

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós Graduação em Biologia Celular

Anny Caroline Silva Oliveira

**Caracterização biológica e molecular de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*
provenientes de células deficientes na proteína lisossomal LAMP**

Belo Horizonte

2021

Anny Caroline Silva Oliveira

**Caracterização biológica e molecular de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*
provenientes de células deficientes na proteína lisossomal LAMP**

Versão Final

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora: Dra. Luciana de Oliveira Andrade

Coorientadora: Dra. Héliida Monteiro de Andrade

Belo Horizonte
2021

043

Oliveira, Anny Caroline Silva.

Caracterização biológica e molecular de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* provenientes de células deficientes na proteína lisossomal LAMP [manuscrito] / Anny Caroline Silva Oliveira. – 2021.

145 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Luciana de Oliveira Andrade. Coorientadora: Dra. Héliida Monteiro de Andrade.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Doença de Chagas. 3. *Trypanosoma cruzi*. 4. Espaço Intracelular. 5. Glicoproteínas de Membrana Associadas ao Lisossomo. I. Andrade, Luciana de Oliveira. II. Andrade, Héliida Monteiro de. III. Universidade Federal de Minas. Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
 INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE	240/2021
	entrada
ANNY CAROLLINE SILVA OLIVEIRA	2º/2017
	2017757602

Às **quatorze horas** do dia **28 de outubro de 2021**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE TRIPOMASTIGOTAS DE TRYPANOSOMA CRUZI PROVENIENTES DE CÉLULAS DEFICIENTES NA PROTEÍNA LISOSSOMAL LAMP**", requisito final para obtenção do grau de Doutora em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Luciana de Oliveira Andrade**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição
Dra. Luciana de Oliveira Andrade	UFMG
Dra. Helida Monteiro de Andrade	UFMG
Dra. Walderez Ornelas Dutra	UFMG
Dra. Daniella Castanheira Batholomeu	UFMG
Dr. Carlos Andre Ornelas Ricart	IB / UNB
Dr. Igor de Almeida	UTEP / Texas

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 28 de outubro de 2021.**

Dr^a. Luciana de Oliveira Andrade (Orientadora)

Dr^a. Helida Monteiro de Andrade (Coorientadora)

Dr^a. Walderez Ornelas Dutra

Dr^a. Daniella Castanheira Batholomeu

Dr. Carlos Andre Ornelas Ricart

Dr. Igor de Almeida

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura do Coordenador



Documento assinado eletronicamente por **Daniella Castanheira Bartholomeu, Professora do Magistério Superior**, em 29/10/2021, às 15:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Helida Monteiro de Andrade, Professora do Magistério Superior**, em 01/11/2021, às 15:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Walderez Ornelas Dutra, Professora do Magistério Superior**, em 01/11/2021, às 15:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana de Oliveira Andrade, Professora do Magistério Superior**, em 03/11/2021, às 09:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos André Ornelas Ricart, Usuário Externo**, em 05/11/2021, às 10:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida, Coordenador(a)**, em 05/11/2021, às 11:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Igor Correia de Almeida, Usuário Externo**, em 23/11/2021, às 15:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

23/11/2021 16:26

SEI/UFMG - 1053278 - Ata



https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1053278** e o código CRC **53D42580**.

Referência: Processo nº 23072.256463/2021-19

SEI nº 1053278

AGRADECIMENTOS CIENTÍFICOS

Agradeço às agências de fomento, CAPES, CNPq e FAPEMIG por oferecerem as condições para que este trabalho fosse realizado com sucesso.

À minha orientadora, Professora Luciana Andrade por toda paciência e dedicação dados a mim e a este trabalho. Por sua orientação, ensinamentos, palavras de incentivo e suporte nos momentos complicados. Obrigada por me ensinar a ser independente e resiliente na execução do meu trabalho. Um ensinamento que levei comigo quando fui para a Dinamarca e que levarei para sempre comigo.

À minha coorientadora, Professora Héliida Andrade pela paciência ao me ensinar a analisar dados proteômicos, Western Blots, e pela dedicação a este trabalho desde o início. E por acreditar em mim e nas minhas ideias. Por sempre me acalmar nos meus momentos de quase desespero. Muito obrigada!

Ao Professor Frank Kjeldsen por ter me recebido tão gentilmente e carinhosamente em seu grupo de pesquisa na Dinamarca. Obrigada por todo apoio e por acreditar em mim e na minha capacidade profissional.

Ao Professor Thiago Braga pelo apoio e por me apresentar e me indicar ao grupo do Prof. Frank Kjeldsen. Você fez toda diferença para o sucesso do meu PDSE e contribuiu muito para que ele pudesse acontecer.

A todos os professores que ao longo destes 4 anos tive a oportunidade de contar com o apoio e conselhos, Professor Gregory Kitten, Professor Thiago-Castro, Professora Daniella Bartholomeu, Professor Ricardo Fujiwara, Professora Walderez Dutra, entre outros tantos dos departamentos de Morfologia e de Parasitologia da UFMG.

À Pós-Graduação em Biologia Celular por seus serviços prestados.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por me abençoar todos os dias da minha vida. Por ter me dado forças para perseverar até o fim e para transpor todas as pedras no caminho. Sem Ele, nada seria possível.

Aos meus pais e ao meu irmão por todo carinho, amor e dedicação. Por acreditarem e investirem em mim, e principalmente por todo o apoio e paciência nos últimos meses, que não foram fáceis. Muito obrigada. Amo vocês demais!

Ao meu namorado Kenneth Rasmussen por me incentivar, apoiar e aturar todas as minhas reclamações e estresses ao longo dos últimos dois anos. Sua paciência e conselhos nos momentos difíceis, e sua presença ainda que um oceano Atlântico de distância, foram muito importantes especialmente nos últimos meses. Muito obrigada por nunca me deixar sozinha.

À Natália Couto, à Luisa Rezende, à Anna Guañabens, à Ana Elisa Antunes, ao Raí Leonardo e ao Wesley Fernandes por todo apoio, carinho, amizade, conselhos, ombro amigo para chorar... por me alegrarem nos meus dias difíceis, por discutirem e me auxiliarem nos experimentos. Obrigada pela amizade de vocês ao longo desses tantos anos. Vocês fizeram toda diferença ao longo dessa minha jornada científica e estarão sempre no meu coração.

