados dos ensaios de uniplex e multiplex foram realizadas utilizando o GraphPad Prism 7 (C).**

### 5.1.6. Avaliação da variação do perfil de reconhecimento de proteínas MASP durante a fase aguda da infecção

A fim de melhor observar como o perfil de reconhecimento de proteínas MASP varia ao longo da fase aguda, foi realizado um ensaio multiplex utilizando proteínas MASP M1 a M7 acopladas a diferentes microesferas fluorescentes e soros individuais de camundongos infectados com tripomastigotas do clone CL Brener de *T. cruzi*, coletados após 5, 10, 15, 20 e 25 dias da infecção. Devido à maior sensibilidade desta técnica, foi possível observar as alterações do padrão de reconhecimento das proteínas com os soros coletados a partir do décimo dia de infecção. As MASP M1 e M2 apresentaram uma reatividade maior com os soros dos animais infectados em comparação às demais

proteínas avaliadas, com um aumento do seu reconhecimento pelos soros que antecedem ao pico de parasitemia do animal (figura 11). Por exemplo, no animal 2 o aumento do reconhecimento de M1 e M2 ocorre com o soro de 20dpi e o pico de parasitemia deste animal ocorre com 25dpi. Este resultado demonstra que o perfil de reconhecimento das MASP muda ao longo da infecção aguda bem como é diferente entre as proteínas M1 a M7 (Figura 11).





**Figura 11: Antigenicidade dos membros de MASP durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* em camundongos.** Do lado esquerdo da figura, está representado o ensaio multiplex de citometria de fluxo utilizando as proteínas MASP M1 a M7 acopladas a diferentes microesferas fluorescentes e soros de camundongos infectados pelo clone CL Brener de *T. cruzi* coletados durante a fase aguda da infecção. Cada linha colorida corresponde ao reconhecimento de um membro MASP após 5, 10, 15, 20 e 25 dias após a infecção. E cada gráfico apresenta os resultados para cada um dos animais infectados. MFI normalizado = diferença entre a intensidade média de fluorescência (MFI) das microesferas acopladas com MASP após incubação com os soros de camundongos infectados e o controle negativo (microesferas acopladas com MASP após incubação com soro de camundongos não infectados). O anticorpo secundário utilizado foi anti-IgM de camundongo conjugado com biotina e SAPE. Do lado direito, estão os gráficos que mostram a curva de parasitemia, avaliada em intervalos de 2 em 2 dias, dos 6 animais infectados com 80 formas tripomastigotas do clone CL Brener de *T. cruzi*.



## 6. CAPÍTULO 02:

### **Estudo da variabilidade antigênica de membros da família MASP de *Trypanosoma cruzi* e seu impacto em infecções experimentais em modelo murino**

Um aspecto importante de se tentar entender sobre as MASP é se a expansão massiva no genoma de *T. cruzi* desta família tão polimórfica, repetitiva e expressa na superfície das formas tripomastigotas circulantes estaria relacionada com mecanismos de evasão do sistema imune. Sabe-se que há co-expressão de diferentes membros de MASP em uma população de parasitos, mas não se sabe como é o padrão de expressão em células individuais. Seria esta co-expressão de diferentes membros de MASP na população de parasitos uma estratégia do parasito de impedir o hospedeiro de montar uma resposta imune mais eficiente nas fases iniciais da infecção e assim levar à cronificação da doença? A resposta imune do hospedeiro vertebrado poderia levar à seleção de subpopulações de parasitos expressando diferentes membros de MASP ao longo da infecção, favorecendo assim a sobrevivência do parasito no hospedeiro vertebrado? Para tentarmos elucidar alguns destes questionamentos, neste capítulo foram realizadas análises de expressão de membros da família por imunofluorescência, citometria de fluxo e infecção experimental de camundongos com populações de tripomastigotas enriquecidas para algumas variantes da família.

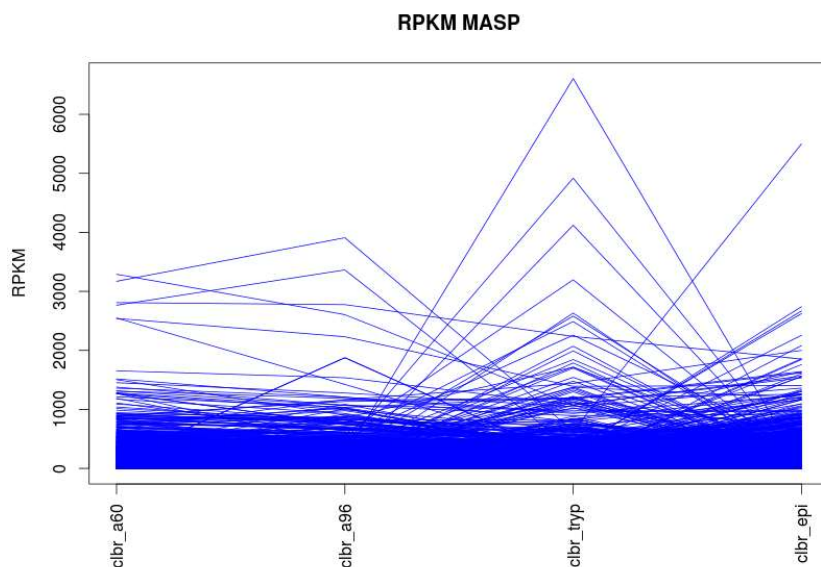
## 6.1. Resultados

### 6.1.1. Seleção dos membros de MASP para estudo baseado no padrão de expressão e antigenicidade

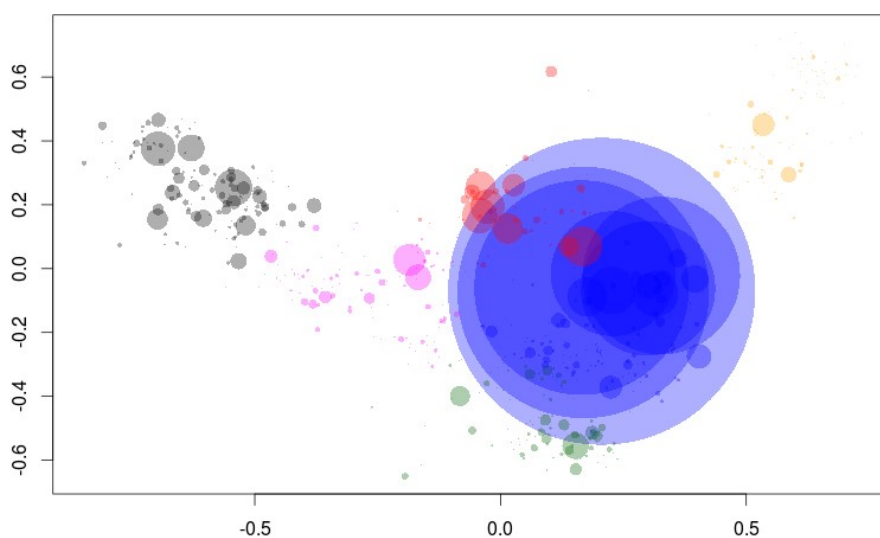
A escolha dos membros de MASP para este estudo ocorreu a partir de dois critérios: análise de expressão gênica a partir de dados do transcriptoma do clone CL Brener de *T. cruzi* e do imunorranqueamento do proteoma predito de CL Brener.

Dados de RNA-seq foram obtidos em um trabalho prévio (Belew et al. 2017) a partir do sequenciamento de bibliotecas de cDNA de células HFF infectadas com o parasito após 60 e 96 horas de infecção, tripomastigotas do sobrenadante de cultura e também de formas epimastigotas do clone CL Brener de *T. cruzi*. Após um filtro de qualidade, os transcritos gerados foram mapeados no genoma de *T. cruzi* CL Brener disponível no TriTrypDB (Najib M El-Sayed et al. 2005) e também no genoma humano, uma vez que as amostras de 60 e 96 horas após a infecção apresentavam transcritos de ambos organismos. Finalmente, após a quantificação dos transcritos, foi feita a análise estatística dos dados e análise diferencial entre as condições (Belew et al., 2017).

Um experimento bem-sucedido de RNA-seq produz uma lista de genes diferentemente expressos. Com os dados de mapeamento prontos, o número de leituras alocadas em cada gene foi transformado em uma contagem digital da expressão gênica para todos os genes utilizando o RPKM (*Reads Per Kilobase Million*), onde número de contagens por gene é dividido pelo tamanho do gene e pelo tamanho da biblioteca (em milhões), para determinar com precisão a estimativa do nível de expressão entre as condições (Figura 12). No trabalho anterior de Belew et al., 2017 foi permitido o mapeamento múltiplo de reads. No contexto deste projeto, uma vez que estávamos interessados em analisar a expressão de genes individuais da família, selecionamos genes de MASP que apresentaram maiores níveis de expressão, considerando o mapeamento único de *reads*, nas formas tripomastigotas obtidas do sobrenadante de cultura de células HFF infectadas (Figura 12).



**Figura 12: Expressão gênica diferencial de MASP ao longo do ciclo de vida de *T. cruzi*.** Nível da expressão gênica por RPKM (*Reads Per Kilobase Million*) para todos os genes da família MASP nas diferentes bibliotecas sequenciadas de *T. cruzi*. A60= células HFF após 60 horas de infecção. A96= células HFF após 96 horas de infecção. Tryp = tripomastigotas do sobrenadante em cultura. Epi= epimastigotas. Apenas reads com mapeamento único foram consideradas.



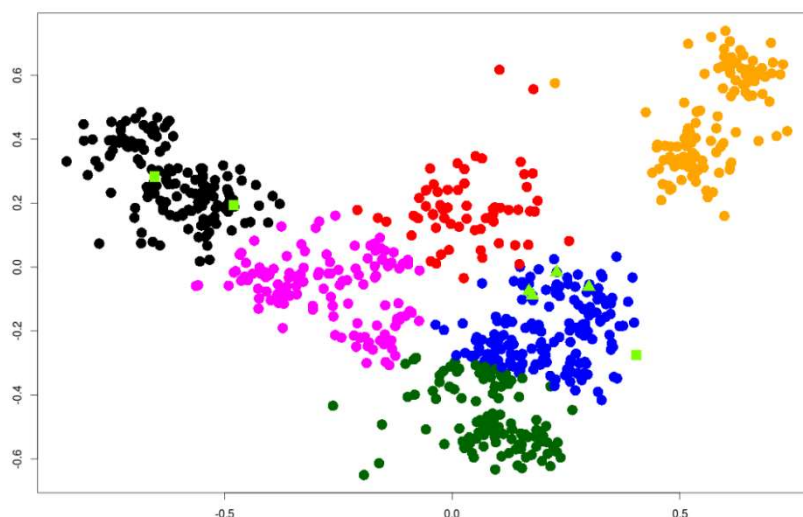
**Figura 13: Expressão diferencial de membros distintos da família MASP pelas formas tripomastigotas de *T. cruzi*.** Alinhamento par-a-par das sequências de proteínas MASP foi realizado e a matriz de distância foi usada para gerar a projeção MDS. O método K-means foi usado para definir os sete subgrupos de MASP. Cada subgrupo da família está representado por uma cor (Black, Blue, Green, Magenta, Red, Orange 1 e Orange 2). Cada ponto corresponde a um membro de MASP e o tamanho do ponto é proporcional ao nível de expressão do gene baseado no mapeamento único de reads de RNA-seq geradas no trabalho prévio de Belew et al., 2017.

Como pode ser observado na figura 13, membros da família MASP apresentam níveis bem distintos de expressão, sendo que aqueles pertencentes ao subgrupo azul são os mais expressos. Assim, a partir dos dados gerados pelo RNA-seq, foram selecionados os seguintes genes para este estudo: MASP 11- TcCLB.509979.270 (blue), MASP 12- TcCLB.509977.30 (blue), MASP 13- TcCLB.509977.80 (blue) e MASP 14- TcCLB.510037.10 (blue), que se encontram entre os 10 genes de MASP que apresentaram os maiores níveis de expressão na forma tripomastigota de sobrenadante em cultura (Belew et al. 2017). Para estes genes foram desenhados *primers* específicos para amplificação por PCR utilizando DNA genômico do parasito. Os produtos destas reações de PCR foram submetidos à separação em gel de agarose. As bandas de tamanho esperado foram excisadas dos géis e purificadas, em seguida clonadas em vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega) e os clones positivos após PCR de confirmação foram enviados para sequenciamento. O resultado do sequenciamento revelou que os produtos clonados correspondem aos genes MASP 12- TcCLB.509977.30 (blue), MASP 13- TcCLB.509977.80 (blue), MASP 14- TcCLB.510037.10 (blue) e MASP 9- TcCLB.509973.10 (blue) (Figura 14). Apesar dos primers não terem sido desenhados para este último membro, o mesmo foi incorporado no estudo uma vez que está entre os dez genes de MASP mais expressos de acordo com o transcriptoma (Tabela 3).

Um outro critério usado na seleção dos membros, foi a predição de antigenicidade. Para tanto, foi utilizada a ferramenta IMMUNORANK que verifica a abundância de epítomos de células B presentes em um banco de dados de proteínas (Lobo et al., em preparação). A partir deste critério os seguintes genes também foram selecionados: MASP 17 - TcCLB.508541.90 (blue), MASP 18 -TcCLB.506321.120 (blue), MASP 19 -TcCLB.506955.99 (black) e MASP 20 -TcCLB.508539.110 (black). Estes genes se encontravam entre os 100 mais antigênicos de acordo com o imunorranqueamento e entre os 100 mais expressos de acordo com os dados de transcriptoma. Após o mesmo procedimento descrito anteriormente, o resultado do sequenciamento revelou que foram amplificados os genes MASP 18 -TcCLB.506321.120 (blue), MASP 19 - TcCLB.506955.99 (black) e MASP 20 -TcCLB.508539.110 (black), que foram utilizados no estudo (Tabela 3) (Figura 14).

**Tabela 3: MASP selecionadas para expressão heteróloga.** O posicionamento do gene de MASP selecionado na análise pelo RNA-seq, seu ID no banco de dados do TriTrypDB, a posição pelo imunorranqueamento, assim como sua anotação, subgrupo que pertence e o código dado a proteína codificada, se encontram na tabela abaixo.

ID	Código	Immunorank	Rank RNA-Seq	Subgrupo
TcCLB.509973.10	MASP 9	1570	2	blue
TcCLB.509977.30	MASP 12	590	5	blue
TcCLB.509977.80	MASP 13	1450	6	blue
TcCLB.510037.10	MASP 14	1547	10	blue
TcCLB.506321.120	MASP 18	66	24	blue
TcCLB.506955.99	MASP 19	3	39	black
TcCLB.508539.110	MASP 20	22	53	black

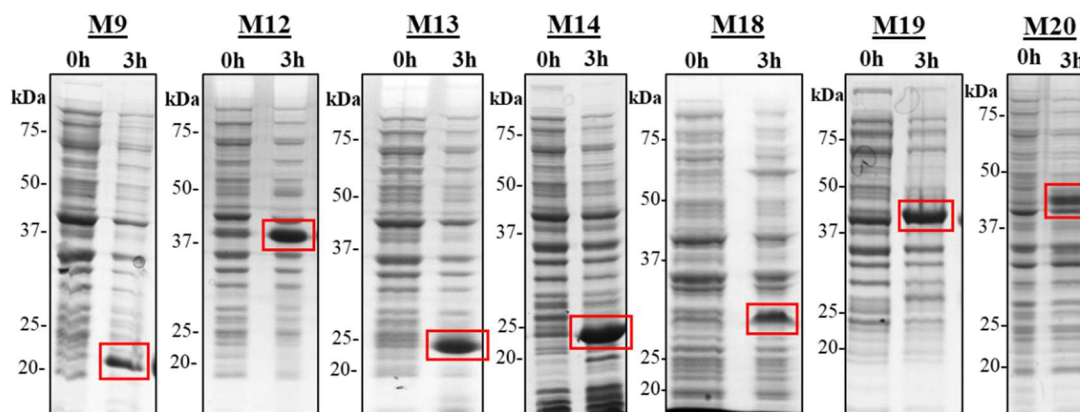


**Figura 14: Representação no multidimensional scaling (MDS) das proteínas de MASPs selecionadas para expressão.** Cada subgrupo da família está representado por uma cor (Black, Blue, Green, Magenta, Red, Orange 1 e Orange 2). Cada ponto triangular em verde corresponde ao membro de MASP selecionado a partir do transcriptoma e cada ponto quadrado em verde corresponde ao membro de MASP selecionado a partir do imunorranqueamento. A partir dos dados gerados pelo RNA-seq, foram selecionados os genes de MASP: TcCLB.509977.30 (M12 - Blue), TcCLB.509977.80 (M13- Blue) e TcCLB.510037.10 (M14-blue). A partir do imunorranqueamento foram selecionados os genes de MASP: TcCLB.506321.120 (M18- Blue), TcCLB.506955.99 (M19- Black) e TcCLB.508539.110 (M20- Black).

### 6.1.2. Expressão em *E. coli* de proteínas recombinantes de MASP

Após a seleção dos membros da família MASP para o estudo, *primers* para amplificação da região codificadora variável desses genes foram desenhados, excluindo as sequências conservadas que codificam para o peptídeo sinal e o sítio de adição à âncora GPI nas proteínas. Estas sequências conservadas foram excluídas uma vez que são removidas na proteína madura exposta na superfície das formas tripomastigotas. Estes genes foram clonados no vetor pET28a.TEV e as proteínas recombinantes M9(blue), M12(blue), M13(blue), M14(blue), M18(blue), M19(black) e M20(black) foram expressas em bactérias BL-21 Star e purificadas em coluna de afinidade como descrito no item 4.11. Para averiguar a ocorrência da expressão foram coletadas frações da cultura imediatamente antes (tempo 0h) e logo após 3 horas da indução de expressão pela adição de IPTG. As amostras foram aplicadas em gel SDS-PAGE e foram observadas bandas de superexpressão de aproximadamente 21kDa, 39kDa, 24kDa, 24kDa, 30kDa, 40kDa e 42kDa nas frações após 3 horas da indução de expressão das bactérias contendo os genes que codificavam, respectivamente, para as proteínas M9 (blue), M12 (blue), M13 (blue), M14 (blue), M18 (blue), M19 (black) e M20 (black) (Figura 15).

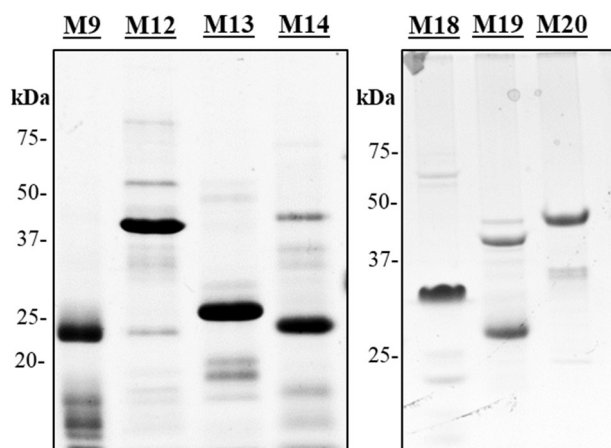
As sequências de aminoácidos das proteínas recombinantes foram submetidas à predição de peso molecular através da ferramenta ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>), do Swiss Institute of Bioinformatics, e foram obtidos os seguintes pesos moleculares esperados para as proteínas: M9 (13kDa), M12 (22kDa), M13 (14kDa), M14 (13kDa), M18 (36kDa), M19 (23kDa) e M20 (21kDa). As MASPs expressas apresentaram pesos moleculares discordantes com os resultados obtidos através das análises eletroforéticas em SDS-PAGE. Portanto, o DNA plasmidial contendo os genes que codificam para as proteínas de MASP clonados no vetor pET-28a-TEV foram sequenciados e as identidades genéticas novamente confirmadas. Outras proteínas de MASP expressas em nosso laboratório também apresentam padrão anômalo de migração em gel de poliacrilamida (dados não mostrados).



**Figura 15: SDS-PAGE das expressões heterólogas das proteínas recombinantes.** Acima de cada gel estão evidenciados os códigos referentes às proteínas recombinantes de *T. cruzi*. Os retângulos vermelhos apontam as bandas de expressão para todas as proteínas recombinantes obtidas. 0h = canaleta contendo o lisado bacteriano antes da adição do IPTG (indutor da expressão). 3h = Canaleta contendo o lisado bacteriano após 3 horas da indução do IPTG. kDa = kilo Daltons.

### 6.1.3. Purificação das proteínas recombinantes de MASP

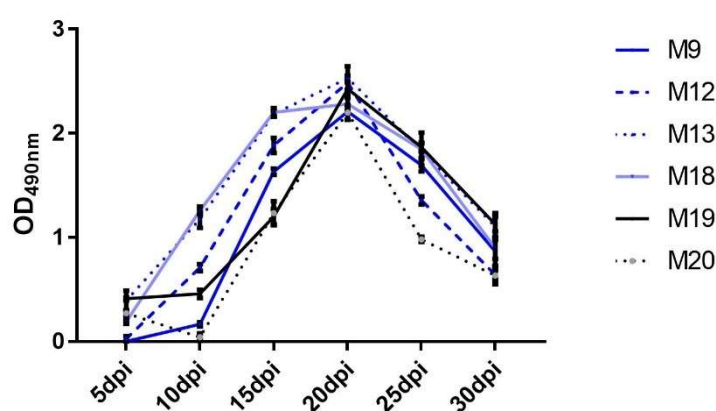
Após os testes de solubilidade (dados não mostrados) indicarem que as todas as proteínas recombinantes M9(blue), M12(blue), M13(blue), M14(blue), M18(blue), M19(black) e M20(black) se encontravam na fração solúvel do extrato de bactérias. Esta fração contendo cada proteína recombinante foi submetida à purificação por cromatografia de afinidade em coluna HisTrap HP (GE Healthcare) no aparelho ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare), conforme descrito no item 4.11 de materiais e métodos (Figura 16).



**Figura 16: Frações das purificações por cromatografia de afinidade das proteínas recombinantes de MASP.** Acima de cada canaleta está evidenciado o código da proteína recombinante purificada aplicada: M9 (blue), M12 (blue), M13 (blue), M14 (blue), M18 (blue), M19 (black) e M20 (black). Em cada canaleta foi aplicado 5µg da proteína recombinante purificada. kDa = kiloDaltons.

#### 6.1.4. Avaliação da reatividade das proteínas MASP com soros de animais infectados com *T. cruzi*

Para avaliar a antigenicidade das proteínas MASP geradas neste capítulo do trabalho, ensaios de ELISA foram realizados com soros de camundongos infectados com parasitos do clone CL Brener de *T. cruzi*. No primeiro teste, foram utilizadas as proteínas recombinantes de MASP M9, M12, M13, M18, M19 e M20, o *pool* de soros de animais infectados coletados na fase aguda: 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias após a infecção (dpi), e o *pool* de soros de animais não infectados, como controle negativo.



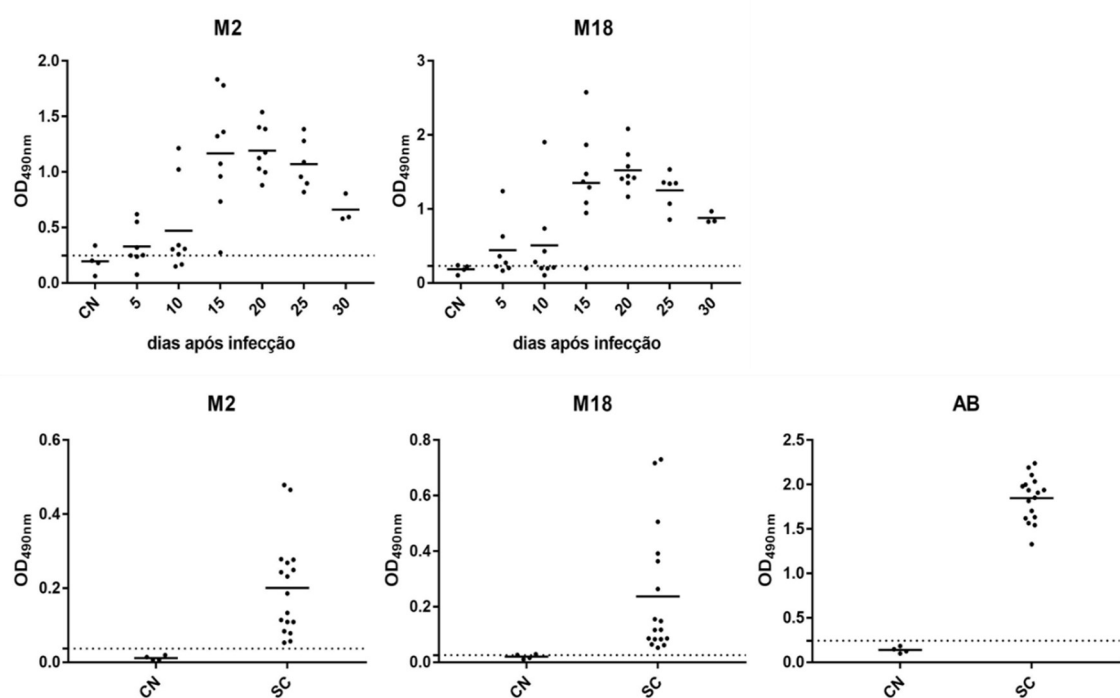
**Figura 17: Avaliação da reatividade de proteínas MASP com soros de fase aguda de animais infectados por *T. cruzi*.** As proteínas recombinantes de MASP M9(blue), M12(blue), M13(blue), M18(blue), M19(black) e M20(black) foram imobilizadas em placas de ELISA e incubadas com *pool* de soros de camundongos (1:100) coletados ao longo da fase aguda (5dpi, 10dpi, 15dpi, 20dpi, 25dpi e 30 dpi) da infecção por *T. cruzi*. O anticorpo secundário utilizado foi anti-IgM de camundongo conjugado com peroxidase (1:5000). No eixo das ordenadas estão representadas as absorbâncias em 490nm normalizadas pela diferença entre o valor mensurado nos poços incubados com *pool* de soros de animais infectados dos que foram incubados com o controle negativo, *pool* de soros de animais não infectados (1:100). Cada ponto corresponde à média de triplicata.

Os resultados demonstraram que o reconhecimento das MASP M12, M13, M18 e M19 se deu a partir do soro de 10 dias após a infecção, enquanto que com as proteínas M9 e M20 apenas com 15 dias após a infecção. No entanto, para todas as proteínas de MASP testadas, o pico de reconhecimento ocorreu com o soro de 20dpi, com posterior redução de reatividade (Figura 17).

No segundo teste, avaliamos o reconhecimento das proteínas MASP M2 e M18 com soros individuais dos animais infectados coletados ao longo da fase aguda: 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias após a infecção (dpi). Como também, soros individuais de camundongos infectados com o clone CL Brener de *T. cruzi* coletados na fase crônica quatro meses após



a infecção. Como controle foi utilizado soros de camundongos não infectados, para ambos os testes, e o antígeno bruto de formas tripomastigotas do clone CL Brener de *T. cruzi*, para o ensaio com os soros de animais de fase crônica.



**Figura 18: Avaliação da reatividade de proteínas MASP com soros de animais infectados pelo *T. cruzi*.** As proteínas recombinantes de MASP M2(blue) e M18(blue) e o antígeno bruto (AB), de formas tripomastigotas do clone CL Brener de *T. cruzi*, foram imobilizadas no fundo de placas de ELISA. Na parte superior, estão os gráficos do ensaio de M2 e M18 com soros individuais de camundongos (1:100) coletados ao longo da fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, e soros de animais não infectados (1:100), como controle negativo (CN). O anticorpo secundário utilizado foi anti-IgM de camundongo conjugado com peroxidase (1:5000). Na parte inferior, estão os gráficos do ensaio com AB, M2 e M18 e soros individuais de camundongos (1:100) coletados na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi* e soros de animais não infectados (1:100). O anticorpo secundário utilizado neste ensaio foi anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:5000). No eixo das ordenadas estão representadas as absorvâncias em 490nm. Cada ponto corresponde à média de triplicata. Os valores de *cutoff* foram determinados como a média acrescida de três desvios padrões dos soros de animais não infectados.

O resultado demonstrou que a reatividade de M2 e M18 com o soro de fase crônica de animais infectados pelo *T. cruzi* foi inferior ao visto com os soros de fase aguda (Figura 18).

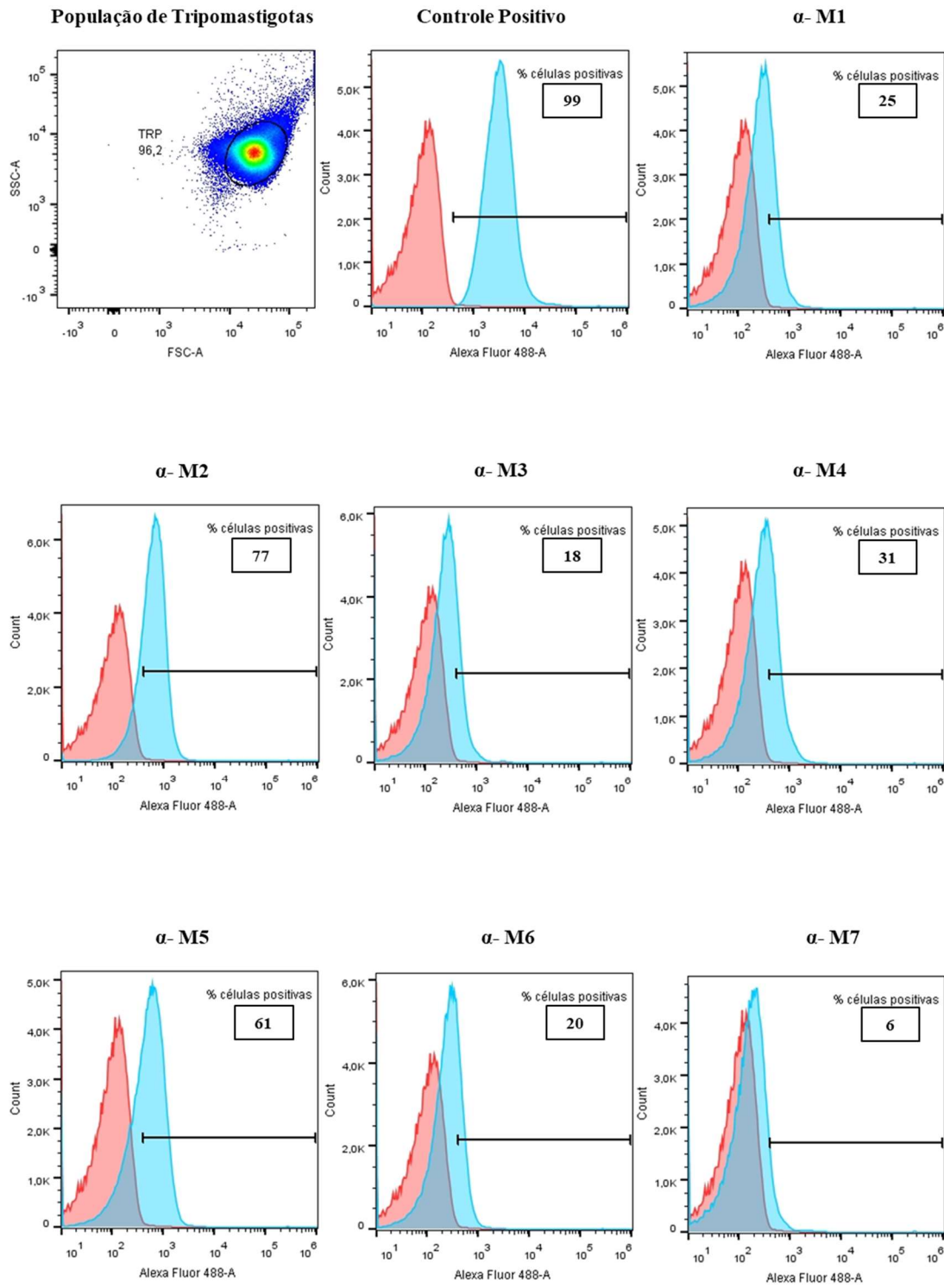
### 6.1.5. Obtenção dos soros de camundongos BALB/c imunizados com as proteínas recombinantes de MASP

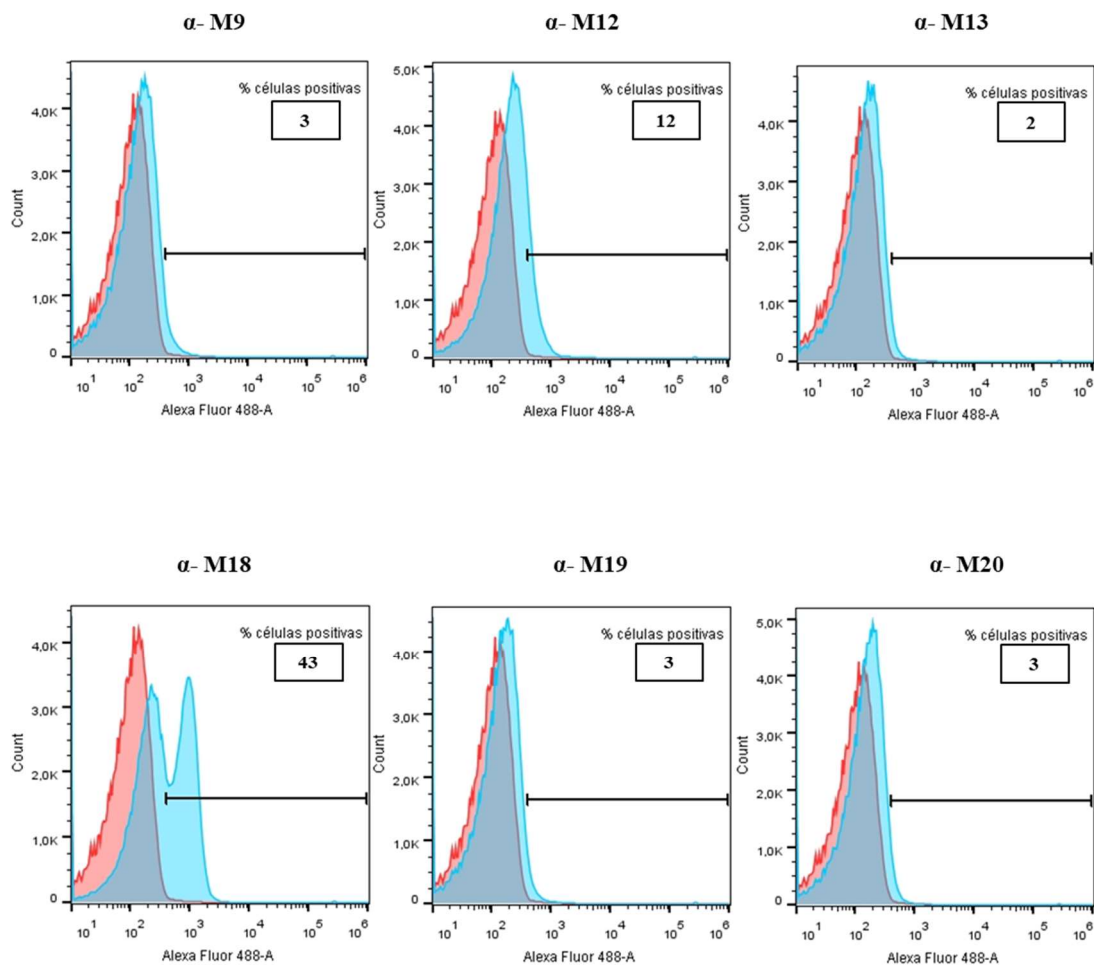
Camundongos BALB/c, em um número de 5 animais por grupo, foram imunizados com as proteínas recombinantes M9(blue), M12(blue), M13(blue),

M14(blue), M18(blue), M19(black) e M20(black) purificadas. Os soros desses animais foram coletados após 45 dias da primeira imunização. A reatividade dos soros foi verificada através de ensaios de ELISA utilizando cada uma das proteínas recombinantes como antígeno, tendo sido observado altos níveis de IgG nos animais imunizados. Todos os soros de animais imunizados apresentaram reatividade acima dos valores de *cutoff* determinados como a média acrescida de três desvios padrões dos soros de animais não imunizados (dados não mostrados).

#### **6.1.6. Citometria de fluxo das formas tripomastigotas de *T. cruzi* utilizando anticorpos policlonais anti-MASP**

Os anticorpos policlonais obtidos contra as proteínas recombinantes de MASP (M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M9, M12, M13, M18, M19 e M20) foram utilizados para quantificar o percentual de parasitos de CL Brener de *T. cruzi* expressando as proteínas MASPs correspondentes. Para tanto, tripomastigotas não permeabilizadas foram marcadas com anticorpos policlonais anti-MASP, seguido de marcação com anticorpo secundário conjugado a Alexa Fluor 488 (Life Technologies), e as análises feitas por citometria de fluxo. Como pode ser observado na Figura 19, a porcentagem de marcação dos tripomastigotas com os diferentes anticorpos é variada. Além disso, é possível observar que não há uma separação evidente de uma população negativa para uma população positiva, e isto ocorre provavelmente devido ao compartilhamento de epítomos que existe entre diversos membros de MASP, que leva o anticorpo a reconhecer diferente proteínas MASP com intensidades variáveis. Os anticorpos que apresentaram maior percentual de marcação na população foram o anti-M2 com 77% de marcação, anti-M5 com 61% e o anti-M18 com 43% de parasitos marcados. Já os anticorpos anti-M1, anti-M3, anti-M4, anti-M6 e anti-M12, marcaram entre 10 a 30% dos tripomastigotas na população; e os anticorpos anti-M7, anti-M9, anti-M13, anti-M19 e anti-M20, apresentaram um percentual de marcação inferior a 10%. Estes resultados demonstraram que não são todos os parasitos da população que são reconhecidos por cada anticorpo policlonal usado, indicando que a expressão das diferentes MASPs é limitada a um número restrito de tripomastigotas da população.

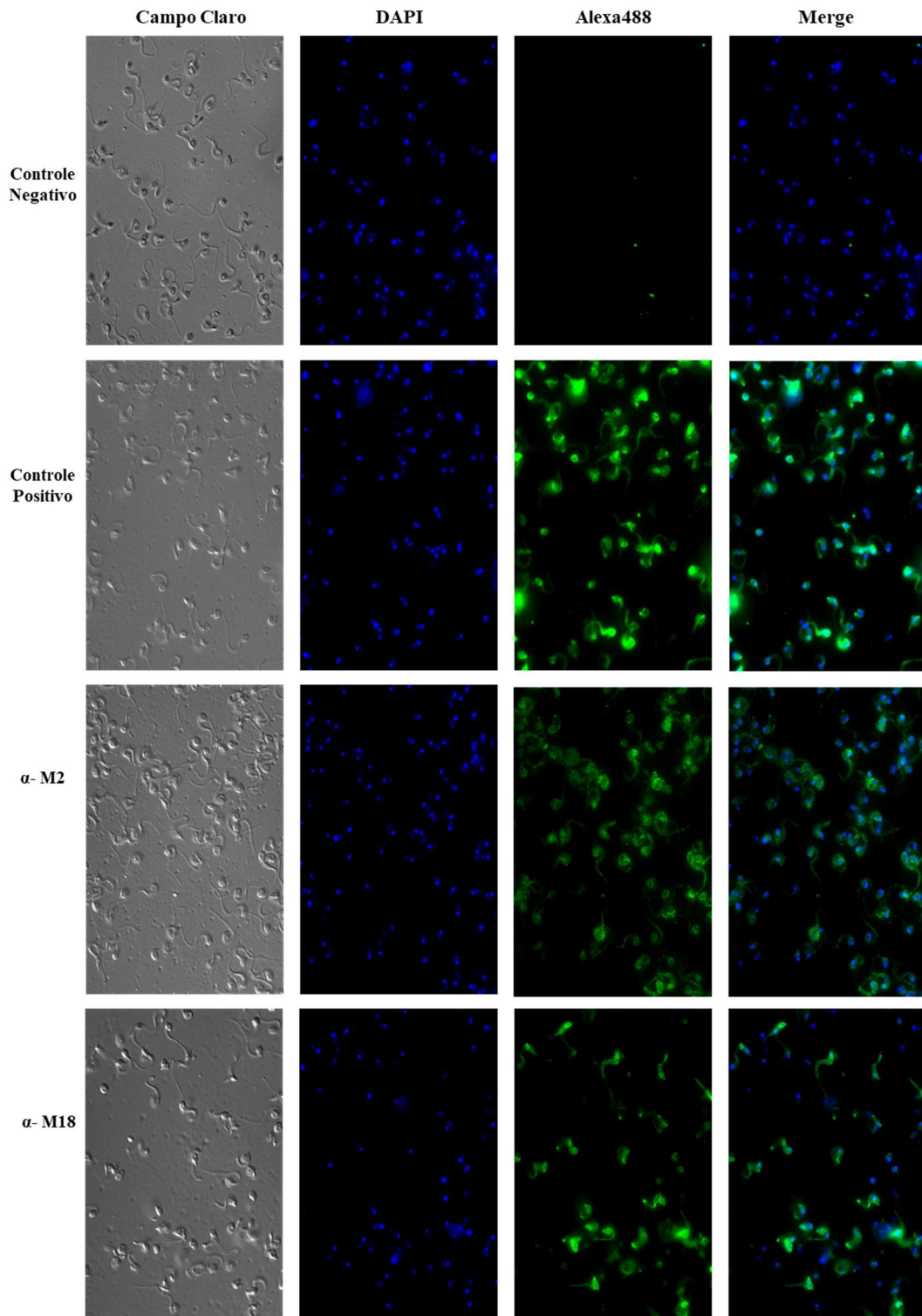




**Figura 19: Percentual de tripomastigotas marcadas com anticorpos policlonais anti-MASP.** Tripomastigotas não permeabilizadas do clone CL Brener de *T. cruzi* foram incubadas com o anticorpo policlonal contra as proteínas M1(black), M2(blue), M3 (dark green), M4(magenta), M5(red), M6(orange 1), M7(orange 2), M9(blue), M12(blue), M13(blue), M18(blue), M19(black) e M20(black) (diluição 1:1000) e com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 (diluição 1:1000). As análises foram realizadas por citometria de fluxo. No histograma em vermelho está representada a população incubada com o controle negativo (soro de animais não imunizados), e em azul está representada a população de parasitos incubados com anticorpos policlonais anti-MASP.O percentual de células marcadas com cada anticorpo e o *cutoff*, que foi delimitado a partir do ponto em que a população de tripomastigotas incubadas com o soro de animais não imunizados ( controle negativo) não apresentou marcação, estão indicados em cada gráfico. Na figura também está representada a população de tripomastigotas.