Ao Jorge Guadalupe, que além de um companheiro de laboratório excepcional também foi um *roommate* maravilhoso! Todos os momentos de descontração, conversas filosóficas no café ou jantar, os bolos de cenouras, os momentos de show de ukulele... Morar com você nos últimos seis meses foram fundamentais para manter a minha saúde mental em meio ao meu caos interno.

À Marcella Braga, que não somente foi uma amiga queridíssima mas que também contribuiu bastante para o sucesso das análises proteômicas realizadas neste trabalho.

Aos amigos do LGI, LGB e do Lab de Leishmanioses por todo apoio, risadas, auxílios, conversas, carinho e socorros nos experimentos. Muito obrigada!

Ao Vladimir Gorshkov por toda sua paciência em me ensinar tudo sobre proteômica e me socorrer inúmeras vezes com as análises nos softwares. Sem você essa jornada teria sido muito mais complicada. Obrigada pelos momentos de diversão, pelos inúmeros momentos de tensão no escritório e por acolher tão carinhosamente uma brasileira tímida no grupo.

À Komal Mandal por me acolher com sua amizade e por se preocupar comigo desde o primeiro dia no laboratório na SDU. Por me apresentar os lugares mais divertidos em Odense, por todos os momentos que importunei perguntando sobre proteômica e Western Blots, pelos momentos de meditação e pelas incontáveis risadas. Muito obrigada!

Aos colegas do PRGroup na SDU que me fizeram crescer profissionalmente e como pessoa. Obrigada por me acolherem e pela paciência em me ensinar a trabalhar com todos os instrumentos e técnicas. Agradeço em especial à Lene, Karin, Pia e Andrea.

A todos os amigos que contribuíram para a execução deste trabalho seja diretamente com conselhos científicos ou ajuda na bancada, ou indiretamente me ouvindo nos momentos de crise. A todos vocês que fizeram parte, muito obrigada.

“Por vezes, sentimos que aquilo que fazemos não é, senão, uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

O *Trypanosoma cruzi* invade células fagocíticas não profissionais através da subversão do processo de reparo de membrana da célula hospedeira, o qual é dependente de lesões à membrana plasmática e sinalização celular, aumento intracelular de cálcio e recrutamento de lisossomos. Células deficientes em LAMP (*Lysosome Associated Membrane Proteins* – LAMP) 1 e 2, são menos permissivas à invasão pelo *T. cruzi*, porém mais propensas à multiplicação intracelular deste parasito. O que determina essa maior multiplicação não é conhecido. No entanto, sabe-se que várias passagens por ambientes intracelulares diferentes pode, significativamente, mudar o perfil de expressão de genes do *T. cruzi*. Neste trabalho, nós avaliamos se uma única passagem por fibroblastos selvagens (WT) ou deficientes em LAMP (KO) poderia influenciar a capacidade de invasão de tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* em mioblastos L6 e fibroblastos WT. Parasitos liberados de células LAMP-2 KO (TcY-L2^{-/-}) apresentaram maiores taxas de invasão, sinalização de cálcio e injúria à membrana celular, em mioblastos L6, quando comparados àqueles liberados de fibroblastos WT (TcY-WT) ou LAMP-1/2 KO (TcY-L1/2^{-/-}). Por outro lado, TcY-L1/2^{-/-} apresentou maiores taxas de invasão, sinalização de cálcio e injúria à membrana celular, em fibroblastos WT, quando comparados aos outros parasitos. TcY-WT, por outro lado, embora tenha apresentado taxas de invasão e de sinalização de cálcio intermediárias em fibroblastos WT, induziram menores níveis de injúria, reforçando que a sinalização mediada por proteínas tem também contribuição importante para a indução de sinais de cálcio pelo parasito. Estes resultados claramente demonstram que parasitos liberados de fibroblastos WT ou LAMP KO são distintos uns dos outros. Adicionalmente, a capacidade de invasão destes parasitos também pode variar dependendo de quais tipos celulares eles interagem. Como estas alterações provavelmente refletem diferenças entre as moléculas de superfície do parasito, nós também avaliamos seus subproteomas. Alguns complexos proteicos, proteínas de membrana e proteínas secretadas foram encontrados regulados, como alguns membros das famílias MASP, mucinas, *trans*-sialidases e GP63, os quais desempenham um importante papel durante a infecção pelo parasito.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. Doença de Chagas. Proteínas LAMP. Invasão. Ambiente intracelular. Análise proteômica. TMT (*tandem mass tags*).

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi invades non-professional phagocytic cells by subverting their membrane repair process, which is dependent on membrane injury and cell signaling, intracellular calcium increase and lysosome recruitment. Cells lacking Lysosome Associated Membrane Proteins 1 and 2 (LAMP-1 and LAMP-2) are less permissive to parasite invasion, however more prone to parasite intracellular multiplication. Several passages through a different intracellular environment can significantly change *T. cruzi*'s gene expression profile. Here, we evaluated whether one single passage through LAMP deficient (KO) or wild type (WT) fibroblasts could influence invasion ability of *T. cruzi* Y strain trypomastigotes in L6 myoblasts and WT fibroblasts. Parasites released from LAMP-2 KO cells (TcY-L2^{-/-}) showed higher invasion, calcium signaling and membrane injury rates when compared to those released from WT (TcY-WT) or LAMP-1/2 KO cells (TcY-L1/2^{-/-}) in L6 myoblasts. On the other hand, TcY-L1/2^{-/-} showed higher invasion, calcium signaling and cell membrane injury rates compared to the others in WT fibroblasts. TcY-WT, on the other hand, although presented an intermediary invasion and calcium signaling rates in WT cells, induced lower levels of injury, reinforcing that protein signaling also have a significant contribution to parasite induced calcium signals. These results clearly show that parasites released from WT or LAMP KO cells are distinct from each other. Additionally, these parasites ability to invade the cell may be distinct depending with which cell type they interact with. Since these alterations most likely would reflect differences among parasite surface molecules, we also evaluated their subproteome. Few protein complexes, membrane and secreted proteins were found regulated, such as some members of MASP, mucins, *trans*-sialidases and gp63 proteins family, which may play an important role during parasite infection.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Chagas disease. LAMP proteins. Parasite invasion. Intracellular environment. Proteomic analysis. TMT (tandem mass tags).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	– Microgramas
µL	– Microlitros
µM	– Micro molar
2x DP	– 2 vezes o desvio padrão
Ac-YVAD-AFC	– <i>N-Acetyl-Tyr-Val-Ala-Asp-7-amido-4-trifluoromethylcoumarin</i>
AF	– ácido fórmico
B2R	– <i>Bradicin-2 Receptor</i>
BSA	– <i>Bovine Serum Albumine</i>
Ca ²⁺	– Íons cálcio
cAMP	– Adenosina 3',5'-Monofosfato cíclico
Cav-1	– Caveolina-1
CHO	– <i>Chinese Hamster Ovary cells</i>
CO ₂	– Dióxido de carbono
DAPI	– <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DMEM	– <i>Dulbecco Modified Eagles' Medium</i>
DNA	– <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	– <i>Deoxynucleotide</i>
DTT	– <i>Dithiothreitol</i>
DTU	– <i>Discrete Typing Units</i>
EDTA	– <i>Ethylene Diamine Tetra Acetic acid</i>
ERK	– <i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>
FDR	– <i>False Discovery Rate</i>
Fisher's LSD	– <i>Fisher's least significant difference</i>
GlcNAc	– N-Acetilglucosamina
GO	– <i>Gene Ontology</i>
GPI	– <i>Glycosylphosphatidylinositol</i>
HBSS	– <i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
HCD	– <i>High energy collisional dissociation</i>
HEPES	– <i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
hs	– Horas
IAA	– Iodoacetamida

ICAT	– <i>Isotope-Coded Affinity Tag</i>
IgG	– Imunoglobulina G
IP	– Iodeto de propídeo
IP3	– Fosfatidilinositol 3,4,5-3-fosfato
iTRAQ	– <i>Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification</i>
kDa	– kiloDalton
KO	– <i>Knock out</i>
LAMP	– <i>Lysosome Associated Membrane Proteins</i>
LAMP-1	– <i>Lysosome Associated Membrane Protein-1</i>
LAMP-2	– <i>Lysosome Associated Membrane Protein-2</i>
LC-MS	– cromatografia líquida acoplada à um espectrômetro de massas
LC-MS/MS	– <i>Liquid chromatography tandem-mass spectrometry</i>
LLC-MK2	– <i>Rhesus Monkey Kidney Epithelial Cells</i>
m/z	– razão massa/carga
MALDI-TOF	– <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight</i>
mAmp	– Mili amperes
MAP	– <i>Mitogen Activated Protein</i>
MASP	– <i>Mucin-Associated Surface Protein</i>
MEF	– <i>Mouse Embryonic Fibroblast</i>
min	– Minutos
mL	– Mililitros
MOI	– <i>Multiplicity Of Infection</i>
MS/MS	– <i>Tandem-mass spectrometry</i>
MW	– <i>Molecular weight</i>
NDR	– Não diferencialmente regulada
OPB	– Oligopeptidase B
PB	– Processos biológicos
PBS	– <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBS ^{+/+}	– <i>Phosphate Buffered Saline</i> com íons cálcio e magnésio
PCA	– Análise de componente principal
PCR	– <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFA	– Paraformaldeído
pH	– Potencial hidrogeniônico
PI-3/Akt	– <i>Phosphatidylinositol-3/ V-akt murine thymoma viral oncogene</i>