#### **6.1.7. Imunofluorescência (IFA) das formas tripomastigotas de *T. cruzi* utilizando anticorpos policlonais anti-MASP**

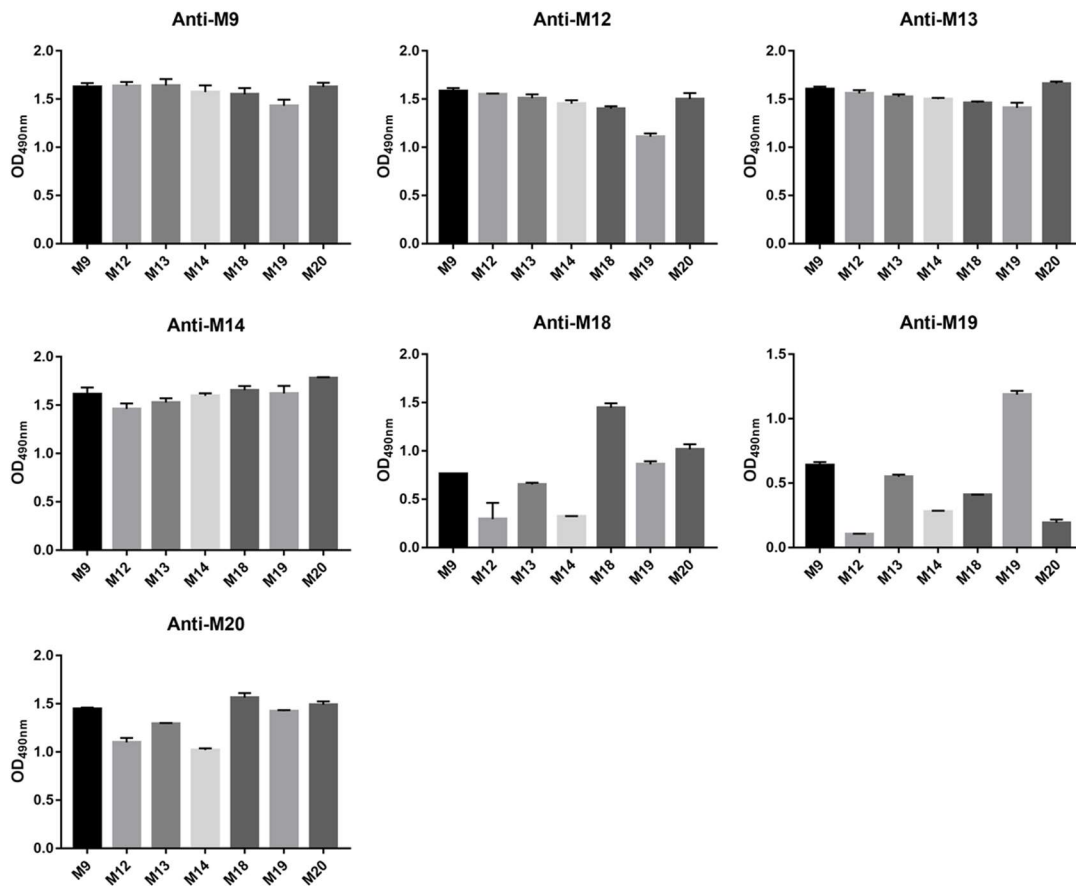
Para observar o padrão de marcação dos parasitos de CL Brener de *T. cruzi* com os anticorpos anti-MASP, tripomastigotas não permeabilizadas foram analisadas por imunofluorescência utilizando anticorpos policlonais anti-M2 e anti-M18. Estes anticorpos foram escolhidos por estarem entre os que marcaram um maior percentual de parasitos nos ensaios de citometria de fluxo. O resultado demonstrou mais uma vez que não foram todos os parasitos da população que reagiram com os anticorpos policlonais contra essas proteínas, novamente indicando que a expressão das MASP M2(blue) e M18(blue) é limitada a um subgrupo de parasitos da população, como foi observado nos experimentos de citometria de fluxo. Além disso, pode-se observar que as tripomastigotas que expressavam as proteínas M2(blue) e M18(blue) foram marcadas na superfície celular do parasito em forma de pontos e não homogeneamente (Figura 20).



**Figura 20: Localização celular das proteínas MASP M2 e M18 na superfície de *T. cruzi*.** Formas tripomastigotas do clone CL Brener de *T. cruzi* não permeabilizadas e fixadas com 2% de paraformaldeído em PBS 1X foram incubadas com anticorpo policlonal contra as proteínas M2(blue) e M18(blue) (diluição 1:500) e com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 (diluição 1:1000). As células também foram coradas com DAPI, marcando o DNA nuclear e o DNA do cinetoplasto.

### 6.1.8. Anticorpos monoclonais anti-MASP

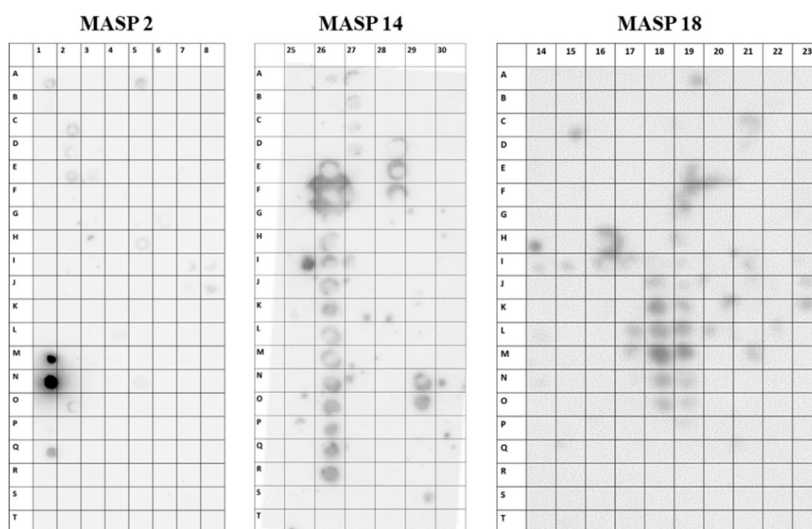
Após os estudos feitos utilizando anticorpos policlonais, decidimos partir para a geração de anticorpos monoclonais anti-MASP. Devido ao grande polimorfismo dos genes de MASP e ao compartilhamento de epítomos entre os diversos membros da família, os anticorpos policlonais produzidos ao longo deste trabalho apresentaram reconhecimento cruzado entre várias proteínas de MASP (Figura 21 e Figura 9). Assim, anticorpos monoclonais (mAb) anti-MASP 2, 14 e 18, selecionados pelo perfil de expressão e antigenicidade, foram gerados em colaboração com o laboratório do Prof. Dr. Miguel Navarro do Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra (Granada, Espanha).



**Figura 21: Reatividade cruzada dos anticorpos policlonais anti-MASP com as proteínas recombinantes de MASP.** As proteínas recombinantes purificadas de MASP M9 (blue), M12 (blue), M13 (blue), M14 (blue), M18 (blue), M19 (black) e M20 (black) e o *pool* de cada um dos anticorpos policlonais anti-MASP (1:500) foram utilizados em ensaio de ELISA. O anticorpo secundário utilizado foi anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:5000). No eixo das ordenadas estão representadas as absorbâncias em 490nm. Cada barra corresponde à média de triplicata.

### 6.1.9. Immunoblot com mAb anti-MASP

Para testar os mAbs anti-MASP gerados e mapear os peptídeos reconhecidos por eles, foram gerados *arrays* de peptídeos de MASP através da síntese química de peptídeos sobre uma membrana porosa de celulose, utilizando o equipamento ResPep RS (Intavis). Para realizar este mapeamento, peptídeos de 10 resíduos de tamanho, com sobreposição de 1 ou 3 aminoácidos cobrindo toda a sequência de cada proteína (M2, M14 e M18), foram sintetizados e cada membrana incubada com os respectivos anticorpos monoclonais. Os resultados demonstraram que os sobrenadantes de cultura contendo o mAb anti-MASP reconheciam peptídeos das proteínas de MASP contra a qual eles foram gerados (Figura 22).



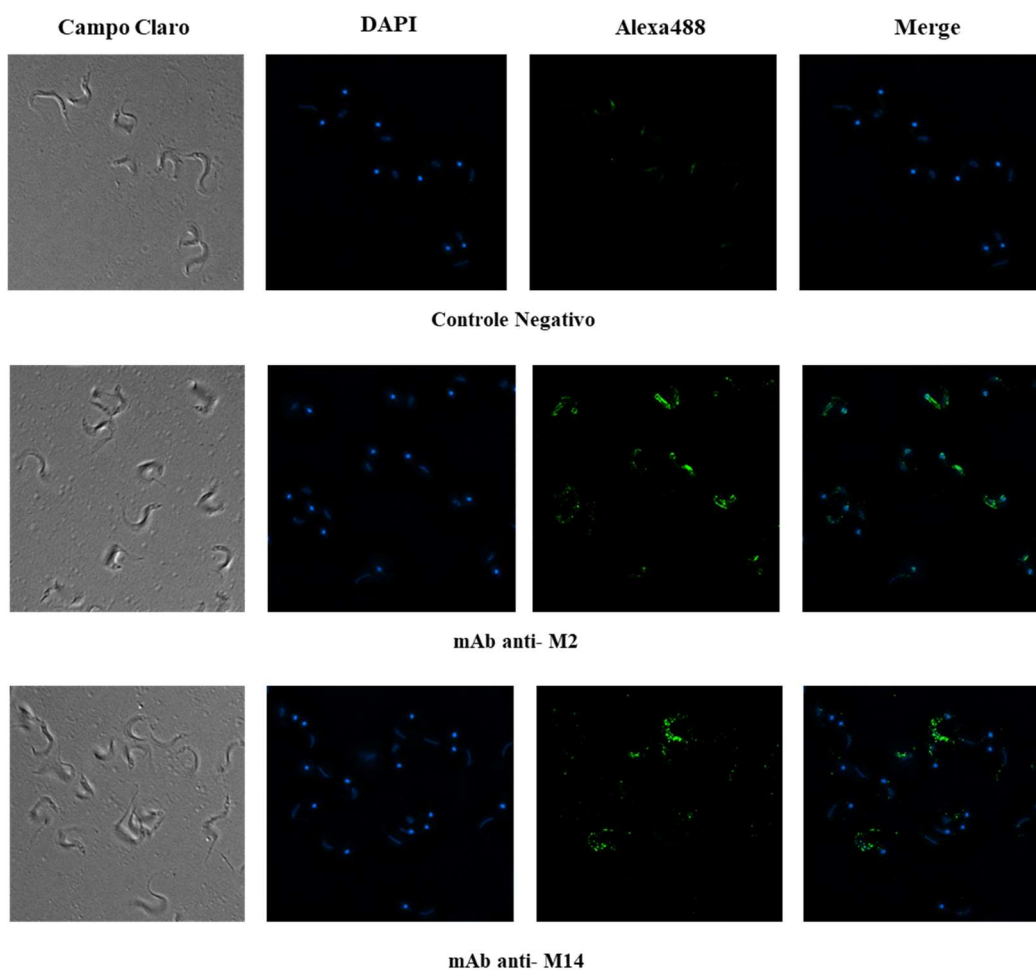
**Figura 22: Mapeamento de peptídeos de MASP reconhecidos pelos respectivos mAbs.** Ensaio de imunoblot utilizando membranas de celulose contendo os peptídeos que compõem as proteínas de MASP M2(blue), M14(blue) e M18(blue). As membranas foram incubadas com o sobrenadante de cultura contendo os mAbs anti-MASP (1:1000) correspondente à proteína para a qual elas foram geradas. O anticorpo secundário utilizado foi anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:5000).

### 6.1.10. Imunofluorescência das formas tripomastigotas com mAbs anti-MASP purificados

Para avaliar a marcação dos parasitos de CL Brener de *T. cruzi* com os anticorpos monoclonais anti-MASP, formas tripomastigotas não permeabilizadas e fixadas com paraformaldeído 2% foram analisadas por imunofluorescência utilizando mAbs anti-M2 e anti-M14 purificados. O resultado demonstrou, conforme a marcação com os anticorpos policlonais, que não foram todos os parasitos da população que reagiram com os monoclonais contra essas proteínas. Além disso, também pode-se observar que as



tripomastigotas que expressavam as proteínas M2 e M14 foram marcadas na superfície celular do parasito em forma de pontos e não homogeneamente (Figura 23), assim como também observado com a marcação com os policlonais anti-M2 e anti-M18.

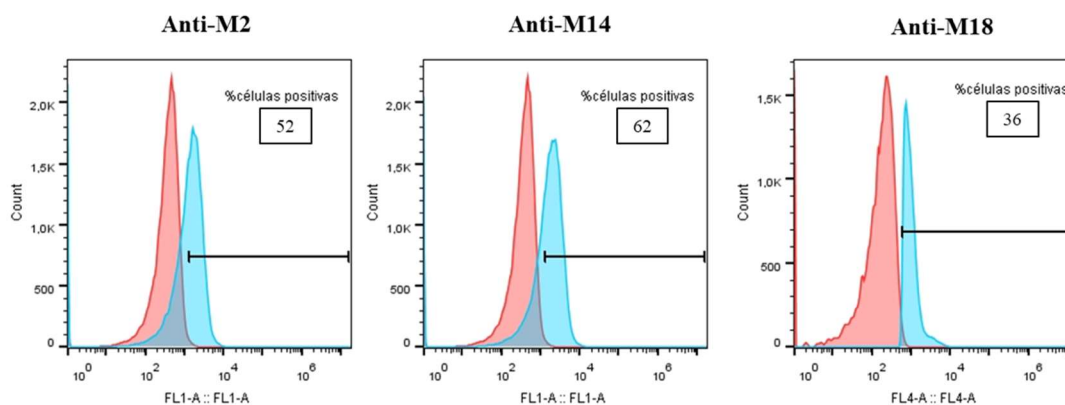


**Figura 23: Marcação das formas tripomastigotas com mAbs anti-MASP purificados.** Formas tripomastigotas do clone CL Brener de *T. cruzi*, não permeabilizadas e fixadas com 2% de paraformaldeído em PBS 1X foram incubadas com anticorpo monoclonal purificado contra as proteínas M2 e M14 (diluição 1:5) e com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 (diluição 1:500). As células também foram coradas com DAPI, marcando o DNA nuclear e o cinetoplasto.

### 6.1.1. Citometria de fluxo das formas tripomastigotas com mAbs anti-MASP purificados e conjugados a fluoróforos

A partir dos sobrenadantes de cultura, contendo os mAbs anti-MASP, foram purificadas IgG contra às proteínas de MASP para as quais os anticorpos foram gerados. Os mAbs purificados anti-M2 e anti-M14 foram marcados com Alexa Fluor 488 e o mAb anti-M18 foi marcado com Alexa Fluor 647. Para avaliar a marcação destes anticorpos monoclonais, tripomastigotas do clone CL Brener de *T. cruzi* foram incubadas com mAb

anti-MASP e as análises feitas por citometria de fluxo. Como pode ser observado na Figura 24, todos os mAbs conjugados marcaram uma parte da população de tripomastigotas, no entanto a porcentagem de marcação dos diferentes anticorpos foi variada. O mAb anti-M2 AF488 marcou 52% da população, o anti-M14 AF488 62%, enquanto o anti-M18 AF 647 marcou 36% da população de parasitos.

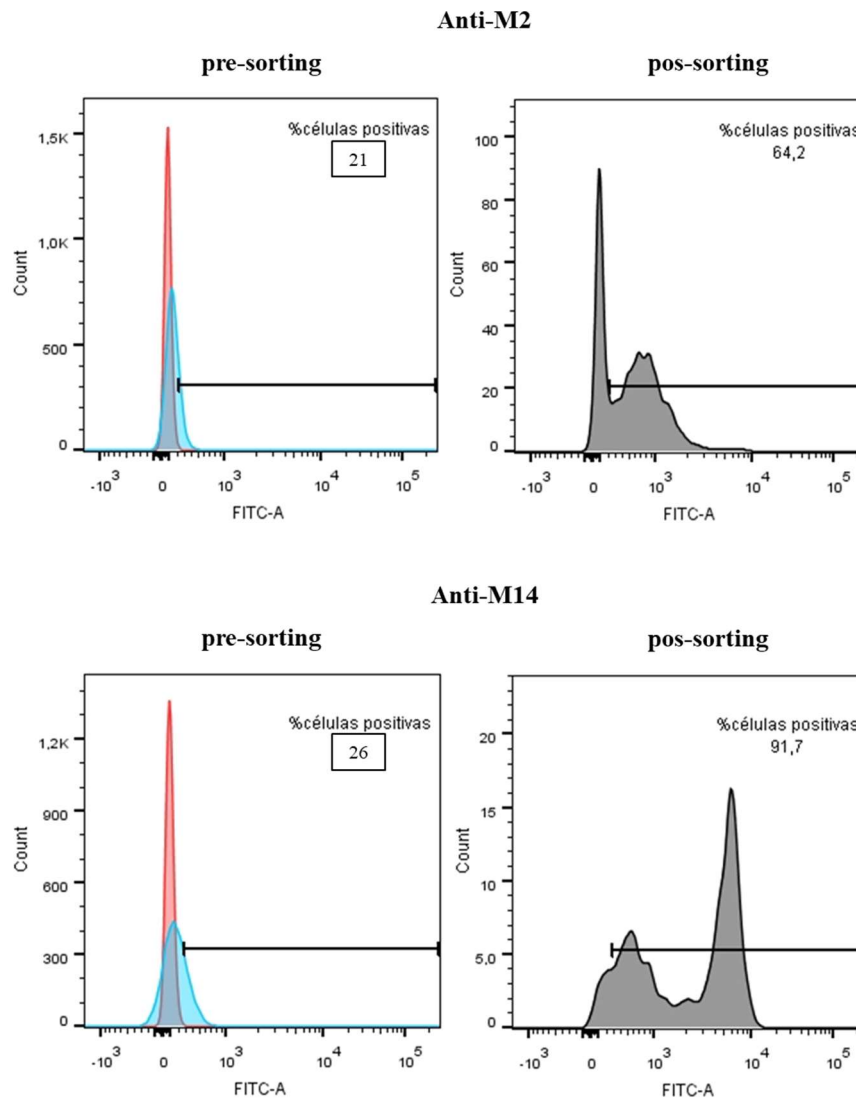


**Figura 24: Marcação das formas tripomastigotas com mAbs anti-MASP purificados e conjugados a diferentes fluoróforos.** Formas tripomastigotas do clone CL Brener de *T. cruzi* foram incubadas com anticorpos monoclonais purificados conjugados a AF488 (diluição 1:100) contra as proteínas M2 e M14 e com anticorpo monoclonal purificado conjugado a AF647 (1:100) contra a proteína M18. As análises foram realizadas por citometria de fluxo, no histograma em vermelho está representada a população incubada com RPMI2%SFB, como controle negativo, e em azul está representada a população de parasitos incubados com mAb anti-MASP. O percentual de células marcadas com cada anticorpo e o *cutoff*, que foi delimitado a partir do ponto em que a população de tripomastigotas incubadas com apenas meio RPMI2%SFB (controle negativo) não apresentou marcação, estão indicados em cada gráfico.