PPD	– p-Fenilenodiamina
ppm	– Partes Por Milhão
PTMs	– Modificações pós-traducionais
QEHF	– <i>Q Exactive HF – Orbitrap</i>
RNA	– <i>Ribonucleic Acid</i>
RPLC	– <i>Reversed-Phase Liquid Chromatography</i>
SAP	– <i>Serine-, Alanine-, and Proline-rich protein</i>
SDS	– <i>Sodium dodecyl sulfate</i>
Suc-LLVY-AMC	– <i>N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-Amido-4-Methylcoumarin</i>
TA	– Temperatura Ambiente
TAE	– Tampão Tris-Acetato-EDTA
TcGP	– <i>Trypanosoma cruzi Genome Project</i>
TcY-L1/2 ^{-/-}	– Tripomastigotas derivadas de células deficientes em LAMP-1 e 2
TcY-L2 ^{-/-}	– Tripomastigotas derivadas de células deficientes em LAMP-2
TcY-WT	– Tripomastigotas derivadas de células selvagens
TEAB	– Bicarbonato de trietilamônio
TESA	– <i>Trypanosoma cruzi Excreted-Secreted Antigens</i>
TFA	– Ácido trifluoroacético
TMT	– <i>Tandem Mass Tag</i>
TS	– super família gp85/ <i>trans</i> -sialidase
TS/SAPA	– <i>Trans-sialidase/Shed Acute-Phase Antigen</i>
TSK-TSC	– <i>The Institute for Genomic Research–Seattle Biomedical Research Institute–Karolinska Institutet Trypanosoma cruzi Sequencing Consortium</i>
TSSA	– <i>Trypomastigote Small Surface Antigen</i>
UV	– Ultravioleta
v/v	– volume por volume
WB	– <i>Western Blot</i>
WT	– <i>Wild Type</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
Figura 2. Fases clínicas da doença de Chagas.....	25
Figura 3. Representação esquemática das moléculas presentes na superfície da célula hospedeira e na superfície de formas tripomastigotas do parasito possivelmente envolvidas na interação parasito-célula hospedeira.....	26
Figura 4. Esquema da estrutura das proteínas LAMP-1 e LAMP-2 e sua localização no lisossomo.	31
Figura 5. Estrutura química das etiquetas isobáricas.....	35
Figura 6. Taxa de adesão de tripomastigotas TcY-WT, TcY-L1/2 ^{-/-} e TcY-L2 ^{-/-} .60	
Figura 7. Taxa de invasão de tripomastigotas TcY-WT, TcY-L1/2 ^{-/-} e TcY-L2 ^{-/-} .62	
Figura 8. Sinal de cálcio induzido por tripomastigotas TcY-WT, TcY-L1/2 ^{-/-} e TcY-L2 ^{-/-}	64
Figura 9. Ensaio de indução de micro lesões à membrana plasmática de células hospedeiras por tripomastigotas TcY-WT, TcY-L1/2 ^{-/-} e TcY-L2 ^{-/-}	65
Figura 10. Análise de componente principal (PCA).....	68
Figura 11. Análise GO de componente celular do proteoma da fração enriquecida em membrana de tripomastigotas TcY-WT, TcY-L1/2 ^{-/-} e TcY-L2 ^{-/-}	68
Figura 12. Histogramas representativos da distribuição normal das razões de abundância das proteínas.	70
Figura 13. Proteínas diferencialmente reguladas nos proteomas de tripomastigotas TcY-L1/2 ^{-/-} e TcY-L2 ^{-/-} comparativamente ao proteoma de tripomastigotas TcY-WT.	73
Figura 14. Análise de enriquecimento GO em nível de processos biológicos nos subproteomas regulados de tripomastigotas TcY-L1/2 ^{-/-} ou TcY-L2 ^{-/-}	78
Figura 15. Análise de enriquecimento GO em nível de processos biológicos no subproteoma regulado de tripomastigotas TcY-L1/2 ^{-/-}	82
Figura 16. Reatividade de anticorpo anti-trans-sialidase ao extrato proteico de tripomastigotas derivadas de fibroblastos selvagens e deficientes em LAMP..	83
Figura 17. Ensaio de zimografia em gelatina.....	84
Figura 18. Cinética enzimática da atividade de cisteíno proteases e serino proteases.	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de proteínas do subproteoma regulado com predição de domínios transmembrana, âncora-GPI, secretadas classicamente ou não classicamente, e enzimas.....	71
Tabela 2. Importantes proteínas de superfície reguladas em tripomastigotas TcY-L1/2 ^{-/-} e TcY-L2 ^{-/-} em comparação às tripomastigotas TcY-WT	72
Tabela 3. Termos GO de processos biológicos enriquecidos nas proteínas negativamente reguladas em TcY-L1/2 ^{-/-} em relação à TcY-WT.....	75
Tabela 4. Termos GO de processos biológicos enriquecidos nas proteínas positivamente reguladas em TcY-L2 ^{-/-} em relação à TcY-WT	77
Tabela 5. Número de proteínas preditas com domínios transmembrana, âncora-GPI, secretadas classicamente ou não classicamente, e enzimas identificadas como reguladas nos parasitos TcY-L1/2 ^{-/-} em comparação às tripomastigotas TcY-L2 ^{-/-}	79
Tabela 6. Importantes proteínas de superfície reguladas em tripomastigotas TcY-L1/2 ^{-/-} em comparação às tripomastigotas TcY-L2 ^{-/-}	80
Tabela 7. Termos GO de processos biológicos negativamente enriquecidos em TcY-L1/2 ^{-/-} em relação à TcY-L2 ^{-/-}	81

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	O <i>Trypanosoma cruzi</i> e seu ciclo de vida	21
1.2	A doença de Chagas, seus aspectos clínicos e epidemiológicos	23
1.3	A interação parasito-célula hospedeira e o ciclo intracelular do <i>T. cruzi</i>	25
1.4	Proteínas lisossomais, o ciclo intracelular e a infecção celular pelo <i>T. cruzi</i>	30
1.5	Proteômica e <i>T. cruzi</i>	33
2	JUSTIFICATIVA	40
3	OBJETIVOS	43
	Objetivo Geral	43
	Objetivos Específicos:	43
4	MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1	Cultivo e manutenção de células das linhagens LLC-MK2 e L6	45
4.2	Cultivo de fibroblastos murinos	45
4.3	Cultivo de formas tripomastigotas	46
4.4	Monitoramento das culturas para contaminação com <i>Mycoplasma</i> sp.	47
4.5	Avaliação dos fibroblastos para fenótipo deficiente para LAMP	47
4.6	Ensaio de invasão celular do <i>T. cruzi</i>	48
4.7	Ensaio de adesão celular do <i>T. cruzi</i>	49
4.8	Ensaio de injúria celular causada por parasitos derivados de fibroblastos selvagens e deficientes em LAMP	49
4.9	Ensaio de sinalização de cálcio	50
4.10	Ensaio de zimografia em gelatina	50
4.11	Ensaio de cinética enzimática	51
4.12	Western Blotting	51

4.13	Obtenção da fração enriquecida em proteínas de membrana	52
4.14	Marcação de peptídeos com <i>tags</i> TMT	53
4.15	Cromatografia em fase reversa de alto pH.....	54
4.16	LC–MS/MS e análise de dados	54
4.17	Disponibilidade dos dados proteômicos	56
4.18	Métodos estatísticos.....	56
5	RESULTADOS	59
5.1	Parasitas liberados de células LAMP-1/2 ^{-/-} ou LAMP-2 ^{-/-} apresentam capacidade de adesão celular alterada em relação àqueles liberados por células WT	
	59	
5.2	A taxa de invasão celular também é alterada em parasitos liberados de células LAMP-1/2 ^{-/-} ou LAMP-2 ^{-/-} em relação aos liberados de células WT, porém não se correlaciona à taxa de adesão celular.....	60
5.3	A sinalização de cálcio desencadeada pelos distintos parasitos se correlaciona com o perfil de invasão nos diferentes tipos celulares estudados....	
	63	
5.4	O perfil de micro lesão celular mostrou correlação direta com o perfil de indução de cálcio pelos diferentes parasitos nos distintos tipos celulares	64
5.5	Parasitas liberados de células LAMP-1/2 ^{-/-} ou LAMP-2 ^{-/-} apresentam perfis subproteômicos distintos em relação a parasitos liberados de células WT.....	66
5.6	Parasitas liberados de células LAMP-1/2 ^{-/-} ou LAMP-2 ^{-/-} apresentam perfis subproteômicos distintos entre si	78
5.7	O perfil proteolítico de tripomastigotas liberadas de células deficientes em LAMP é diferente do de tripomastigotas liberadas de células selvagens para LAMP	
	83	
6	DISCUSSÃO	87
7	CONCLUSÕES	96
	REFERÊNCIAS	97
	ANEXO I – Documento de submissão do manuscrito	111
	ANEXO II – Manuscrito submetido de primeira autoria	112

ANEXO III – Lista de publicações em coautoria durante o período de doutorado

143

1. INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A tripanossomíase americana, popularmente conhecida como doença de Chagas, foi descoberta em 1909 pelo médico Dr. Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (CHAGAS, 1909). Carlos Chagas não somente descreveu a doença, mas também seu agente etiológico, o protozoário parasito *Trypanosoma cruzi* (nomeado em homenagem ao seu amigo, Dr. Oswaldo Cruz), bem como identificou seu vetor de transmissão, um inseto hematófago popularmente conhecido como barbeiro (CHAGAS, 1909). Atualmente a Doença de Chagas é considerada uma doença tropical negligenciada que, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021), estima-se que cerca de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas pelo *T. cruzi*, estando a maioria em países da América Latina e que há um alto número de pessoas em risco devido à falta de diagnóstico.

1.1 O *Trypanosoma cruzi* e seu ciclo de vida

O protozoário flagelado parasito, *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), apresenta dois hospedeiros em seu ciclo de vida, um inseto vetor da subfamília Triatominae e um vertebrado mamífero (CHAGAS, 1909; COURA; BORGES-PEREIRA, 2010). Atualmente, apesar da dificuldade de seu correto delineamento, são reconhecidos três ciclos de transmissão do *T. cruzi*: um ciclo silvestre, um doméstico e um peridoméstico (OCAÑA-MAYORGA et al., 2021). No ciclo silvestre, ciclo original da doença, participam mais de duzentas espécies entre hospedeiros mamíferos e triatomíneos silvestres (ARGOLO et al., 2008). O ciclo do parasito nestes animais se apresenta como uma rede dinâmica de transmissão que pode ou não se sobrepor (GUHL, 2017; JANSEN; ROQUE; XAVIER, 2017; MILES; FELICIANGELI; DE ARIAS, 2003). O ciclo de transmissão do *T. cruzi* mais estudado, ocorrendo a participação do homem, animais sinantrópicos e triatomíneos domiciliares (ARGOLO et al., 2008), pode ser definido como: (i) ciclo doméstico, quando a transmissão envolve preferencialmente humanos e triatomíneos domiciliados (GUHL, 2017; OCAÑA-MAYORGA et al., 2021), e (ii) ciclo peridoméstico que ocorre entre triatomíneos infestando construções ao redor do domicílio humano e animais domésticos (OCAÑA-MAYORGA et al., 2021; WALTER et al., 2007). Por ser o ciclo de transmissão mais esclarecido, as informações aqui descritas sobre o ciclo do *T. cruzi* referem-se ao ciclo doméstico.

Em seu ciclo de vida (Figura 1), o *T. cruzi* se apresenta sob quatro formas distintas sendo elas: epimastigota, tripomastigota metacíclica, amastigota e tripomastigota sanguínea. A forma epimastigota, flagelada, é multiplicativa e encontrada no intestino de triatomíneos. As formas epimastigotas provêm de formas tripomastigotas sanguíneas ingeridas pelo inseto vetor durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado com o parasito. Na ampola retal do inseto vetor, as formas epimastigotas se diferenciam novamente em formas tripomastigotas, denominadas agora tripomastigotas metacíclicas, que são formas flageladas e infectantes para o hospedeiro vertebrado. As formas tripomastigotas metacíclicas são expelidas juntamente com as fezes e urina pelo hospedeiro invertebrado, durante o repasto sanguíneo, e ganham acesso ao hospedeiro vertebrado através de micro lesões em sua pele ou através das mucosas. Uma vez no hospedeiro vertebrado, as formas tripomastigotas possuem a habilidade de infectar uma grande variedade de células nucleadas de seu hospedeiro vertebrado, onde se diferenciam na forma multiplicativa com flagelo não proeminente, conhecida como amastigota. Esta última se multiplica ocupando todo o citoplasma da célula hospedeira até que se diferencia novamente na forma tripomastigota, neste caso denominada de tripomastigota sanguínea. As tripomastigotas liberadas pelas células hospedeiras ganham a corrente sanguínea e podem novamente invadir outras células nucleadas bem como também serem ingeridas por um novo inseto vetor, completando assim o ciclo de vida do parasito (BRENER, 1973). Os múltiplos ciclos de infecção das células nucleadas do hospedeiro pelo parasito caracterizam a fase aguda da doença de Chagas (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010).

Além da transmissão através das fezes de insetos-vetores da subfamília Triatominae (CHAGAS, 1909), a infecção por *T. cruzi* também pode ocorrer por vias alternativas, como transfusão sanguínea, transplante de órgãos infectados, congênita (pela placenta ou pelo canal do parto), oral (pela ingestão de comida ou bebida contaminada com o inseto infectado com o parasito ou com as fezes do mesmo) ou em acidentes de laboratório envolvendo o parasito (revisado por COURA, 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). Nos últimos anos tem sido demonstrado, a partir de modelos murinos de infecção chagásica, que o parasito também pode ser transmitido por via sexual (revisado por GOMES et al., 2019). Machos e fêmeas de camundongos infectados por *T. cruzi* foram capazes de transmitir sexualmente o

parasito para parceiros não infectados (ARAUJO et al., 2017) assim como também foram encontradas formas infectantes, tripomastigotas, no sêmen de machos infectados (ALARCÓN et al., 2011).