#### 6.1.11. Enriquecimento de uma população de tripomastigotas reconhecidas pelos mAbs anti-MASP

Para investigar o possível papel de MASP na infectividade de *T. cruzi*, uma população enriquecida de parasitos reconhecida pelos respectivos anticorpos monoclonais foi utilizada em infecções experimentais em modelo murino. Para obter a população enriquecida de parasitos expressando MASP2 e MASP14, tripomastigotas do clone CL Brener foram incubadas com os mAbs anti-M2 e anti-M14 conjugados a Alexa Fluor 488 e submetidas a um sorting celular utilizando citômetro de fluxo FACS Aria (BD Biosciences). Os resultados obtidos demonstraram que após o *sorting* utilizando o mAb anti-M2 AF488, foi possível obter uma população com 64% de parasitos marcados, havendo um enriquecimento de 43% da população expressando a MASP M2. No enriquecimento usando o mAb anti-M14 AF488, houve um enriquecimento de 65%, com uma população final de 91% de tripomastigotas marcadas. Estas populações de parasitos

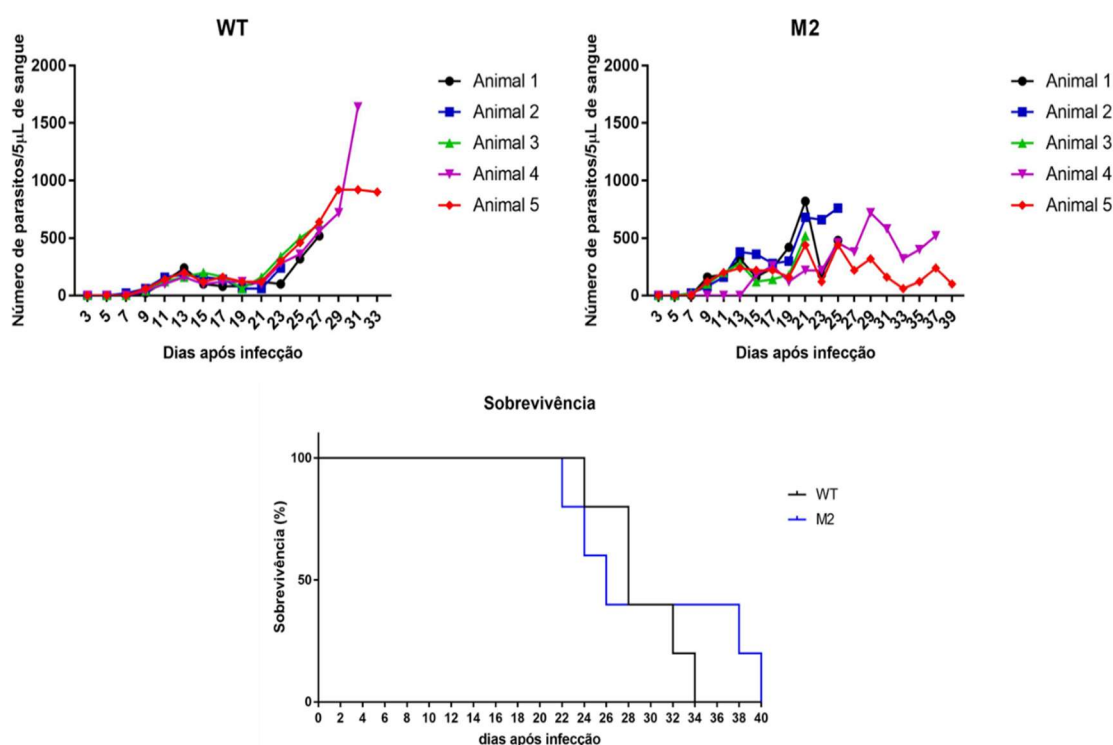
enriquecidas foram posteriormente utilizadas na infecção experimental de camundongos (Figura 25).



**Figura 25: Enriquecimento de uma população de tripomastigotas utilizando mAbs anti-MASP AF488.** Formas tripomastigotas do clone CL Brener de *T. cruzi* foram incubadas com anticorpos monoclonais purificados e conjugados a Alexa Fluor 488 (diluição 1:100) contra as proteínas M2 e M14. O sorting de células marcadas com cada um dos anticorpos foi feito por citometria de fluxo. No histograma em vermelho está representada a população incubada com RPMI2%SFB, como controle negativo, e em azul a população de parasitos incubados com mAb anti-MASP. À esquerda estão os gráficos representando a população pré-sorting. E à direita a população pós-sorting. O percentual de células marcadas com cada anticorpo e o *cutoff*, que foi delimitado a partir do ponto em que a população de tripomastigotas incubadas com apenas meio RPMI2%SFB (controle negativo) não apresentou marcação, estão indicados em cada gráfico.

### 6.1.12. Avaliação do papel de proteínas MASP na infectividade de *T. cruzi* através de ensaios de infecção *in vivo*

O objetivo deste experimento foi avaliar o impacto da infecção *in vivo* de camundongos C57BL/6 com tripomastigotas enriquecidos expressando as proteínas MASP M2 e M14, quando comparado à infecção com tripomastigotas não enriquecidos. No primeiro ensaio foram infectados dois grupos de animais com duas populações distintas de tripomastigotas: (i) derivada de cultura WT (*wild type*) e (ii) enriquecida a partir do *sorting* utilizando mAb anti-M2 AF488.

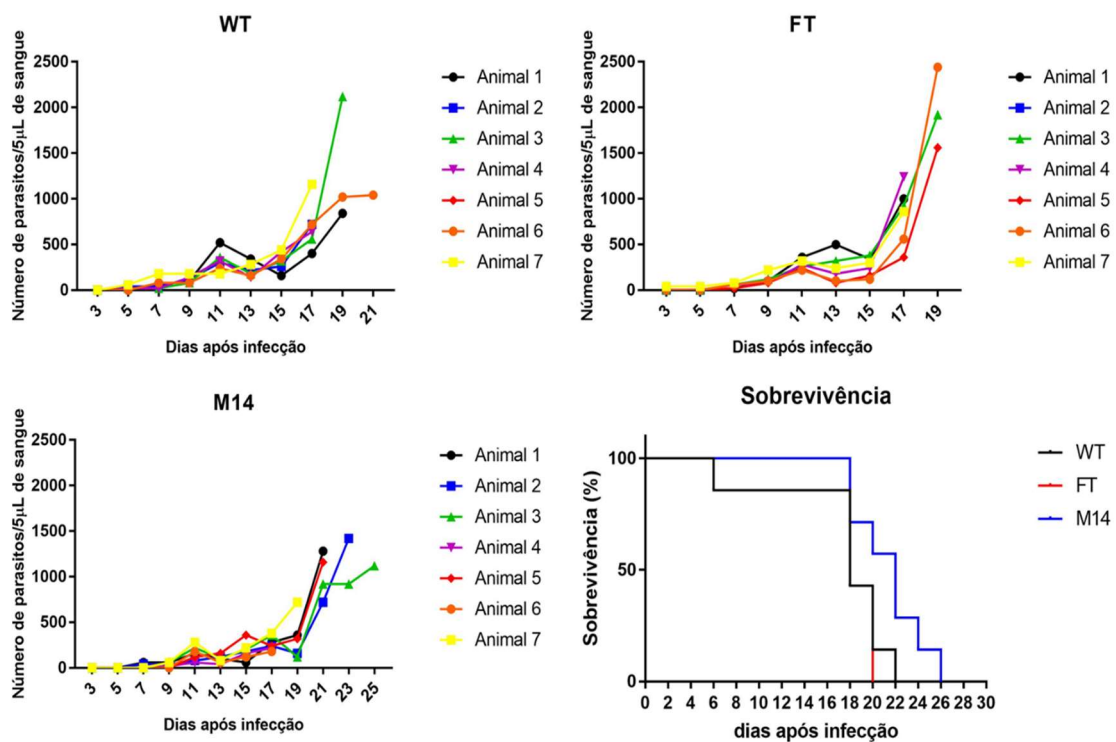


**Figura 26: Curva de parasitemia e sobrevivência de camundongos infectados com uma população de parasitos de *T. cruzi* enriquecida para expressão de M2.** Os animais foram infectados com 500 formas tripomastigotas do clone CL Brener de *T. cruzi*. Na parte superior da figura, estão as curvas de parasitemia do grupo infectado com parasitos de uma população WT e do grupo infectado com parasitos de uma população enriquecida para expressão da proteína MASP M2, utilizando mAb anti-M2 AF488 (M2). Na parte inferior está o gráfico com a representação da taxa de sobrevivência dos dois grupos (WT e M2).

Os resultados das curvas de parasitemia apresentaram um perfil bastante distinto entre o grupo WT e o grupo M2 ao longo da infecção. No grupo M2, os picos de parasitemia oscilaram mais ao longo do tempo do que no grupo WT que, como esperado na infecção por CL Brener, apresentou um pequeno pico por volta do 13º dia e depois um pico maior a partir do 23º dia que levou à morte dos animais (Figura 26). Esta oscilação da parasitemia, que ocorreu no grupo M2, precisa ser melhor investigada, mas os resultados deste experimento sugerem que a infecção de camundongos com uma

população de tripomastigotas de *T. cruzi* mais homogênea (M2) para expressão de um membro específico de MASP gera um controle da infecção diferente por parte do hospedeiro, daquele gerado pela infecção de uma população mais heterogênea (WT).

Um segundo ensaio semelhante ao anterior foi realizado, porém neste foi utilizado o mAb anti-M14 AF488 para o enriquecimento da população de tripomastigotas de *T. cruzi*. Diferentemente do outro ensaio, neste, três grupos de animais foram infectados com três populações distintas de tripomastigotas: (i) derivada de cultura WT (*wild type*); (ii) enriquecida utilizando mAb anti-M14 AF488 a partir do *sorting*; e (iii) população não selecionada no *sorting* FT (*flow through*).



**Figura 27: Curva de parasitemia e sobrevivência de camundongos infectados com uma população de parasitos de *T. cruzi* enriquecida para expressão de M14.** Os animais foram infectados com 500 formas tripomastigotas do clone CL Brener de *T. cruzi*. Na parte superior da figura, estão as curvas de parasitemia do grupo infectado com parasitos de uma população WT e do grupo infectado com parasitos de uma população não selecionada no *sorting* FT. Na parte inferior, estão os gráficos da curva de parasitemia do grupo infectado com uma população enriquecida para expressão da proteína MASP M14 utilizando mAb anti-M14 AF488. E o gráfico com a representação da taxa de sobrevivência dos três grupos (WT, FT e M14).

Neste experimento, os resultados das curvas de parasitemia entre os grupos controles, WT e FT, apresentaram um perfil bastante semelhante ao longo da infecção. Nestes grupos ocorreu um pequeno pico por volta do 11º dia e depois um pico maior a partir do 15º dia que levou à morte dos animais. Já no grupo M14, os animais

apresentaram uma parasitemia menor que os grupos controles, não ocorreu um pico inicial evidente por volta do 11º dia e ainda houve um atraso no aumento da parasitemia, que se iniciou apenas com 19 dias após a infecção, levando à morte dos animais (Figura 27). Esta diferença entre a parasitemia dos grupos, WT e FT, e do grupo M14, indica um controle melhor da infecção pelo hospedeiro quando esta é feita com uma população de tripomastigotas de *T. cruzi* mais homogênea para expressão da proteína de MASP M14.

## 7. CAPÍTULO 03:

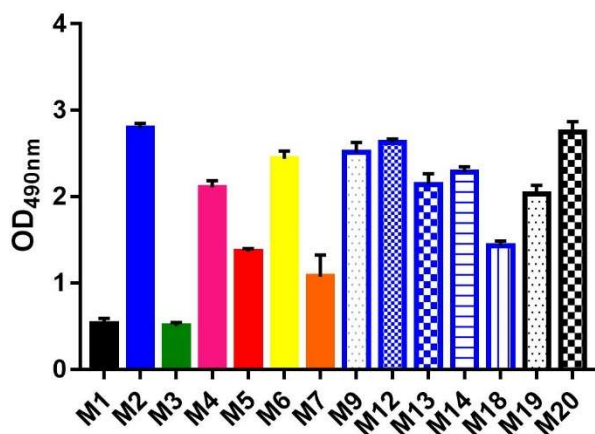
### **Investigação do papel da família multigênica MASP na invasão de célula hospedeira por *T. cruzi***

Uma das hipóteses formuladas pelo nosso grupo é que MASP possa participar de mecanismos associados à capacidade de *T. cruzi* infectar e/ou sobreviver em vários tipos de células hospedeiras. Essa hipótese é baseada no grande repertório de diferentes peptídeos derivados da família MASP, e ao fato de que as proteínas MASPs se encontram na superfície celular das formas tripomastigotas infectantes de *T. cruzi*. Neste sentido, para começar elucidar esta questão, decidimos investigar se membros da família MASP estariam envolvidos em mecanismos de invasão de células hospedeiras.

## 7.1. Resultados

### 7.1.1. Capacidade de ligação das proteínas recombinantes MASP a mioblasto

Para iniciar a investigação sobre a participação de MASP na invasão de células hospedeiras de *T. cruzi*, avaliamos a capacidade de proteínas MASP recombinantes se ligarem à superfície das células L6, mioblasto de rato. As células L6, imobilizadas no fundo de placas de cultura de 96 poços, foram incubadas com 20µg/mL de cada proteína MASP recombinante: M1(Black), M2(Blue), M3 (dark green), M4(Magenta), M5(Red), M6(Orange-1), M7(Orange-2), M9(Blue), M12(Blue), M13(Blue), M14(Blue), M18(Blue), M19(Black) e M20(Black). A ligação foi detectada usando anticorpos policlonais contra MASP gerados em camundongos e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase. Como controle, as células L6 foram incubadas com meio RPMI 2% SFB, seguido da incubação com os anticorpos policlonais para cada MASP recombinante. O valor de OD<sub>490nm</sub> do resultado foi normalizado através da diferença entre o valor mensurado nos poços em que as células L6 foram incubadas com as proteínas recombinantes de MASP e o valor dos respectivos poços controles. (Figura 28).



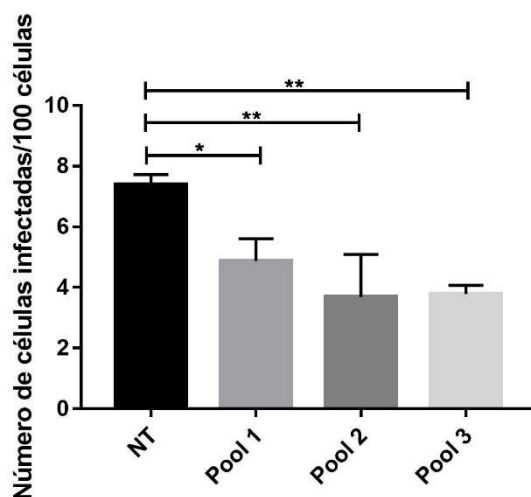
**Figura 28: Ligação de proteínas MASP recombinantes às células L6.** As proteínas MASP recombinantes purificadas M1(Black), M2(Blue), M3 (Dark green), M4(Magenta), M5(Red), M6(Orange-1), M7(Orange-2), M9(Blue), M12(Blue), M13(Blue), M14(Blue), M18(Blue), M19(Black) e M20(Black) foram utilizadas em um ensaio de ligação com células L6 e a detecção foi feita com anticorpos policlonais contra MASP. Como controle, as células L6 foram incubadas com meio RPMI 2% SFB, seguido da incubação com os anticorpos policlonais para cada MASP recombinante. O anticorpo secundário utilizado foi anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase. No eixo das ordenadas estão representadas as absorvâncias em 490nm normalizadas pela diferença entre o valor mensurado nos poços em que as células L6 foram incubadas com as proteínas recombinantes de MASP e o valor dos respectivos poços controles. Cada ponto corresponde à média de triplicata.



As proteínas MASP recombinantes apresentam diferentes capacidades de ligação às células L6. As células incubadas com as MASP M1(Black) e M3(Dark green) apresentaram uma reatividade menor com os anticorpos policlonais anti- MASP. Já as células incubadas com as MASPs M2(Blue), M4(Magenta), M6(Orange-1), M9(Blue), M12(Blue), M13(Blue), M14(Blue), M19(Black) e M20(Black) apresentaram uma reatividade com os anticorpos superior às demais proteínas. Enquanto, as proteínas M5(Red), M7 (Orange-2) e M18(Blue) de MASP apresentaram níveis intermediários de ligação com as células L6.

### **7.1.2. Análise da taxa de invasão de tripomastigotas após o tratamento com as proteínas da família MASP**

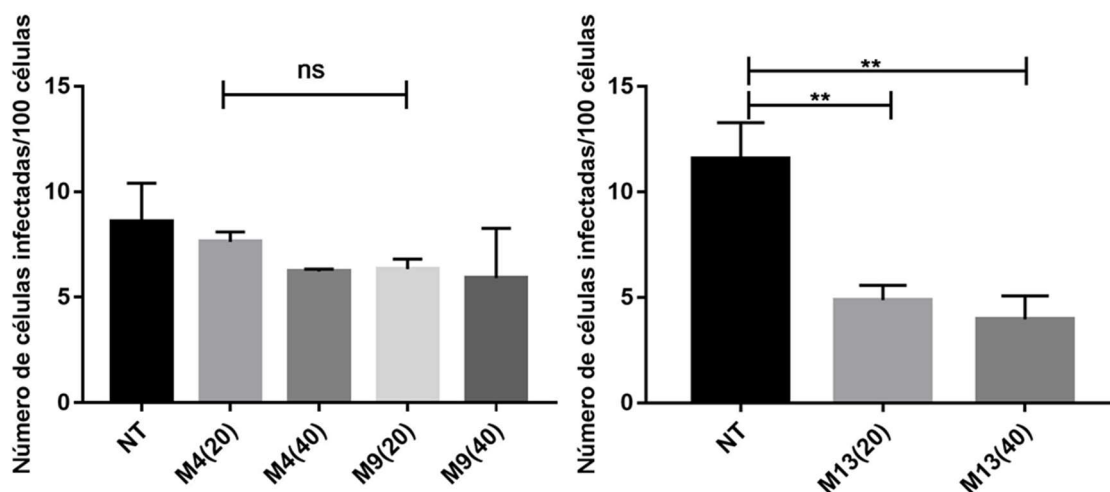
A partir do resultado do ensaio de ligação das proteínas MASP às células L6, decidimos investigar o possível envolvimento das MASP na infecção celular por *T. cruzi*. Para os ensaios de invasão, células L6 foram cultivadas sobre lamínulas de vidro em placa de cultura por 24 horas. Após esse período, as monocamadas de célula L6 foram incubadas com um *pool* de proteínas recombinantes purificadas de MASP. As proteínas MASP foram divididas em 3 grupos de acordo com a intensidade da ligação às células L6 (Figura 28). O *pool* 1 foi composto pelas proteínas: M2, M12, M14 e M20; o *pool* 2 pelas proteínas: M4, M9, M13 e M19; e o *pool* 3 das MASP: M1, M5, M7 e M18. Cada proteína foi adicionada ao *pool* na concentração de 20µg/mL, diluídas em meio RPMI suplementado com 2% de soro fetal bovino. Como controle, células L6 foram incubadas apenas com meio RPMI 2% SFB. Após o tratamento ou não com as proteínas, as células L6 foram expostas às formas tripomastigotas do clone CL Brener de *T. cruzi* (MOI de 40), lavadas, fixadas e processadas para imunofluorescência como descrito na metodologia.