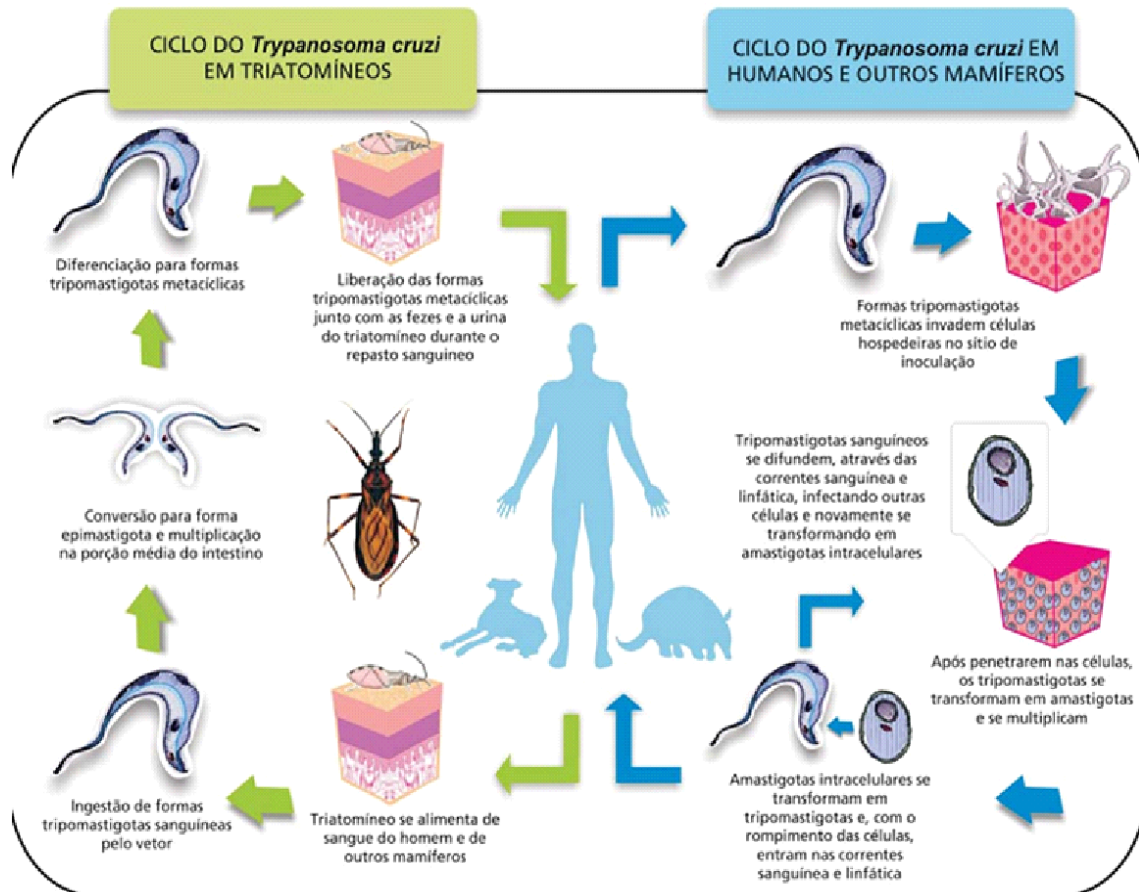


Figura 1. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* (adaptado de ARGOLO et al., 2008).

1.2 A doença de Chagas, seus aspectos clínicos e epidemiológicos

Devido às formas alternativas de transmissão e à recente globalização, com aumento de migração de populações (incluindo pessoas infectadas), o número de casos da doença vem aumentando em regiões não endêmicas, como Europa, América do Norte e Ásia (SCHMUNIS; YADON, 2010) e alguns países do Mediterrâneo Oriental e Pacífico Ocidental (revisado por (GUHL; RAMÍREZ, 2021)).

No período inicial da infecção observa-se uma alta parasitemia e amplo parasitismo tecidual, além de uma forte resposta imune (Figura 2), caracterizando a fase aguda da infecção. A fase aguda, pode ser assintomática ou ainda manifestar-se por meio de febre, dores de cabeça, aumento das glândulas linfáticas e palidez

(RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010¹ apud RASSI; RASSI; REZENDE, 2012; ORTIZ et al., 2018). Normalmente, o sistema imune do hospedeiro é capaz de controlar a parasitemia, cerca de 2-3 meses após a infecção, mas é incapaz de eliminar completamente o parasito, ocorrendo assim a evolução da infecção para a fase crônica da doença (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010¹ apud RASSI; RASSI; REZENDE, 2012). A fase crônica pode se dá em duas formas: a forma determinada e a forma indeterminada. Na forma determinada da doença, podem surgir manifestações clínicas graves, devido a parasitas presentes na musculatura cardíaca e digestiva, com quadros de cardiomiopatia, megaesôfago e/ou megacólon que caracterizam as formas cardíaca e digestiva da doença de Chagas (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010). Devido à destruição do músculo cardíaco e consequente perda de função, a infecção pelo *T. cruzi* também pode levar à morte súbita (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018^{2,3} apud CORREIA et al., 2021). A fase indeterminada, no entanto, é definida pela ausência de manifestações clínicas, radiológicas ou eletrocardiográficas do coração ou do aparelho digestivo em pessoas cronicamente infectadas pelo *T. cruzi* (RIBEIRO; ROCHA, 1998). Quando submetidas a testes cardiovasculares mais avançados, essas pessoas podem apresentar anormalidades significativas (RIBEIRO; ROCHA, 1998).

¹ RASSI, A.Jr.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J.A. Chagas disease. *Lancet*, 375:1388–402, 2010.

² PÉREZ-MOLINA, J.A.; MOLINA, I. Chagas disease. *The Lancet*, 391 (10115), 82–94, 2018.

³ PÉREZ-MOLINA, J.A.; MOLINA, I. Chagas disease cardiomyopathy treatment remains a challenge – Authors' reply. *The Lancet*, 391 (10136); 2209–2210, 2018.

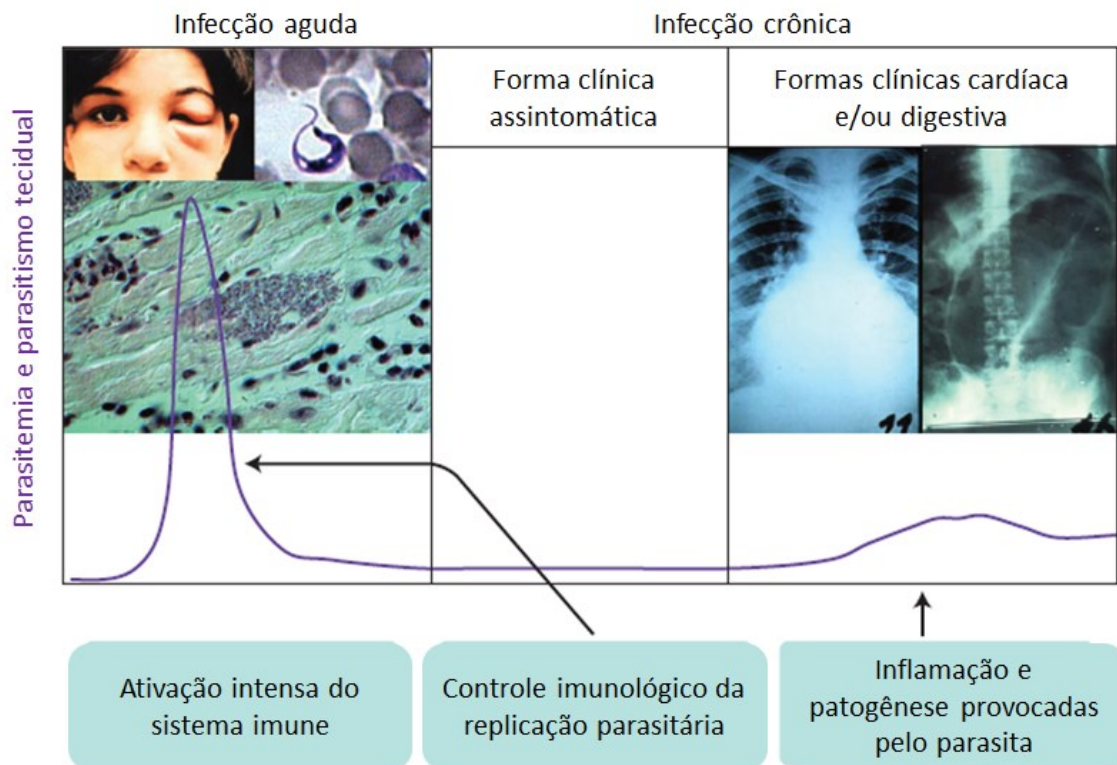


Figura 2. Fases clínicas da doença de Chagas (adaptado de JUNQUEIRA et al., 2010).

1.3 A interação parasito-célula hospedeira e o ciclo intracelular do *T. cruzi*

O ciclo intracelular do parasito inicia-se pela invasão da célula hospedeira pelas formas infectivas, tripomastigotas, através da interação e reconhecimento dessas formas do parasito por moléculas de superfície na membrana da célula hospedeira. Essa interação pode ocorrer por meio de ligantes presentes na superfície do parasito ou secretados por ele no meio extracelular (Figura 3), os quais induzem vias de sinalização que culminam com a internalização do parasito em um vacúolo endocítico, denominado vacúolo parasitóforo (revisado por ANDRADE; ANDREWS, 2005; BARRIAS; DE CARVALHO; DE SOUZA, 2013; FERNANDES; ANDREWS, 2012).

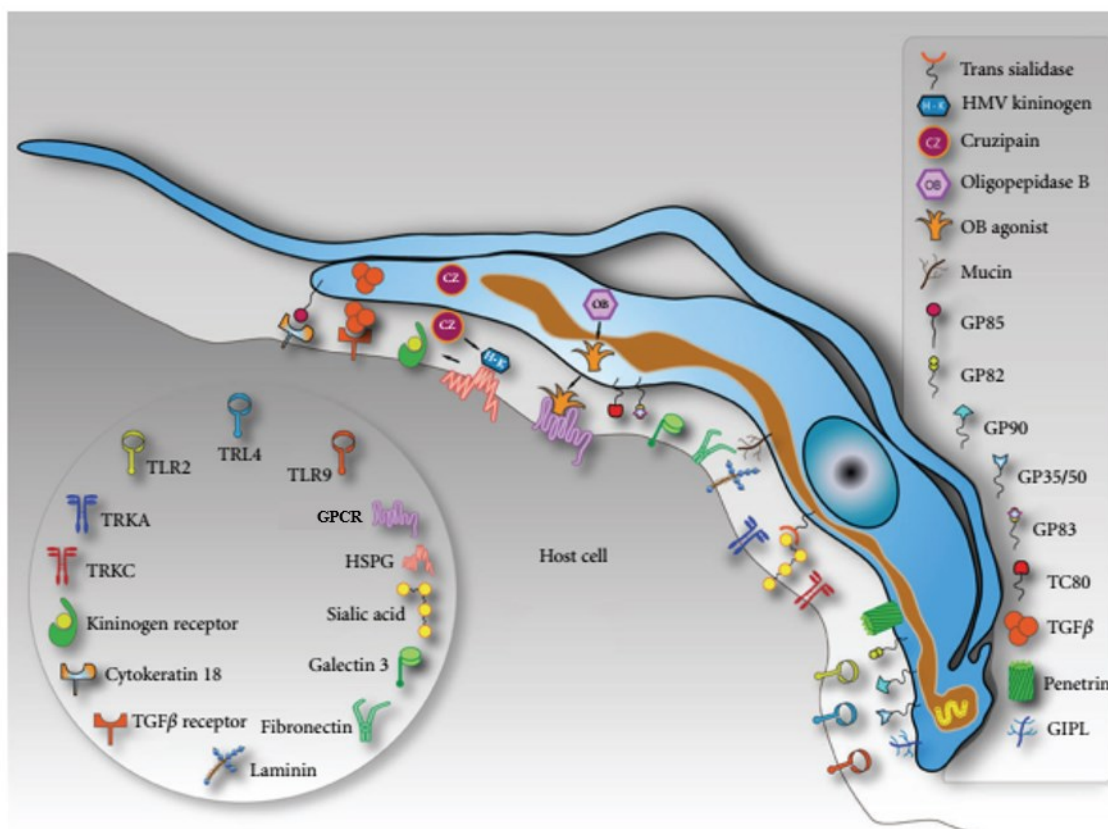


Figura 3. Representação esquemática das moléculas presentes na superfície da célula hospedeira e na superfície de formas tripomastigotas do parasito possivelmente envolvidas na interação parasito-célula hospedeira (Adaptado de DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010).

Acredita-se que qualquer classe de moléculas expostas na superfície da célula hospedeira tenha potencial para ser um receptor de *T. cruzi*. Alguns carboidratos como, galactosil, manosil e sialil, presentes na membrana plasmática das células hospedeiras de mamíferos, são internalizados com o parasito (BARBOSA; DE MEIRELLES, 1992), sugerindo-se que podiam atuar como receptores. Ademais, foi demonstrado que alterações na quantidade destes glicosídeos na superfície celular podiam também alterar o padrão de invasão do parasito na célula (CIAVAGLIA; DE CARVALHO; DE SOUZA, 1993).