**Figura 29: Ensaio de invasão com parasitos do clone CL Brener de *T. cruzi* após o tratamento com proteínas MASP recombinantes.** Células L6 foram tratadas com *pool* de proteínas recombinantes de MASP (20µg/mL de cada) por 1h antes da infecção com formas tripomastigotas (MOI 40). Para a marcação de parasitos extracelulares, as células foram incubadas com soro de camundongo infectado por *T. cruzi* e anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488. As células também foram coradas com DAPI para marcação de material genético do parasito e do hospedeiro. A taxa de infecção se deu pela contagem de células infectadas por parasitos corados com DAPI não marcados com Alexa Fluor 488. NT= a células não tratadas; P1= células tratadas com o *pool* 1 (M2, M12, M14 e M20); P2= células tratadas com *pool* 2 (M4, M9, M13 e M19); e P3= células tratadas com *pool* 3 (M1, M5, M7 e M18). (Cada ponto corresponde à média de triplicata.  $p < 0,05$ , ANOVA seguido de teste Tukey).

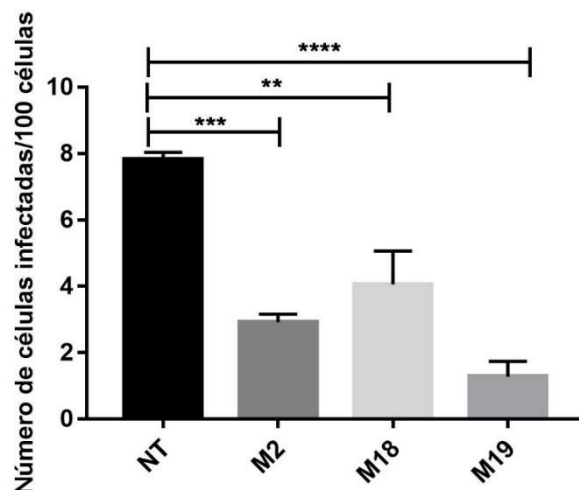
Os resultados revelaram que o tratamento com as proteínas MASP reduziu a taxa de infecção por *T. cruzi*. A incubação com *pool* 2 (M4, M9, M13 e M19) apresentou a maior redução da infecção pelo parasito, reduzindo 62% o número de células infectadas em comparação ao grupo controle. O tratamento com o *pool* 3 (M1, M5, M7 e M18) e *pool* 1 (M2, M12 e M20) reduziram a infecção em 49% e 34%, respectivamente, em relação ao grupo controle (Figura 29).

Como o resultado dos ensaios de invasão pelo *T. cruzi* em células L6 tratadas com o *pool* de proteínas recombinantes de MASP demonstrou a influência destas proteínas na infecção pelo parasito, decidimos testar a atuação das MASPs individualmente. Para tanto, selecionamos as proteínas do *pool* 2, que após serem incubadas com as células L6 reduziram em maior número a internalização das tripomastigotas. Inicialmente, foram testadas a influência das proteínas M4, M9 e M13 em duas concentrações diferentes, 20µg/mL e 40µg/mL, diluídas em meio RPMI suplementado com 2% de soro fetal bovino.



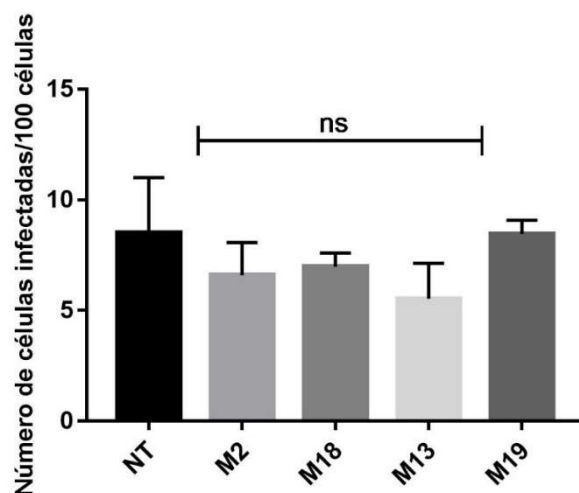
**Figura 30: Ensaio de invasão com parasitos do clone CL Brener de *T. cruzi* após o tratamento com a proteínas MASP recombinantes.** Células L6 foram tratadas com proteínas recombinantes de MASP (20 ou 40 $\mu$ g/mL) por 1h antes da infecção com formas tripomastigotas (MOI 40). Para a marcação de parasitos extracelulares, as células foram incubadas com soro de camundongo infectado por *T. cruzi* e anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488. As células também foram coradas com DAPI para marcação de material genético do parasito e hospedeiro. A taxa de infecção se deu pela contagem de células infectadas por parasitos corados com DAPI não marcados com Alexa Fluor 488. NT= a células não tratadas; M(20)= células tratadas com 20 $\mu$ g/mL das proteínas recombinante M4, M9 ou M13; e M(40)= células tratadas com 40 $\mu$ g/mL das proteínas M4, M9 ou M13. (Cada ponto corresponde à média de triplicata.  $p < 0,05$ , ANOVA seguido de teste Tukey).

Foi possível perceber que o tratamento com a proteína M13 foi capaz de reduzir a invasão de células L6 pelo *T. cruzi* em 57% em relação ao grupo controle, quando utilizado 20 $\mu$ g/mL, e em 67% com o tratamento de 40 $\mu$ g/mL de proteína. Enquanto, o tratamento com as proteínas M4 e M9 de MASP, nas concentrações de 20 $\mu$ g/mL ou 40 $\mu$ g/mL, não apresentou uma redução significativa da invasão de células L6 pelo *T. cruzi* (Figura 30). Em seguida, foi avaliado se o pré-tratamento das células L6 com as proteínas M2, M18 e M19 afetaria a taxa de invasão células. Neste experimento, utilizou-se 20 $\mu$ g/mL das proteínas e observou-se que a taxa de infecção do parasito foi reduzida em 63% após o tratamento com a M2, 49% com a M18 e 84% com a proteína M19, quando comparados ao controle. (Figura 31).



**Figura 31: Ensaio de invasão com parasitos do clone CL Brener de *T. cruzi* após o tratamento com as proteínas MASP recombinantes.** Células L6 foram tratadas com proteínas recombinantes de MASP (20µg/mL) por 1h antes da infecção com formas tripomastigotas (MOI 40). Para a marcação de parasitos extracelulares, as células foram incubadas com soro de camundongo infectado por *T. cruzi* e anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488. As células também foram coradas com DAPI para marcação de material genético do parasito e hospedeiro. A taxa de infecção se deu pela contagem de células infectadas por parasitos corados com DAPI não marcados com Alexa Fluor 488. NT= a células não tratadas e M2, M18 e M19= células tratadas com 20µg/mL da proteína recombinante de MASP. (Cada ponto corresponde à média de triplicata.  $p < 0,05$ , ANOVA seguido de teste Tukey).

Um outro ensaio de invasão também foi realizado, semelhante aos anteriores, com a diferença que o tratamento das células L6 com as proteínas recombinantes de MASP foi simultâneo à infecção com as tripomastigotas do clone CL Brener de *T. cruzi* (MOI de 40). O objetivo do ensaio foi avaliar se a presença das proteínas junto com os parasitos já seria suficiente para influenciar na infecção da célula hospedeira pelo *T. cruzi*. Neste ensaio as células hospedeiras foram tratadas com as proteínas MASP M2, M13, M18 e M19 na concentração de 20µg/mL.



**Figura 32: Ensaio de invasão com parasitos do clone CL Brener de *T. cruzi* simultâneo ao tratamento com as proteínas de MASP recombinantes.** Células L6 foram tratadas com proteínas recombinantes de MASP (20µg/mL) simultaneamente à infecção com formas tripomastigotas (MOI 40). Para a marcação de parasitos extracelulares, as células foram incubadas com soro de camundongo infectado por *T. cruzi* e anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488. As células também foram coradas com DAPI para marcação de material genético do parasito e do hospedeiro. A taxa de infecção se deu pela contagem de células infectadas por parasitos corados com DAPI não marcados com Alexa Fluor 488. NT= células não tratadas e M2, M13, M18 e M19= células tratadas com 20µg/mL de cada proteína recombinante de MASP. (Cada ponto corresponde à média de triplicata.  $p < 0,05$ , ANOVA seguido de teste Tukey).

Os resultados demonstraram que o tratamento simultâneo das células L6 com as proteínas de MASP não afetou a infecção das células hospedeira pelo parasito *T. cruzi*, para nenhum dos tratamentos (Figura 32). O que sugere que o tratamento simultâneo das células com as proteínas MASP e a incubação com os parasitos não é o suficiente para inibir a infecção. Isto, provavelmente, se deve ao fato de que com o tratamento prévio das células por uma hora antes da infecção, as proteínas recombinantes de MASP se ligam aos locais em que o parasito pode se utilizar para realizar a invasão das células L6.

Em conjunto estes dados sugerem que membros da família MASP influenciam na invasão de células hospedeiras pelo *T. cruzi*. Outros experimentos são, entretanto, necessários para confirmar estes resultados, como avaliar se o tratamento prévio dos parasitos com os anticorpos anti-MASP, também afeta a taxa de infecção das células hospedeiras pelo *T. cruzi*. Além disto, seria interessante investigar por quais mecanismos MASP participaria da infecção de células hospedeiras, como capacidade de sinalização de cálcio e recrutamento de lisossomos no sítio da infecção, e se MASP influencia a dinâmica do ciclo intracelular, como o tempo de associação do parasito com os fagolisossomos.

Seria ainda interessante investigar se estes membros de MASP afetam a taxa de invasão em outras linhagens de células hospedeiras.

## 8. DISCUSSÃO

A família MASP de proteínas de superfície de *Trypanosoma cruzi* foi descoberta apenas após o sequenciamento do genoma do clone CL Brener (Najib M El-Sayed et al. 2005). Apesar disto, esta família aparenta ser bastante importante para a biologia do parasito, uma vez que o genoma de CL Brener possui, aproximadamente, 1400 genes de MASP, representando mais de 6% do seu genoma diploide (Najib M El-Sayed et al. 2005). Vários estudos tem contribuído para a caracterização de MASP desde sua descoberta, porém a função desta família de proteínas ainda permanece indeterminada (Bartholomeu et al. 2009; Díaz Lozano et al. 2017; Durante et al. 2017; De Pablos et al. 2011, 2016; dos Santos et al. 2012). MASP é a família proteica mais polimórfica de *T. cruzi* (Freitas 2011) e seus membros são preferencialmente expressos na superfície das formas tripomastigotas infectantes do parasito (Bartholomeu et al. 2009). Estas características sugerem um possível envolvimento dos membros de MASP em mecanismos de interações parasito-hospedeiro. Neste sentido, a hipótese formulada pelo nosso grupo é que MASP possa contribuir para a capacidade de *T. cruzi* invadir e/ou estabelecer infecção produtiva em vários tipos de células hospedeiras e/ou participar de mecanismos de evasão imune do hospedeiro.

### **Evasão do sistema imune**

Para poder compreender melhor como se dá o reconhecimento das proteínas MASP pelo sistema imune do hospedeiro, o primeiro passo foi a seleção racional de membros para avaliação de reatividade. Para tanto, foi feita uma divisão da família em subgrupos através de similaridade das sequências proteicas, a fim de facilitar a identificação de membros representativos de sua variabilidade. Foram identificados 7 subgrupos dentro da família MASP, denominados M1 a M7.

A partir de todo proteoma predito de *T. cruzi* CL Brener, foi realizada a predição de epítomos de células B utilizando a ferramenta IMMUNORANK desenvolvida pelo nosso grupo (Lobo et al., em preparação), com objetivo de ranquear as proteínas com maior potencial antigênico. Os resultados mostraram que proteínas MASP se encontram no topo do *ranking* de predição de antigenicidade do proteoma de CL Brener, correspondendo a 9 de 10 proteínas do top 10 dos antígenos preditos, 94% do top 100, e mais da metade (64,8%) quando considerado o top 1000. Esta análise também foi feita entre os subgrupos de MASP, que revelou que entre as proteínas mais antigênicas do top

10, a maioria pertence ao subgrupo preto, e que a partir do top 100, as proteínas de MASP mais antigênicas pertencem ao subgrupo azul.

Em seguida, com o objetivo de avaliar o perfil antigênico da família MASP a partir de sua diversidade, um membro representativo mais próximo ao centro de cada subgrupo foi selecionado para ser expresso de maneira heteróloga em bactérias e, após purificação, ser utilizado para avaliação de antigenicidade. Os membros selecionados, as proteínas de MASP M1 (Black), M2 (Blue), M3 (Dark Green), M4 (Magenta), M5 (Red), M6 (Orange 1) e M7 (Orange 2), pertencem ao top 1000 do *ranking* de antígenos preditos, sendo que as proteínas melhor classificadas foram M2, M5 e M1 (Tabela 2).

Após estas avaliações *in silico*, que foram importantes para delimitar os melhores alvos a serem utilizados nos estudos funcionais, decidimos padronizar uma metodologia baseada em citometria de fluxo para as análises de antigenicidade da família MASP. Esta técnica consiste no acoplamento de proteínas recombinantes a diferentes microesferas fluorescentes, que apresenta vantagens sobre outros ensaios sorológicos, como os testes de ELISA. Isto porque utilizando esta metodologia de *beads* acopladas às proteínas é possível realizar ensaios multiplex, que permitem análises simultâneas de diferentes antígenos, além de ser uma técnica baseada em citometria de fluxo, que devido à sua velocidade, precisão e reprodutibilidade, representa um importante avanço para as avaliações sorológicas (Silva et al. 2019; Xavier et al. 2018).

Esta técnica tem sido amplamente utilizada com as mais diversas finalidades. Na literatura é possível encontrar relatos de sua aplicação no aprimoramento e desenvolvimento do diagnóstico sorológico de doenças infecciosas, incluindo a identificação de coinfeções (Andrade et al. 2014; Ghule et al. 2019; Karanikola et al. 2015; de Leeuw et al. 2019; Silva et al. 2019), no aperfeiçoamento de *screening* de bancos de sangue (Xavier et al. 2018), na detecção de biomarcadores no soro (Song et al. 2019), bem como na dosagem de citocinas e quimiocinas (Id et al. 2019; Kashem et al. 2019; Linardi et al. 2019).

No nosso estudo, a metodologia foi padronizada para melhor avaliar o perfil de antigenicidade da família MASP de proteínas, utilizando para isto as proteínas recombinantes M1 a M7 e os anticorpos policlonais gerados contra cada uma delas. Após a confirmação do acoplamento (Figura 7) e padronização dos ensaios uniplex e multiplex (Figura 8), a técnica foi utilizada com soros de camundongos infectados com o clone CL Brener coletados ao longo da fase aguda. Os resultados confirmaram a alta sensibilidade

do método, uma vez que foi possível diferenciar os soros dos animais não infectados, daqueles infectados com apenas 5 dias de infecção para todas as proteínas de MASP utilizadas, tanto no ensaio uniplex quanto no multiplex (Figura 10). Além disso, nos ensaios multiplex foi possível comparar a reatividade de cada uma das proteínas M1 a M7 com a mesma amostra de soro de forma simultânea. Os dados obtidos demonstraram que as proteínas M1 e M2 são mais antigênicas que as demais testadas, porém todas as MASP avaliadas foram reconhecidas pelos soros agudos dos camundongos infectados. Outra observação feita a partir deste ensaio foi a variação no reconhecimento das proteínas MASP ao longo da fase aguda, em que há um aumento na reatividade com os soros dos dias que antecedem ao pico de parasitemia do animal, na fase em que os parasitos estão se multiplicando, aumentando assim a exposição das proteínas MASP ao sistema imune do hospedeiro (Figura 11).

É necessário agora tentar entender melhor se as diferenças de antigenicidade entre as proteínas de MASP estariam relacionadas a uma estratégia de sobrevivência do parasito, em que os indivíduos que expressam os membros de MASP mais antigênicos seriam eliminados pelo sistema imune do hospedeiro, e os parasitos que expressam variantes diferentes sobreviveriam em detrimento daqueles. Uma de nossas hipóteses é que a co-expressão de vários membros polimórficos de MASP na população de parasitos poderia levar ao desenvolvimento de uma resposta imune espúria com produção de anticorpos não neutralizantes, retardando assim a produção de anticorpos de alta afinidade, facilitando a sobrevivência do parasito. Este mecanismo de evasão do sistema imune já foi proposto para a família das trans-sialidases (TS). Muitos dos genes de TS parecem ser expressos simultaneamente, sobrecarregando o sistema imunológico com uma extensa e complexa rede de antígenos. A imunodominância das proteínas TS foca a resposta de células T CD8<sup>+</sup> em um conjunto de epítomos variáveis, que também não são normalmente apresentados até o final do processo de infecção da célula hospedeira pelo *T. cruzi* (Tarleton 2015). Além disto, também foi demonstrado que estes antígenos de TS são formados por epítomos de células B que apresentam reações cruzadas entre si e interagem com as repetições imunodominantes de SAPA, um componente altamente imunogênico da enzima TS, retardando a neutralização desta proteína (Pitcovsky et al. 2002).



Com o estudo do transcriptoma do clone CL Brener de *T. cruzi*, foi possível avaliar o nível de expressão de membros da família MASP em diferentes fases do ciclo de vida do parasito (Belew et al. 2017). Como já tinha sido observado em trabalhos anteriores (Bartholomeu et al. 2009), este estudo mostrou que há uma maior expressão de genes de MASP na forma tripomastigota extracelular do parasito (Figura 12). A análise feita sobre o nível de expressão das proteínas de MASP nesta biblioteca demonstrou que a maioria dos membros mais expressos pertencem ao subgrupo azul (Figura 13). Interessantemente, membros deste subgrupo também se encontram entre os mais antigênicos de acordo com imunorranqueamento feito utilizando proteoma predito total de *T. cruzi* CL Brener, considerando os top100 e os top 1000 membros (Figura 6).

A partir destes dados, observamos também que os membros de MASP escolhidos inicialmente como representativos da diversidade da família, as proteínas M1 a M7, não se encontravam entre os membros mais expressos de MASP na biblioteca de tripomastigotas do sobrenadante de cultura (Belew et al. 2017). Nossos ensaios de citometria de fluxo e imunofluorescência com anticorpos policlonais gerados contra M1 a M7 corroboraram estes dados, uma vez que apresentaram uma baixa taxa de marcação de tripomastigotas na população (dados não mostrados). Assim, com os dados de RNA-seq obtidos, decidimos selecionar novos membros de MASP que apresentavam os maiores níveis de expressão na forma tripomastigota do parasito. Neste sentido, foram selecionados os seguintes genes para o estudo: MASP 11- TcCLB.509979.270 (blue), MASP 12- TcCLB.509977.30 (blue), MASP 13- TcCLB.509977.80 (blue) e MASP 14- TcCLB.510037.10 (blue), que se encontram entre os 10 genes de MASP mais expressos na forma tripomastigota do sobrenadante de cultura (Belew et al. 2017). Estes genes foram amplificados por PCR utilizando *primers* específicos e o DNA genômico do parasito. Como todos estes membros pertencem ao mesmo subgrupo azul, e suas sequências são bastante semelhantes, para confirmar a identidade dos genes, os produtos das reações de PCR foram clonados em vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega) e enviados para sequenciamento. O resultado do sequenciamento revelou que os produtos clonados correspondiam aos genes MASP 9- TcCLB.509973.10 (blue), MASP 12- TcCLB.509977.30 (blue), MASP 13- TcCLB.509977.80 (blue) e MASP 14- TcCLB.510037.10 (blue) que foram então incorporados ao trabalho por estarem todos entre os dez genes mais expressos de acordo com o transcriptoma (Tabela 3).

Após a seleção destes genes baseada nos dados de RNA-seq, avaliamos a antigenicidade destes membros utilizando a ferramenta IMMUNORANK (Lobo et al., em preparação), e constatamos que estas proteínas não se encontravam bem posicionadas no imunorranqueamento (Tabela 3). Desta forma, decidimos fazer uma segunda seleção de membros de MASP para o estudo, só que desta vez levando em consideração também os resultados do *ranking* de antigenicidade. O critério utilizado para esta nova seleção foi que a proteína de MASP a ser selecionada precisava estar entre as 100 mais expressa de acordo com o transcriptoma, e entre as 100 mais antigênicas a partir dos dados obtidos do IMMUNORANK. Neste contexto, os seguintes genes também foram selecionados: MASP 17 - TcCLB.508541.90 (blue), MASP 18 -TcCLB.506321.120 (blue), MASP 19 -TcCLB.506955.99 (black) e MASP 20 -TcCLB.508539.110 (black). Após o mesmo procedimento descrito anteriormente, o resultado do sequenciamento revelou que foram amplificados os genes MASP 18 -TcCLB.506321.120 (blue), MASP 19 - TcCLB.506955.99 (black) e MASP 20 -TcCLB.508539.110 (black), que foram utilizados no estudo (Tabela3).

Posteriormente à seleção dos novos membros de MASP a serem utilizados no estudo, passamos para etapa de expressão heteróloga das regiões centrais hipervariáveis das proteínas MASPs selecionadas. As proteínas recombinantes M9(blue), M12(blue), M13(blue), M14(blue), M18(blue), M19(black) e M20(black) foram expressas em bactérias BL-21 Star. Ao visualizar a expressão destas proteínas no gel SDS-PAGE, foi possível observar que a maioria não apresentava o seu peso molecular esperado no gel com base em sua sequência primária, e sim um tamanho próximo ao dobro de suas massas preditas (Figura 15). O DNA plasmidial contendo os genes que codificam para as proteínas de MASP clonados no vetor pET-28a-TEV foram sequenciados e as identidades genéticas novamente confirmadas.

Esta migração anômala das proteínas de MASP em géis de poliacrilamida contendo SDS, que foi observada para todos os membros expressos até o momento em nosso laboratório, incluindo membros cuja identidade já foi confirmada por espectrometria de massa, pode ter como causa a quantidade de SDS que se liga à proteína. Já foi mostrado em proteínas de membrana que dependendo da conformação dos grampos presentes, eles podem ligar mais ou menos ao SDS, afetando assim a mobilidade dessas proteínas no gel (Rath et al. 2009). Vale ressaltar que as proteínas purificadas de MASP M1 (Black) e M2 (Blue) foram submetidas à espectrometria de massa (MS) e o resultado

da análise confirmou a identidade destas proteínas. As análises por MS das outras proteínas de MASP utilizadas neste trabalho já estão em andamento.

Em seguida, partimos para a avaliação da antigenicidade dos membros de MASP M9(blue), M12(blue), M13(blue), M18(blue), M19(black) e M20(black) ao longo da infecção pelo *T. cruzi*. Para tanto, foram realizados ensaios de ELISA com soros de animais infectados coletados ao longo da fase aguda, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias após a infecção, assim como soros de animais infectados coletados na fase crônica, após 4 meses da infecção. No primeiro ensaio, foram utilizadas as proteínas de MASP M9, M12, M13, M18, M19 e M20 e o *pool* de soros de animais infectados de fase aguda. Esta avaliação demonstrou que estes membros de MASP são bem reconhecidos por estes soros de animais, sendo que há um aumento na reatividade destas proteínas e os soros de 20 dias após a infecção (Figura 17). No ensaio seguinte, foram utilizados os soros individuais de animais infectados, coletados na fase aguda e crônica da infecção, e as proteínas M2 e M18. Os resultados demonstraram que as proteínas de MASP M2 e M18 foram reconhecidas tanto pelos soros de fase aguda quanto pelos soros de fase crônica dos animais infectados, no entanto, a intensidade da reação foi distinta, sendo que os valores de OD obtidos na fase aguda foram superiores aos de fase crônica (Figura 18). Este resultado sugere que possivelmente a resposta imune anti-MASP não foi capaz de induzir uma mudança intensa do isotipo IgM para IgG, como também a produção de alta afinidade e a produção de células B de memória. Entretanto, estudos adicionais são necessários para confirmar estas hipóteses.

Uma explicação que já foi considerada para esta diferença, é o fato de MASP ser preferencialmente expressas nas formas tripomastigotas do parasito (Bartholomeu et al. 2009), que são encontradas em grande quantidade durante a fase aguda da infecção. Já na fase crônica, a parasitemia é altamente reduzida e um baixo número de tripomastigotas são detectadas na circulação, sendo que o parasito é mais frequentemente encontrado em ninhos de amastigotas nos tecidos. Entretanto, Balouz et al. em 2015 demonstraram que antígenos derivados de TSSA (*Trypomastigote Small Surface Antigen*), um polipeptídeo semelhante às mucinas de *T. cruzi* que tem sua expressão restrita à superfície de tripomastigotas, são fortemente reconhecidos por soros de pacientes chagásicos de fase crônica, tendo sido considerados bons candidatos para o sorodiagnóstico da doença de Chagas (Balouz et al. 2015; Buscaglia et al. 2002). O mesmo grupo de pesquisa usou esta mesma estratégia de mapeamento e seleção de peptídeos antigênicos derivados de TSSA,

para peptídeos de MASP (Balouz et al. 2015; Carmona et al. 2015; Durante et al. 2017). Porém, os pesquisadores observaram que os motivos de MASP testados não foram reconhecidos pela grande maioria das amostras de soros chagásicos crônicos utilizadas no trabalho. E ao contrário da TSSA, o desempenho geral de MASP não foi considerado bom o suficiente para diagnóstico sorológico (Durante et al. 2017). Desta forma, apesar deste trabalho ter sido realizado com amostras humanas, também foi observada a baixa reatividade de MASP com soros de fase crônica da infecção pelo *T. cruzi*, reforçando a hipótese da não soroconversão de IgG anti-MASP.

Uma possível explicação para a presença de anticorpos anti-MASPs apenas na fase aguda da infecção pode ser a capacidade destas proteínas ativarem células B de maneira policlonal, promovendo uma intensa produção de anticorpos IgM de baixa afinidade sem o auxílio de células T CD4<sup>+</sup>, semelhante ao que já foi observado para transialidasas (Gao, Wortis, and Pereira 2002; revisado por Cardoso, Reis-Cunha, and Bartholomeu 2016). Sabe-se que a participação das células T CD4<sup>+</sup> é fundamental para que haja a expansão clonal, formação de células B de memória e maturação da afinidade dos anticorpos produzidos pelas células B. Além disso, o ambiente inflamatório com citocinas como IL-12, IL-4 ou IL-6 derivado da ativação de células T CD4<sup>+</sup> é essencial para que haja a mudança de isotipo do anticorpo, como a troca de IgM para IgG (Acevedo, Girard, and Gómez 2018).

Após esta etapa de avaliações, decidimos analisar a expressão das proteínas de MASP em células individuais de tripomastigotas de *T. cruzi*. Para tanto, foram utilizados os seguintes membros da família já expressos em nosso laboratório, M1 (Black), M2 (Blue), M3 (Dark Green), M4 (Magenta), M5 (Red), M6 (Orange 1), M7 (Orange 2), M9(blue), M12(blue), M13(blue), M18(blue), M19(black) e M20(black), e os anticorpos policlonais gerados em camundongos contra cada uma destas proteínas. Os resultados de ensaios de citometria de fluxo, com tripomastigotas não permeabilizadas, demonstraram que a marcação dos parasitos com os diferentes anticorpos é bastante variada na população. Os que apresentaram maior percentual de marcação foram o anti-M2 com 77% de marcação, anti-M5 com 61% e o anti-M18 com 43% de parasitos marcados. Sendo que a maioria dos anticorpos marcou menos de 30% da população de tripomastigotas, e alguns, como anti-M9, anti-M13, anti-M19 e anti-M20, marcaram menos de 5% de parasitos (Figura 19). Os dados indicam que a expressão das diferentes MASP é limitada a um número restrito de tripomastigotas da população, e apesar do

reconhecimento cruzado entre os anticorpos (Figura 21), estes dados são consistentes com a provável co-expressão de vários membros da família na população de parasitos. A expressão concomitante de múltiplas variantes de MASP na população de tripomastigotas já foi extensamente demonstrada *in vitro* e em modelo experimental murino (Atwood et al. 2005; Bartholomeu et al. 2009; dos Santos et al. 2012; Seco-Hidalgo, De Pablos, and Osuna 2015). É interessante notar também, que os anticorpos que apresentaram o maior percentual de tripomastigotas marcadas na população, não foram aqueles gerados contra as proteínas selecionadas pelo critério de expressão baseado nos dados de RNA-seq. Como os parasitos utilizados no estudo do transcriptoma de CL Brener foram obtidos a partir de células HFF, um fibroblasto humano, e as tripomastigotas não permeabilizadas para os ensaios de citometria de fluxo foram cultivadas em células L6, mioblastos de rato, é possível que o nível de expressão de diferentes membros de MASP pelo parasito esteja relacionado ao tipo celular de infecção. Entretanto, é possível também que não haja uma correlação direta entre os dados de expressão de mRNA e os níveis proteicos correspondentes. Maiores investigações são necessárias para avaliar esta questão.

Em seguida, para observar o padrão de marcação dos parasitos de CL Brener de *T. cruzi* com os anticorpos anti-MASP, tripomastigotas não permeabilizadas foram analisadas por imunofluorescência utilizando anticorpos policlonais anti-M2 e anti-M18, que apresentaram maior percentual de marcação nos ensaios de citometria de fluxo. Pelo resultado também foi possível observar que a expressão das MASP M2(blue) e M18(blue) é limitada a um subgrupo de parasitos da população, já que nem todos foram marcados com os anticorpos policlonais. Além disto, neste experimento podemos verificar que há diferenças na intensidade de marcação dos anticorpos entre os parasitos marcados, o que explica o fato de não ocorrer uma separação evidente entre uma população negativa e positiva nos ensaios de citometria de fluxo. Possivelmente, isto acontece devido ao intenso polimorfismo e compartilhamento de epítomos que ocorre entre os membros de MASP, e assim os anticorpos reconhecem várias proteínas MASP, porém com intensidades diferentes. Somando-se a isto, pode-se observar nos resultados de imunofluorescência que as tripomastigotas que expressavam as proteínas M2(blue) e M18(blue) foram marcadas na superfície celular do parasito em forma de pontos e não homogeneamente (Figura 20). Este padrão de marcação pontilhado já foi observado para várias outras proteínas de superfície de tripomastigotas de *T. cruzi*, incluindo mucinas, TSSA, trans-sialidases e TcTASV-C, uma família de proteínas de *T. cruzi* que também é

predominantemente expressa na forma tripomastigota (Bernabó et al. 2013; Cámara et al. 2017; Lantos et al. 2016). Lantos et al. 2016 relataram que proteínas de membrana incluindo TS e mucinas são distribuídas na superfície de *T. cruzi* em diferentes microdomínios de membrana altamente estáveis. A partir dos resultados, que indicaram a existência de *lipid rafts* em tripomastigotas de *T. cruzi*, foram realizadas análises de espectrometria de massa para determinar a composição destes microdomínios. Dentre as proteínas de membrana mais representativas identificadas estavam presentes dois membros da família MASP. Os autores especularam que, em *T. cruzi*, estas jangadas lipídicas podem constituir um princípio organizador, pelo qual as proteínas são especificamente segregadas em determinadas áreas da superfície, como demonstrado em células mamárias (Levental, Grzybek, and Simons 2011). Além disto, os autores destacam a possível relevância que a compartimentalização da membrana pode ter na biologia do parasito, uma vez que a distribuição espacial poderia estar associada às funções das proteínas (Lantos et al. 2016).

Após os estudos feitos utilizando anticorpos policlonais anti-MASP, que apresentaram reconhecimento cruzado entre as várias proteínas de MASP, devido ao compartilhamento de epítomos que existe entre os membros da família (Bartholomeu et al. 2009; Najib M El-Sayed et al. 2005) (Figura 21), decidimos produzir anticorpos monoclonais. Assim, foram gerados anticorpos monoclonais (mAb) anti-MASP 2, 14 e 18, selecionados pelo perfil de expressão e antigenicidade. Foi então realizado o mapeamento de epítomos lineares das sequências proteicas para as quais foram gerados os mAbs anti-MASP. Os resultados demonstraram que os sobrenadantes de cultura contendo os mAb anti-MASP reconheceram peptídeos das proteínas de MASP contra a qual eles foram gerados (Figura 22). Porém, apenas o mAb anti-M2 reconheceu spots com uma maior intensidade, isto possivelmente ocorre porque os mAb anti-M14 e anti-M18 devem reconhecer epítomos conformacionais das proteínas.

Os anticorpos monoclonais anti-MASP também foram testados através de ensaios de imunofluorescência com formas tripomastigotas não permeabilizadas. Nestes experimentos foram utilizados os mAb anti-M2 e anti-M14. Conforme visto anteriormente com os anticorpos policlonais, não foram todos os parasitos da população que foram marcados. Além disto, também pôde-se observar a marcação pontilhada destes monoclonais na superfície das tripomastigotas que expressavam as proteínas M2 e M14 (Figura 23), assim como ocorreu com a marcação dos policlonais anti-M2 e anti-M18.

Após os testes realizados, os anticorpos monoclonais gerados foram conjugados a diferentes fluoróforos. Os mAbs purificados anti-M2 e anti-M14 foram marcados com Alexa Fluor 488 e o mAb anti-M18 foi marcado com Alexa Fluor 647. A conjugação dos mAbs aos anticorpos foi avaliada pela marcação de tripomastigotas de *T. cruzi* CL Brener e as análises feitas por citometria de fluxo. Todos os mAbs conjugados marcaram uma parte da população de tripomastigotas, o anti-M2 AF488 marcou 52% da população, o anti-M14 AF488 62%, enquanto o anti-M18 AF 647 marcou 36% da população de parasitos (Figura 24). Este ensaio foi padronizado com a intenção de se investigar o possível papel de MASP na infectividade de *T. cruzi* a partir de uma população enriquecida de parasitos reconhecida pelos anticorpos monoclonais. Para obter as populações enriquecidas foram utilizados os mAbs anti-M2 e anti-M14 conjugados a Alexa Fluor 488 no *sorting* celular utilizando o citometro FACS Aria (BD Biosciences). Inicialmente na população de tripomastigotas, 21% de parasitos foram marcados como mAb anti-MASP2 AF488, após o *sorting*, 64% dos tripomastigotas estavam marcados. Já no enriquecimento usando o mAb anti-M14 AF488, no pré- *sorting* a marcação com este monoclonal foi de 26% de tripomastigotas, e após o *sorting* foi obtida uma população com 92% de parasitos expressando a MASP M14 (Figura 25). A população de células marcadas com cada anticorpo foi delimitada a partir do ponto em que a população de tripomastigotas incubadas com apenas meio RPMI2%SFB não apresentou marcação. Em seguida, estas populações de parasitos enriquecidas foram utilizadas na infecção experimental de camundongos.

O objetivo então do experimento de enriquecimento foi avaliar o impacto da infecção *in vivo* de camundongos C57BL/6 com tripomastigotas enriquecidas expressando as proteínas MASP M2 e M14, quando comparado à infecção com tripomastigotas não enriquecidos. Os resultados das curvas de parasitemia apresentaram um perfil bastante distinto entre o grupo WT (não marcado e não enriquecido) e o grupo enriquecido para M2 ao longo da infecção. No grupo M2, os picos de parasitemia oscilaram mais ao longo do tempo enquanto no grupo WT houve um pequeno pico por volta do 13º dia e depois um pico maior a partir do 23º dia que levou à morte dos animais (Figura 26). No enriquecimento da população de tripomastigotas de *T. cruzi* para a expressão de M14, as curvas de parasitemia entre os grupos controles, WT (não marcado e não enriquecido) e FT (marcado e não enriquecido), apresentaram um perfil bastante semelhante ao longo da infecção, com um pequeno pico por volta do 11º dia e depois um

pico maior a partir do 15º dia que levou à morte dos animais. Já no grupo de tripomastigotas enriquecidos para MASP M14, os animais apresentaram uma parasitemia menor que os grupos controles, não ocorrendo o pico inicial evidente por volta do 11º dia, havendo um atraso no aumento da parasitemia, que se iniciou apenas com 19 dias após a infecção, levando à morte dos animais (Figura 27).

Para estabelecer uma infecção de longo prazo, o *T. cruzi* precisa escapar das respostas do sistema imunológico do hospedeiro vertebrado. Diferentemente de outros patógenos infecciosos que induzem mudanças rápidas na expressão gênica de células hospedeiras infectadas, *T. cruzi* provoca alterações significativas em fibroblastos humanos apenas 24h após a infecção (De Avalos et al. 2002). Após vários ciclos de infecção/proliferação pelo parasito, uma robusta resposta imune anti-*T. cruzi* é desenvolvida pelo hospedeiro, que é capaz de reduzir a parasitemia e o parasitismo tecidual, sem, entretanto, eliminar o parasito. A resposta imunológica retardada e a incapacidade de eliminação do parasito podem estar relacionadas ao grande repertório de proteínas de superfície altamente polimórficas e imunogênicas que são co-expressas por *T. cruzi* (Acevedo et al. 2018; Cardoso et al. 2016; Tarleton 2007). Esta expressão simultânea de diversos antígenos pode fornecer meios de evasão da resposta imune que são distintas da variação antigênica clássica empregada por parasitos como *Trypanosoma brucei* e *Giardia lamblia* (Cross, Wirtz, and Navarro 1998; Mugnier et al. 2016; Pinger, Chowdhury, and Papavasiliou 2017; Prucca and Lujan 2009; Prucca, Rivero, and Luján 2011).

A variação antigênica clássica se caracteriza pela expressão monoalélica de variantes antigênicas idênticas na superfície da maioria das células em uma população de parasitos em dado momento, enquanto um pequeno subconjunto expressa diferentes variantes. A resposta imune atinge os parasitos que expressam a variante mais frequente na população, e não identifica aquelas expressas por um número menor de parasitos. A infecção a longo prazo é alcançada pela variação dos antígenos que são expressos na superfície dos parasitos (McCulloch et al. 2017; Mugnier, Cross, and Papavasiliou 2015; Mugnier et al. 2016; Santos et al. 2018). Fatores genéticos ou epigenéticos levam a esta mudança de expressão de um membro para outro da mesma família, que não é reconhecido pelos anticorpos direcionados à variante anterior, levando a ondas sucessivas de parasitemia e depuração, à medida que novos determinantes antigênicos se espalham



na população de parasitos (Cestari and Stuart 2018; Morrison et al. 2014; Mugnier et al. 2015, 2016; Santos et al. 2018)

Não há evidências, entretanto, de que o *T. cruzi* adote esse tipo de variação antigênica, mas sim que a população de parasitos exponha simultaneamente uma variedade de proteínas de superfície antigênica, tais como as mucinas, as trans-sialidases e as MASP, que são codificadas por famílias multigênicas altamente polimórficas (Bartholomeu et al. 2009; Bayer-Santos et al. 2013; Belew et al. 2017; Brossas et al. 2017; Lantos et al. 2016; dos Santos et al. 2012). A co-expressão deste repertório antigênico diverso provoca uma resposta pelo sistema imunológico do hospedeiro ineficiente no combate da infecção, com a produção de anticorpos não neutralizantes, um mecanismo conhecido como “cortina de fumaça”, que atrasa a produção de anticorpos anti-*T. cruzi* de alta afinidade e ao *priming* eficaz de células de T-CD8<sup>+</sup> (revisado por Cardoso et al. 2016).

A oscilação na parasitemia que ocorreu no grupo M2 (Figura 26) sugere que a infecção de camundongos com uma população de tripomastigotas de *T. cruzi* mais homogênea para expressão de um membro específico de MASP (M2) gera um controle da infecção diferente por parte do hospedeiro, daquele gerado pela infecção de uma população mais heterogênea (WT). A menor parasitemia do grupo M14 (Figura 27), indica que houve um controle melhor da infecção pelo hospedeiro quando esta foi feita com uma população de tripomastigotas mais homogênea para expressão da proteína de MASP M14 do que quando foi utilizada populações mais heterogêneas (WT e FT). Estes resultados sugerem que a expressão mais heterogênea de membros de MASP na população de tripomastigotas de *T. cruzi* pode funcionar como uma “cortina de fumaça”, em que a expressão de diferentes membros ao mesmo tempo dificulta a formação de uma resposta específica contra uma proteína de MASP, facilitando assim a sobrevivência do parasito no hospedeiro. Entretanto, outros experimentos serão realizados para continuar a investigação desta hipótese.

### **Invasão de células hospedeiras**

A capacidade de infectar vários tipos de células hospedeiras é uma estratégia chave de sobrevivência de *T. cruzi*. Uma outra função que especulamos para MASP, é que sua região central altamente variável e grande repertório de peptídeos da família possa contribuir para a capacidade de *T. cruzi* interagir com diferentes receptores de uma pluralidade de tipos de células hospedeiras (Bartholomeu et al. 2009; De Pablos and Osuna 2012; dos Santos et al. 2012). Além disto, a expressão desta família nas formas tripomastigotas infectantes do parasito, nos leva a hipotetizar que algumas proteínas codificadas por esses genes podem estar envolvidas no processo de invasão e/ou no estabelecimento da infecção no interior da célula hospedeira.

A família Trypanosomatidae é composta por diversas espécies de parasitos que possuem estratégias de sobrevivência bem diferentes entre si. Devido às suas posições taxonômicas e estilos vida diversificados, a comparação entre os parasitos é uma oportunidade para identificar as bases genéticas de suas diferentes habilidades para invadir células, evadir respostas imunes do hospedeiro, e causar doenças (Bradwell et al. 2018). Análise genômica de *Leishmania major* Friedlin, *Trypanosoma brucei* TREU 927 e *T. cruzi* CL Brener (Berriman et al. 2005; Najib M El-Sayed et al. 2005; Najib M. El-Sayed et al. 2005; Ivens et al. 2005), estudos de características específicas de linhagem em *T. cruzi* Sylvio X10/1 (TcI) e *T. cruzi* CL Brener (TcVI) (Franzén et al. 2011), e comparações entre o *T. cruzi* e o de *T. cruzi marinkellei* restrito a morcegos, sugerem que muitas diferenças estão associadas à expansão diferencial de famílias multigênicas (Bradwell et al. 2018).

Em um trabalho publicado recentemente, Bradwell et al. 2018 fizeram uma comparação genômica entre *Trypanosoma conorhini*, *Trypanosoma rangeli* e cepas de *Trypanosoma cruzi* de alta e baixa virulência. *T. conorhini* é transmitido nas fezes de seu vetor, o *Triatoma rubrofasciata*, a uma gama restrita de hospedeiros mamíferos, onde causa uma infecção ligeira e transitória, embora também tenha sido relatado que infecta camundongos e primatas não humanos em laboratório (Deane, Deane, and Lourenço-de-Oliveira 1986; Hoare 1972). Em contraste com *T. cruzi* e *T. conorhini*, *T. rangeli* é considerado não patogênico para hospedeiros mamíferos, mas prejudicial aos insetos vetores, especialmente os do gênero *Rhodnius*, sendo transmitido aos mamíferos por inoculação durante a hematofagia. *T. rangeli* apresenta antígenos em comum com *T. cruzi* e também é amplamente distribuído na América Central e do Sul, com uma ampla gama

de hospedeiros mamíferos que inclui humanos (Stoco et al. 2014; Wagner et al. 2013). As duas cepas de *T. cruzi* utilizadas no estudo foram *T. cruzi* G, isolado de um marsupial, que apresenta baixa parasitemia *in vivo* e induz infecção crônica de baixa virulência em camundongos (Yoshida 2006). *T. cruzi* CL foi isolado de um triatomíneo capturado na residência de um chagásico (Vargas, Pedroso, and Zingales 2004), apresenta altas parasitemia e virulência. Os resultados obtidos pelos pesquisadores demonstraram que *T. rangeli* e *T. conorhini* apresentam variações no número de genes que compõem as famílias multigênicas (Bradwell et al. 2018). As análises mostraram que os genes da transialidase (TS) e GP63 estão altamente expandidos em todos os genomas examinados. Uma das maiores diferenças encontradas no número de cópias gênicas entre as espécies foi para a família MASP, que são significativamente menos amplificadas em *T. rangeli* e *T. conorhini* do que nas cepas de *T. cruzi*. Este menor número de genes da família MASP em *T. rangeli* e *T. conorhini* pode estar relacionado à falta de infectividade de células hospedeiras por parte destes parasitos, como também a sua incapacidade de induzir infecções agudas com altos níveis de parasitemia ou infecções crônicas longas (Bradwell et al. 2018). Além disto, neste mesmo estudo, Bradwell et al. 2018 através de análises pelo OrthoFinder observaram que em *T. rangeli* os genes MASP divergiram significativamente dos presentes em *T. cruzi* CL (Bradwell et al. 2018).

Estas diferenças no número de genes de MASP também foram observadas em um trabalho de análise genômica e de transcriptoma de *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* (Kelly et al. 2017). *T. theileri* é uma espécie de tripanossomatídeo infectante de mamíferos. São parasitos extracelulares durante a proliferação no hospedeiro vertebrado e que promovem uma infecção normalmente de baixa parasitemia. O estudo mostrou que *T. theileri* também apresenta números relativamente baixos de MASP no seu genoma (Kelly et al. 2017). Outro trabalho mostrou alterações na dinâmica de expressão de genes que codificam proteínas de superfície durante o ciclo intracelular de dois clones da cepa CL de *T. cruzi*: CL Brener, um clone virulento, e CL-14, um clone que não é infeccioso nem patogênico em modelos *in vivo* de infecção. Apesar de não haver diferenças significativas entre o número de cópias gênicas destas famílias entre os dois clones (Teixeira, comunicação pessoal), as análises de transcriptômica mostraram que há grandes diferenças na remodelação dos transcritos entre as duas linhagens quando a expressão gênica em 60 hpi e 96 hpi foram comparadas. Estas distinções foram particularmente observadas em relação à expressão de famílias de genes codificando

proteínas de superfície, que apresentam uma cinética mais rápida de expressão em CL Brener quando comparado com CL-14, apontando para um papel central destes grupos de proteínas no processo de diferenciação de amastigota replicativa para tripomastigota infectante, e o estabelecimento da infecção no hospedeiro vertebrado (Belew et al. 2017).

A invasão de células hospedeiras por tripomastigotas de *T. cruzi* é um processo bastante complexo que envolve várias etapas (Andrade and Andrews 2005; Caradonna and Burleigh 2011). O reconhecimento inicial e a sensibilização da célula-alvo envolvem vários componentes de superfície do parasito aparentemente redundantes (Cámara et al. 2017). A maioria destes são glicoproteínas ancoradas por GPI codificadas por famílias multigênicas, polimórficas e reguladas ao longo do desenvolvimento, como as moléculas de gp85, SAP, TcSMP e TSSA (Cánepa et al. 2012; Maria Júlia M. Alves 2008; Martins et al. 2015; Zanforlin et al. 2013).

Para iniciar a investigação da participação de MASP na invasão de células hospedeiras por *T. cruzi*, avaliamos a capacidade de proteínas MASP recombinantes se ligarem à superfície das células L6. Foi possível observar que as proteínas MASP apresentam diferentes capacidades de ligação às células L6 (Figura 28). A incubação com as MASP M1(Black) e M3(Dark green) apresentaram uma menor capacidade de ligação. Já as MASPs M2(Blue), M4(Magenta), M6(Orange-1), M9(Blue), M12(Blue), M13(Blue), M14(Blue), M19(Black) e M20(Black) foram capazes de se ligar mais às células L6. Enquanto, as proteínas M5(Red), M7(Orange-2) e M18(Blue) de MASP apresentaram níveis intermediários de ligação. Estes dados indicaram uma provável interação de MASP com receptores de proteína das células L6.

A partir do resultado do ensaio de ligação das proteínas MASP às células L6, decidimos investigar o possível envolvimento das MASP na invasão celular por *T. cruzi*. (Martins et al. 2015; Rodrigues et al. 2017; Zanforlin et al. 2013). No teste inicial, as monocamadas de célula L6 foram incubadas com um *pool* de proteínas recombinantes purificadas de MASP, que foram divididas em 3 grupos de acordo com a intensidade da ligação às células L6. Através dos resultados foi possível perceber que o tratamento com as proteínas MASP reduziu a taxa de invasão por *T. cruzi*, sendo que a incubação com *pool 2* (M4, M9, M13 e M19) foi o que impactou mais a infecção pelo parasito, reduzindo 62% o número de células infectadas em comparação ao grupo controle. (Figura 29).

Com esta indicação de que as proteínas recombinantes de MASP podem influenciar na infecção pelo parasito, testamos individualmente a atuação das proteínas

de MASP que compunham o *pool 2*. O tratamento com as proteínas M4, M9 e M13 foi realizado em duas concentrações diferentes, 20µg/mL e 40µg/mL. O resultado demonstrou que o tratamento com a proteína M13 reduziu a invasão das células L6 pelo *T. cruzi* em 57% em relação ao grupo controle, quando utilizado 20µg/mL, e em 67% com a concentração de 40µg/mL de proteína. Porém, o tratamento com as proteínas M4 e M9 de MASP, nas concentrações de 20µg/mL ou 40µg/mL, não apresentou uma redução significativa da invasão de células L6 pelo *T. cruzi* (Figura 30). Outros testes serão realizados com estas proteínas em diferentes concentrações para avaliar se a influência do tratamento de células L6 na infecção pelo *T. cruzi* é dose dependente.

Foram realizados também ensaios de invasão com as proteínas M2, M18 e com M19. Nestes experimentos, apenas foi utilizada a concentração de 20µg/mL das proteínas e observou-se que a taxa de infecção do parasito foi reduzida em 63% após o tratamento com a M2, 49% com a M18 e 84% com a proteína M19, quando comparados ao controle (Figura 31). Desta forma, foi possível observar que o tratamento de células L6 com as proteínas de MASP M2, M13, M18 e M19 reduzem a infecção celular pelo *T. cruzi*.

A proteína TSSA de *T. cruzi* foi capaz de reduzir a infecção de células Vero por tripomastigotas de CL Brener quando incubada com as células hospedeiras simultaneamente aos parasitos. (Cánepa et al. 2012). Experimentos similares de infecção de células L6 com as proteínas MASP M2, M13, M18 e M19 na concentração de 20µg/mL demonstraram, porém, que o tratamento simultâneo das células L6 com estas proteínas de MASP não afetou a invasão das células hospedeira pelo parasito. Isto indica que a incubação conjunta das proteínas MASP e os parasitos não é o suficiente para inibir a infecção, provavelmente, porque com o tratamento prévio das células por uma hora antes da infecção, as proteínas recombinantes de MASP se ligam aos locais em que o parasito pode se utilizar para realizar a invasão das células L6, o que não ocorre em tempo hábil com o tratamento simultâneo. Porém, é necessário que sejam realizados testes com diferentes concentrações de proteínas para avaliar melhor a influência do tratamento simultâneo de células L6 com MASP e a infecção pelo *T. cruzi*.

Para tentar compreender melhor o papel das proteínas de MASP na infecção por *T. cruzi*, as próximas etapas do trabalho incluem avaliar o tratamento prévio dos parasitos com os anticorpos anti-MASP. Verificar se o tratamento com proteínas MASP modifica a sinalização de cálcio e o recrutamento de lisossomos no sítio da invasão da célula hospedeira (Andrade and Andrews 2005; Fernandes et al. 2015; Lia et al. 2017; Martins

et al. 2015; Rodrigues et al. 2017; Zanforlin et al. 2013). Avaliar ainda se MASP influencia a dinâmica do ciclo intracelular, alterando o tempo de associação do parasito com os fagolisossomos. Além disto, um *screening* capaz de avaliar se o tratamento de células hospedeiras altera a taxa de invasão pelo *T. cruzi*, com vários membros de MASP em diferentes concentrações, já foi padronizado e está em andamento. O objetivo deste experimento é comparar impacto de diferentes proteínas de MASP na infecção de diversos tipos celulares por *T. cruzi* e determinar qual é a menor concentração necessária para observar a influência destas proteínas na invasão do parasito.

## 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que a extensa variabilidade da família MASP possa ser usada pelo parasito como parte de mecanismos de evasão do sistema imune do hospedeiro na fase aguda da infecção, contribuindo para a estratégia conhecida como “cortina de fumaça”. Esta estratégia consistiria na expressão de diversos membros de MASP pela população de parasitos, dificultando assim a geração de uma resposta imune específica e eficiente, facilitando o estabelecimento da infecção pelo parasito. Além disso, a variabilidade da família MASP pode contribuir para que as formas tripomastigotas do parasito tenham a habilidade de infectar diferentes células do hospedeiro mamífero, o que é crucial para o estabelecimento de uma infecção produtiva pelo *T. cruzi*.

## 10. BIBLIOGRAFIA

- Acevedo, Gonzalo R., Magalí C. Girard, and Karina A. Gómez. 2018. "The Unsolved Jigsaw Puzzle of the Immune Response in Chagas Disease." *Frontiers in Immunology* 9(August):1–23.
- Agüero F1, Abdellah KB, Tekiel V, Sánchez DO, González A. 2004. "Generation and Analysis of Expressed Sequence Tags from *Trypanosoma cruzi* Trypomastigote and Amastigote cDNA Libraries." *Mol Biochem Parasitol.*
- Altschul, Stephen F., Warren Gish, The Pennsylvania, and University Park. 1990. "Basic Local Alignment Search Tool 2Department of Computer Science." 403–10.
- Andrade, Dafne C. et al. 2014. "A Fluorescent Multiplexed Bead-Based Immunoassay (FMIA) for Quantitation of IgG against *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* Protein Antigens." *Journal of Immunological Methods* 405:130–43. Retrieved (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022175914000465>).
- Andrade, Luciana O. and Norma W. Andrews. 2004. "Lysosomal Fusion Is Essential for the Retention of *Trypanosoma cruzi* inside Host Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 200(9):1135–43.
- Andrade, Luciana O. and Norma W. Andrews. 2005. "Opinion: The *Trypanosoma cruzi*–host-Cell Interplay: Location, Invasion, Retention." *Nature Reviews Microbiology* 3(10):819–23. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro1249>).
- Andrews, Norma W., Kyong su Hong, Edith S. Robbins, and Victor Nussenzweig. 1987. "Stage-Specific Surface Antigens Expressed during the Morphogenesis of Vertebrate Forms of *Trypanosoma cruzi*." *Experimental Parasitology* 64(3):474–84.
- Atwood, J. a et al. 2005. "The *Trypanosoma cruzi* Proteome." *Science (New York, N.Y.)* 309(5733):473–76.
- De Avalos, Silvia Vaena, Ira J. Blader, Michael Fisher, John C. Boothroyd, and Barbara A. Burleigh. 2002. "Immediate/Early Response to *Trypanosoma cruzi* Infection Involves Minimal Modulation of Host Cell Transcription." *Journal of Biological Chemistry* 277(1):639–44.
- Balouz, Virginia et al. 2015. "Mapping Antigenic Motifs in the Trypomastigote Small Surface Antigen from *Trypanosoma cruzi*." *Clinical and Vaccine Immunology* 22(3):304–12.
- Balouz, Virginia, Carlos A. Buscaglia, and Buenos Aires. 2017. "Chagas Disease Diagnostic Applications: Present Knowledge and Future Steps." 1–38.
- Bart, Jean Mathieu et al. 2015. "Localization of Serum Resistance-Associated Protein in *Trypanosoma brucei* Rhodesiense and Transgenic *Trypanosoma brucei brucei*." *Cellular Microbiology* 17(10):1523–35.
- Bartholomeu, Daniella C. et al. 2009. "Genomic Organization and Expression Profile of the Mucin-Associated Surface Protein (Masp) Family of the Human Pathogen *Trypanosoma cruzi*." *Nucleic Acids Research* 37(10):3407–17.
- Bayer-Santos, Ethel et al. 2013. "Proteomic Analysis of *Trypanosoma cruzi* Secretome: Characterization of Two Populations of Extracellular Vesicles and Soluble Proteins."



*Journal of Proteome Research* 12(2):883–97.

Belew, A. Trey et al. 2017. “Comparative Transcriptome Profiling of Virulent and Non-Virulent *Trypanosoma cruzi* Underlines the Role of Surface Proteins during Infection.” *PLoS Pathogens* 13(12):1–23.

Bello Corassa, Rafael, Carmen Aceijas, Paula Aryane Brito Alves, and Hemda Garelick. 2017. “Evolution of Chagas’ Disease in Brazil. Epidemiological Perspective and Challenges for the Future: A Critical Review.” *Perspectives in Public Health* 137(5):289–95.

Bermejo, Daniela A. et al. 2011. “*Trypanosoma cruzi* Infection Induces a Massive Extrafollicular and Follicular Splenic B-Cell Response Which Is a High Source of Non-Parasite-Specific Antibodies.” *Immunology* 132(1):123–33.

Bernabó, Guillermo et al. 2013. “TcTASV-C, a Protein Family in *Trypanosoma cruzi* That Is Predominantly Trypomastigote-Stage Specific and Secreted to the Medium.” *PLoS ONE* 8(7):1–10.

Berriman, Matthew et al. 2005. “The Genome of the African Trypanosome *Trypanosoma brucei*.” *Science (New York, N.Y.)* 309(July):416–22.

Bradwell, Katie R. et al. 2018. “Genomic Comparison of *Trypanosoma conorhini* and *Trypanosoma rangeli* to *Trypanosoma cruzi* Strains of High and Low Virulence.” *BMC Genomics* 19(1):770. Retrieved (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30355302>).

Brener, Zigman. 1973. “Biology of *Trypanosoma cruzi*.”

Brossas, Jean Yves et al. 2017. “Secretome Analysis of *Trypanosoma cruzi* by Proteomics Studies.” *PLoS ONE* 12(10):1–16.

Burleigh, Barbara A., Elisabet V. Caler, Paul Webster, and Norma W. Andrews. 1997. “A Cytosolic Serine Endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* Is Required for the Generation of Ca<sup>2+</sup> Signaling in Mammalian Cells.” *Journal of Cell Biology* 136(3):609–20.

Buscaglia, Carlos A. et al. 2004. “The Surface Coat of the Mammal-Dwelling Infective Trypomastigote Stage of *Trypanosoma cruzi* Is Formed by Highly Diverse Immunogenic Mucins.” *Journal of Biological Chemistry* 279(16):15860–69.

Buscaglia, Carlos A., Alberto C. C. Frasc, Javier M. Di Noia, Claudia R. De Marchi, and Igor C. Almeida. 2002. “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* 195(4):401–13.

Cámara, María de los Milagros et al. 2017. “The Trypomastigote Small Surface Antigen (TSSA) Regulates *Trypanosoma cruzi* Infectivity and Differentiation.” *PLOS Neglected Tropical Diseases* 11(8):e0005856. Retrieved (<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0005856>).

Cánepa, Gaspar E., Maria Sol Degese, Alexandre Budu, Celia R. S. Garcia, and Carlos A. Buscaglia. 2012. “Involvement of TSSA (Trypomastigote Small Surface Antigen) in *Trypanosoma cruzi* Invasion of Mammalian Cells.” *Biochemical Journal* 444(2):211–18. Retrieved (<http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BJ20120074>).

Caradonna, Kacey L. and Barbara A. Burleigh. 2011. “Mechanisms of Host Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi*.” (November):33–61. Retrieved (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123858955000025>).

- Cardoso, Mariana S., João Luís Reis-Cunha, and Daniella C. Bartholomeu. 2016. "Evasion of the Immune Response by *Trypanosoma cruzi* during Acute Infection." *Frontiers in Immunology* 6(JAN):1–15.
- Carmona, Santiago J. et al. 2015. "Towards High-Throughput Immunomics for Infectious Diseases : Use of Next-Generation Peptide Microarrays for Rapid Discovery and Mapping of Antigenic Determinants \* □." 1871–84.
- Cestari, Igor and Ken Stuart. 2018. "Transcriptional Regulation of Telomeric Expression Sites and Antigenic Variation in Trypanosomes." *Current Genomics* 19(2):119–32.
- Chagas, Carlos. 1909. "Nova Tripanozomiaze Humana."
- Chatelain, Eric. 2017. "Chagas Disease Research and Development: Is There Light at the End of the Tunnel?" *Computational and Structural Biotechnology Journal* 15:98–103. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.csbj.2016.12.002>).
- Cordon-Obras, Carlos et al. 2013. "*Trypanosoma brucei gambiense* Adaptation to Different Mammalian Sera Is Associated with VSG Expression Site Plasticity." *PLoS ONE* 8(12):1–15.
- Coura, José Rodrigues and José Borges-Pereira. 2010. "Chagas Disease: 100 Years after Its Discovery. A Systemic Review." *Acta Tropica* 115(1–2):5–13.
- Cross, George A. M., Hee Sook Kim, and Bill Wickstead. 2014. "Capturing the Variant Surface Glycoprotein Repertoire (the VSGnome) of *Trypanosoma brucei* Lister 427." *Molecular and Biochemical Parasitology* 195(1):59–73. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.06.004>).
- Cross, George A. M., L. Elizabeth Wirtz, and Miguel Navarro. 1998. "Regulation of vsg Expression Site Transcription and Switching in *Trypanosoma brucei*." *Molecular and Biochemical Parasitology* 91(1):77–91.
- Deane, Leonidas M., Maria P. Deane, and Ricardo Lourenço-de-Oliveira. 1986. "Are Asian Monkeys the Original Mammalian Hosts of *Trypanosoma conorhini* ." *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 81:127–29.
- Díaz Lozano, Isabel María et al. 2017. "Immune Complexes in Chronic Chagas Disease Patients Are Formed by Exovesicles from *Trypanosoma cruzi* Carrying the Conserved MASP N-Terminal Region." *Scientific Reports* 7(November 2016):44451. Retrieved (<http://www.nature.com/articles/srep44451>).
- Durante, Ignacio M., Pablo E. La Spina, Santiago J. Carmona, Fernán Agüero, and Carlos A. Buscaglia. 2017. "High-Resolution Profiling of Linear B-Cell Epitopes from Mucin-Associated Surface Proteins (MASPs) of *Trypanosoma cruzi* during Human Infections." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 11(9):1–23.
- Echeverria, Luis E. and Carlos A. Morillo. 2019. "American Trypanosomiasis (Chagas Disease)." *Infectious Disease Clinics of NA* 33(1):119–34. Retrieved (<https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.015>).
- El-Sayed, Najib M. et al. 2005. "Comparative Genomics of Trypanosomatid Parasitic Protozoa." *Science (New York, N.Y.)* 309(5733):404–9. Retrieved (<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1112181>).
- El-Sayed, Najib M. et al. 2005. "The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic

- Agent of Chagas Disease.” *Science (New York, N.Y.)* 309(5733):409–15. Retrieved July 15, 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16020725>).
- Fankhauser, Niklaus and Pascal Mäser. 2005. “Identification of GPI Anchor Attachment Signals by a Kohonen Self-Organizing Map.” *Bioinformatics* 21(9):1846–52. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bti299>).
- Felsenstein J. 1989. “Phylogeny Inference Package (Version 3.2).” *Cladistics* 5: 164-166.
- Felsenstein J. 2005. “PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.6.”
- Fernandes, M. C., M. Corrotte, D. C. Miguel, C. Tam, and N. W. Andrews. 2015. “The Exocyst Is Required for Trypanosome Invasion and the Repair of Mechanical Plasma Membrane Wounds.” *Journal of Cell Science* 128(1):27–32. Retrieved (<http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.150573>).
- Fernandes, Maria Cecilia and Norma W. Andrews. 2012. “Host Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi*: A Unique Strategy That Promotes Persistence.” *FEMS Microbiology Reviews* 36(3):734–47.
- Franzén, Oscar et al. 2011. “Shotgun Sequencing Analysis of *Trypanosoma cruzi* i Sylvio X10/1 and Comparison with T. Cruzi VI CL Brener.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5(3):1–9.
- Freitas, Leandro M. et al. 2011. “Genomic Analyses, Gene Expression and Antigenic Profile of the Trans-Sialidase Superfamily of *Trypanosoma cruzi* Reveal an Undetected Level of Complexity.” *PLoS ONE* 6(10).
- Freitas, Leandro Martins de. 2011. “Análise Da Diversidade , Clusterização e Estudo de Mecanismos Evolutivos Geradores de Diversidade Nas Grandes Famílias Gênicas de *Trypanosoma cruzi* .” *Tese de Doutorado*.
- Gao, Wenda, Henry H. Wortis, and Miercio A. Pereira. 2002. “The *Trypanosoma cruzi* Trans-Sialidase Is a T Cell-Independent B Cell Mitogen and an Inducer of Non-Specific Ig Secretion.” *International Immunology* 14(3):299–308.
- Gardner, Malcolm J. et al. 2002. “Genome Sequence of the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*.” *Nature* 419(6906):498–511.
- Ghule, Arvind Kumar et al. 2019. “Development and Validation of Magnetic Bead Pentaplex Immunoassay for Simultaneous Quantification of Murine Serum IgG Antibodies to Acellular Pertussis, Diphtheria and Tetanus Antigens Used in Combination Vaccines.” *Methods*. Retrieved (<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.01.015>).
- Hartigan, J. A. and M. A. Wong. 1979. “Algorithm AS 136: A K-Means Clustering Algorithm.” *Journal of the Royal Statistical Society. Series C (Applied Statistics)* 28(1):100–108. Retrieved (<http://www.jstor.org/stable/2346830>).
- Hoare, C. A. 1972. *The Trypanosomes of Mammals. A Zoological Monograph*. Oxford & Edinburgh: Blackwell Scientific Publications.
- Id, Masaki Yamaguchi, Shin Okamura, Taiki Yamaji, and Motoki Iwasaki. 2019. “Plasma Cytokine Levels and the Presence of Colorectal Cancer.” 1–13.
- Ivens, Alasdair C. et al. 2005. “The Genome of the Kinetoplastid Parasite, *Leishmania major*.” *Science (New York, N.Y.)* 309(July):436–42.

- Junqueira, Caroline et al. 2010. "The Endless Race between *Trypanosoma cruzi* and Host Immunity: Lessons for and beyond Chagas Disease." *Expert Reviews in Molecular Medicine* 12(September):e29.
- Karanikola, Sofia et al. 2015. "Development of a Multiplex Fluorescence Immunological Assay for the Simultaneous Detection of Antibodies against *Cooperia oncophora*, *Dictyocaulus viviparus* and *Fasciola hepatica* in Cattle." *Parasites & Vectors* 8(1):335. Retrieved (<http://www.parasitesandvectors.com/content/8/1/335>).
- Kashem, Mohammad Abul et al. 2019. "Toll-like Interleukin 1 Receptor Regulator Is an Important Modulator of Inflammation Responsive Genes." *Frontiers in Immunology* 10(February):272. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30873160>)  
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30873160>).
- Kelly, Steven et al. 2017. "An Alternative Strategy for Trypanosome Survival in the Mammalian Bloodstream Revealed through Genome and Transcriptome Analysis of the Ubiquitous Bovine Parasite *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*." *Genome Biology and Evolution* 9(8):2093–2109.
- Ladeira, David, Jean Mathieu Bart, Daria Van Tyne, and Miguel Navarro. 2009. "Cohesin Regulates VSG Monoallelic Expression in Trypanosomes." *Journal of Cell Biology* 186(2):243–54.
- Lantos, Andrés B. et al. 2016. "Sialic Acid Glycobiology Unveils *Trypanosoma cruzi* Trypomastigote Membrane Physiology." *PLoS Pathogens* 12(4):1–29.
- de Leeuw, O. Olav et al. 2019. "The Development of a Multiplex Serological Assay for Avian Influenza Based on Luminex Technology." *Methods*. Retrieved (<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.01.012>).
- Levental, Ilya, Michal Grzybek, and Kai Simons. 2011. "Raft Domains of Variable Properties and Compositions in Plasma Membrane Vesicles." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(28):11411 LP-11416. Retrieved (<http://www.pnas.org/content/108/28/11411.abstract>).
- Ley, Victoria, Edith S. Robbins, Victor Nussenzweig, Norma W. Andrews, and Norma W. Andrews. 1990. "The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments." *J. Exp. MED* 171(February):401–13.
- Lia, Natá et al. 2017. "LAMP-2 Absence Interferes with Plasma Membrane Repair and Decreases *T. cruzi* Host Cell Invasion." 1–21.
- Linardi, Renata L., Michael E. Dodson, Kaitlyn L. Moss, William J. King, and Kyla F. Ortved. 2019. "The Effect of Autologous Protein Solution on the Inflammatory Cascade in Stimulated Equine Chondrocytes." *Frontiers in Veterinary Science* 6(March):64.
- Macedo, Andréa M., Riva P. Oliveira, and Sérgio D. J. Pena. 2003. "Chagas Disease: Role of Parasite Genetic Variation in Pathogenesis." *Expert Reviews in Molecular Medicine* 4(05):1–16.
- Maeda, Fernando Y., Cristian Cortez, and Nobuko Yoshida. 2012. "Cell Signaling during *Trypanosoma cruzi* Invasion." *Frontiers in Immunology* 3(NOV):1–7.
- Maria Júlia M. Alves, Walter Colli. 2008. "Role of the Gp85/Trans-Sialidase Superfamily of Glycoproteins in the Interaction of *Trypanosoma cruzi* with Host Structures." Pp. 58–69

in *Molecular Mechanisms of Parasite Invasion*, edited by Barbara A. Burleigh and D. Soldati-Favre. Springer New York.

Martins-Melo, Francisco Rogerlândio et al. 2018. “Burden of Chagas Disease in Brazil , 1990-2016: Findings from the Global Burden of Disease Study 2016.” *International Journal for Parasitology* (2019):1990–2016. Retrieved (<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.11.008>).

Martins, Nadini Oliveira et al. 2015. “Molecular Characterization of a Novel Family of *Trypanosoma cruzi* Surface Membrane Proteins (TcSMP) Involved in Mammalian Host Cell Invasion.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9(11):1–28. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004216>).

McCulloch, Richard et al. 2017. “Emerging Challenges in Understanding Trypanosome Antigenic Variation.” 0(December):585–92. Retrieved (<http://eprints.gla.ac.uk/151329/>).

Minoprio, P. 2001. “Parasite Polyclonal Activators: New Targets for Vaccination Approaches?” *International Journal for Parasitology* 31:588–91.

Morrison, Liam J., Richard McCulloch, and James P. J. Hall. 2014. “DNA Recombination Strategies During Antigenic Variation in the African Trypanosome.” *Mobile DNA III* (1):409–35. Retrieved (<http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555819217.chap19>).

Mucci, Juan, Andrés B. Lantos, Carlos A. Buscaglia, María Susana Leguizamón, and Oscar Campetella. 2016. “The *Trypanosoma cruzi* Surface, a Nanoscale Patchwork Quilt.” *Trends in Parasitology* xx:1–11. Retrieved (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492216301830>).

Mugnier, Monica R., George A. M. Cross, and F. Nina Papavasiliou. 2015. “The in Vivo Dynamics of Antigenic Variation in *Trypanosoma brucei*.” *Science (New York, N.Y.)* 347(6229):1470–73. Retrieved (<http://www.sciencemag.org/content/347/6229/1470.full>).

Mugnier, Monica R., C. Erec Stebbins, and F. Nina Papavasiliou. 2016. “Masters of Disguise: Antigenic Variation and the VSG Coat in *Trypanosoma Brucei*.” *PLoS Pathogens* 12(9):1–6.

Norma W Andrews, Charles K Abrams, Stephen L Slatin, Gareth Griffiths. 1990. “T. Cruzi-Secreted Protein Immunologically Related to the Complement Component C9: Evidence for Membrane Pore-Forming Activity at Low PHtle.” *Cell* Volume 61(Issue 7):p1277–1287. Retrieved ([http://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674\(90\)90692-8.pdf?returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2F0092867490906928%3Fshowall%3Dtrue](http://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674(90)90692-8.pdf?returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2F0092867490906928%3Fshowall%3Dtrue)).

De Pablos, Luis Miguel et al. 2011. “Differential Expression and Characterization of a Member of the Mucin-Associated Surface Protein Family Secreted by *Trypanosoma cruzi*.” *Infection and Immunity* 79(10):3993–4001.

De Pablos, Luis Miguel et al. 2016. “The C-Terminal Region of *Trypanosoma cruzi* MASPs Is Antigenic and Secreted via Exovesicles.” *Scientific Reports* 6(February):27293. Retrieved (<http://www.nature.com/articles/srep27293>).

De Pablos, Luis Miguel and Antonio Osuna. 2012. “Multigene Families in *Trypanosoma cruzi* and Their Role in Infectivity.” *Infection and Immunity* 80(7):2258–64.

- Pérez-Molina, José A. and Israel Molina. 2017. "Chagas Disease." *The Lancet* 6736(17):113.
- Petersen, Thomas Nordahl, Søren Brunak, Gunnar von Heijne, and Henrik Nielsen. 2011. "SignalP 4.0: Discriminating Signal Peptides from Transmembrane Regions." *Nature Methods* 8:785. Retrieved (<https://doi.org/10.1038/nmeth.1701>).
- Pinger, Jason, Shanin Chowdhury, and F. Nina Papavasiliou. 2017. "Variant Surface Glycoprotein Density Defines an Immune Evasion Threshold for African Trypanosomes Undergoing Antigenic Variation." *Nature Communications* 8(1). Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-00959-w>).
- Pitcovsky, Tamara A., Carlos A. Buscaglia, Juan Mucci, and Oscar Campetella. 2002. "A Functional Network of Intramolecular Cross-Reacting Epitopes Delays the Elicitation of Neutralizing Antibodies to *Trypanosoma cruzi* Trans-Sialidase." *The Journal of Infectious Diseases* 186(3):397–404.
- Prucca, Cesar G. and Hugo D. Lujan. 2009. "Antigenic Variation in *Giardia lamblia*." *Cellular Microbiology* 11(12):1706–15. Retrieved (<https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01367.x>).
- Prucca, César G., Fernando D. Rivero, and Hugo D. Luján. 2011. "Regulation of Antigenic Variation in *Giardia lamblia*." *Annual Review of Microbiology* 65(1):611–30. Retrieved (<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102940>).
- Rath, Arianna, Mira Glibowicka, Vincent G. Nadeau, Gong Chen, and Charles M. Deber. 2009. "Detergent Binding Explains Anomalous SDS-PAGE Migration of Membrane Proteins." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(6):1760–65. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2644111&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Rodrigues, João Paulo Ferreira, Guilherme Hideki Takahashi Sant'ana, Maria Aparecida Juliano, and Nobuko Yoshida. 2017. "Inhibition of the Host Cell Lysosome Spreading by *Trypanosoma cruzi* Metacyclic Stage-Specific Surface Molecule Gp90 Down Regulates Parasite Invasion." *Infection and Immunity* (June):IAI.00302-17. Retrieved (<http://iai.asm.org/content/early/2017/06/07/IAI.00302-17.long%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28607099>).
- Rodriguez, Ana, Marc G. Rioult, and Ari Ora. 1995. "A Trypanosome-Soluble Factor Induces IPa Formation, Intracellular." *Cell* 129(5):1263–73.
- Rodríguez, Ana, Erika Samoff, Marc G. Rioult, Albert Chung, and Norma W. Andrews. 1996. "Host Cell Invasion by Trypanosomes Requires Lysosomes and Microtubule/Kinesin-Mediated Transport." *Journal of Cell Biology* 134(2):349–62.
- Santos, Marcelo, Galadriel A. Hovel-miner Id, Emma M. Briggs Id, Carolina Elias, and Richard Mcculloch Id. 2018. "Evaluation of Mechanisms That May Generate DNA Lesions Triggering Antigenic Variation in African Trypanosomes." 1–13.
- dos Santos, Sara Lopes et al. 2012. "The MASP Family of *Trypanosoma cruzi*: Changes in Gene Expression and Antigenic Profile during the Acute Phase of Experimental Infection." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6(8).

Schenkman, Sergio and Renato A. Mortara. 1992. "HeLa Cells Extend and Internalize Pseudopodia during Active Invasion by *Trypanosoma cruzi* Trypomastigotes." *Journal of Cell Science* 101 ( Pt 4:895–905. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1527184>).

Seco-Hidalgo, Víctor, Luis Miguel De Pablos, and Antonio Osuna. 2015. "Transcriptional and Phenotypical Heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* Cell Populations." *Open Biology* 5. Retrieved(<http://dx.doi.org/10.1098/rsob.150190><http://dx.doi.org/10.1098/rsob.150190>).

Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde. 2019. "Doença de Chagas Aguda e Distribuição Espacial Dos Triatomíneos de Importância Epidemiológica, Brasil 2012 a 2016." *Boletim Epidemiológico* 50(2):10.

Silva, Elis D. et al. 2019. "Performance Evaluation of Anti-Fixed *Leishmania infantum* Promastigotes Immunoglobulin G (IgG) Detected by Flow Cytometry as a Diagnostic Tool for Visceral Leishmaniasis." *Journal of Immunological Methods*. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30817916><https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022175918302448>).

Song, Jin, Shannath L. Merbs, Lori J. Sokoll, Daniel W. Chan, and Zhen Zhang. 2019. "A Multiplex Immunoassay of Serum Biomarkers for the Detection of Uveal Melanoma." *Clinical Proteomics* 16(1):10. Retrieved (<https://clinicalproteomicsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12014-019-9230-8>).

De Souza, Wanderley, Tecia Maria Ulisses De Carvalho, and Emile Santos Barrias. 2010. "Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction." *International Journal of Cell Biology* 2010.

Stoco, Patrícia Hermes et al. 2014. "Genome of the Avirulent Human-Infective Trypanosome—*Trypanosoma rangeli*." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8(9):e3176. Retrieved (<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003176>).

Tardieux, I., M. H. Nathanson, and N. W. Andrews. 1994. "Role in Host Cell Invasion of *Trypanosoma cruzi*-Induced Cytosolic-Free Ca<sup>2+</sup> Transients." *The Journal of Experimental Medicine* 179(3):1017–22. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2191425&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).

Tardieux, Isabelle et al. 1992. "Lysosome Recruitment and Fusion Are Early Events Required for Trypanosome Invasion of Mammalian Cells." *Cell* 71(7):1117–30.

Tarleton, Rick L. 2007. "Immune System Recognition of *Trypanosoma cruzi*." *Current Opinion in Immunology* 19(4):430–34. Retrieved February 8, 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17651955>).

Tarleton, Rick L. 2015. "CD8+ T Cells in *Trypanosoma cruzi* Infection." 37(3):233–38.

Toro Acevedo, Carlos A. et al. 2017. "Down Modulation of Host Immune Response by Amino Acid Repeats Present in a *Trypanosoma cruzi* Ribosomal Antigen." *Frontiers in Microbiology* 8(November):1–16. Retrieved (<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.02188/full>).

Vargas, Nancy, Aurélio Pedroso, and Bianca Zingales. 2004. "Chromosomal Polymorphism, Gene Synteny and Genome Size in *T. cruzi* I and *T. cruzi* II Groups." *Molecular and Biochemical Parasitology* 138(1):131–41. Retrieved (<http://europepmc.org/abstract/MED/15500924>).

Wagner, Glauber et al. 2013. "The *Trypanosoma rangeli* Trypomastigote Surfaceome Reveals Novel Proteins and Targets for Specific Diagnosis." *Journal of Proteomics* 82:52–63. Retrieved February 17, 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23466310>).

WHO. 2018. "Chagas Disease (American Trypanosomiasis)." Retrieved (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>).

Woolsey, Aaron M. et al. 2003. "Novel PI 3-Kinase-Dependent Mechanisms of Trypanosome Invasion and Vacuole Maturation." *Journal of Cell Science* 116(Pt 17):3611–22.

Xavier, Marcelo Antônio Pascoal et al. 2018. "Usefulness of FC-TRIPLEX Chagas/Leish IgG1 as Confirmatory Assay for Non-Negative Results in Blood Bank Screening of Chagas Disease." *Journal of Immunological Methods* 455(January):34–40. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2018.01.006>).

Yoshida, Nobuko. 2006. "Molecular Basis of Mammalian Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi*." *Anais Da Academia Brasileira de Ciências* 78(1):87–111.

Zanforlin, Tamiris et al. 2013. "Molecular Characterization of *Trypanosoma cruzi* SAP Proteins with Host-Cell Lysosome Exocytosis-Inducing Activity Required for Parasite Invasion." *PLoS ONE* 8(12).

Zingales, Bianca et al. 2012. "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* 12(2):240–53. Retrieved September 12, 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22226704>).