Os receptores de bradicinina são também uma classe de receptores utilizados por tripomastigotas para invadir células de mamíferos. Esses receptores são acoplados à proteína heterotrimérica G e são formados por dois subtipos: o receptor de bradicinina 2 (B2R – *bradicin-2 receptor*), que é constitutivamente expresso por células cardiovasculares, e o receptor de bradicinina 1, cuja expressão é regulada positivamente nos tecidos lesados (SCHARFSTEIN et al., 2000). A superexpressão do B2R em células CHO revelou que a invasão de tripomastigotas é modulada por

atividades combinadas de cininógenos, cininogenases e peptidases degradantes de cinina. Através dele, as tripomastigotas desencadeiam transientes de cálcio intracelular que podem auxiliar no processo de invasão por este parasito (revisado por DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010).

Por outro lado, dentre as proteínas do parasito já identificadas como importantes moléculas envolvidas com o processo de invasão celular, podemos destacar os membros da super família gp85/*trans*-sialidase (TS), como gp82, gp90, gp35/50 (estes últimos com menor importância), os quais foram correlacionados com o início da infecção por formas tripomastigotas (EGIMA et al., 1996; WESTON; PATEL; VAN VOORHIS, 1999). Além dessas, outras proteínas de superfície como mucinas, *mucin-associated surface proteins* (MASP), cruzipaina, gp63, e *serine-alanine- proline-rich proteins* (SAP) também já foram demonstradas participar, direta ou indiretamente, do processo de infecção celular pelo *T. cruzi* (revisado por WALKER et al., 2013; WATANABE COSTA; DA SILVEIRA; BAHIA, 2016). Entre outras funções, as *trans*-sialidases são enzimas descritas como de grande importância para a adesão do parasito à célula hospedeira. Essas enzimas promovem a transferência de resíduos de ácido siálico α -2,3-ligado a glicoconjugados presentes na célula hospedeira para moléculas de mucinas presentes na membrana do parasito. Estas últimas compõem uma grande família de proteínas de superfície altamente glicosiladas, ancoradas na superfície da membrana por GPI (ANDREWS et al., 1987; SCHENKMAN et al., 1991, 1992). A adesão do parasito à célula hospedeira, a partir da sialilação de sua superfície, desencadeia sinalizações através da ativação de vias diferentes como PI-3 quinase/Akt, MAP quinase e ERK (revisado por WALKER et al., 2013).

Algumas das moléculas presentes na superfície do parasito ou secretadas por ele, participam do processo de adesão e internalização do *T. cruzi*, por desencadear uma sinalização dependente de cálcio (Ca^{2+}), importante para o processo de invasão da célula hospedeira por este parasito (revisado por BURLEIGH; ANDREWS, 1998). Entre as moléculas conhecidas por induzir sinalização celular estão a cruzipaina, um fator solúvel de estrutura indefinida, o pequeno antígeno de superfície de tripomastigotas (TSSA – *Trypomastigote Small Surface Antigen*) e as já mencionadas, *trans*-sialidases (revisado por PECH-CANUL; MONTEÓN; SOLÍS-OVIEDO, 2017).

A cruzipaina é expressa em todas as formas do parasito e em diferentes cepas (MURTA et al., 1990; PAIVA et al., 1998) e sua alta abundância não se correlaciona com a infectividade do parasito (PAIVA et al., 1998). Participa no processo de internalização e no desenvolvimento intracelular do *T. cruzi* (MEIRELLES et al., 1992), sendo sua principal cisteína protease. Atua sobre o quininogênio celular, gerando bradicinina que, após o reconhecimento pelo B2R desencadeia o influxo Ca^{2+} mediado por IP3 (fosfatidilinositol 3,4,5-3-fosfato), como mencionado anteriormente (SCHARFSTEIN et al., 2000).

O fator solúvel de estrutura desconhecida foi identificado como sendo um componente produzido pela ação de uma enzima citosólica de *T. cruzi*, intimamente relacionada a família de prolil oligopeptidases, denominada oligopeptidase B (OPB) (BURLEIGH et al., 1997). Este componente, gerado a partir de uma molécula precursora no citoplasma de tripomastigotas seria exportado e funcionaria como um agonista de Ca^{2+} após ser reconhecido por um receptor alvo na célula hospedeira. A ativação deste receptor leva à ativação da fosfolipase C e produção de IP3, induzindo a liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático (CALER et al., 1998). Caler e colaboradores (2000), mostraram que tripomastigotas deficientes em OPB possuem uma capacidade menor de invadir as células e uma atividade de indução de sinal de Ca^{2+} de baixa intensidade (CALER et al., 2000). No entanto, sua propriedade para induzir elevação de cAMP nas células hospedeiras era ainda preservada (RODRÍGUEZ et al., 1995).

Peptídeos baseados no TSSA se ligam às células hospedeiras, induzindo sinalização de Ca^{2+} (CÁNEPA et al., 2012) e desempenhando um importante papel não só na infectividade, bem como na variabilidade fenotípica do *T. cruzi* (CÁMARA et al., 2017). O TSSA é uma molécula parecida com as mucinas e é rico em serina e treonina, predominantemente O-glicosiladas (DI NOIA et al., 2002). No entanto, não é uma molécula estruturalmente ou funcionalmente relacionada às GPI-mucinas de tripomastigotas (CÁMARA et al., 2017). Sua expressão é restrita à superfície de tripomastigotas infectivas, derivadas de células, e funcionam como uma adesina envolvendo receptores na célula hospedeira (BALOUZ et al., 2015).

Muitas dessas proteínas envolvidas com o processo de invasão celular pelo *T. cruzi* e presentes na superfície do parasito podem ser também liberadas no meio extracelular em uma forma solúvel ou associadas à membrana, através de vesículas

extracelulares ou microvesículas (revisado por WATANABE COSTA; DA SILVEIRA; BAHIA, 2016).

A invasão celular pelo *T. cruzi* envolve o reconhecimento do parasito pela célula hospedeira, e uma sinalização de cálcio que induz uma série de eventos que culminam com sua internalização no meio intracelular. Primeiramente, foi descrito que a sinalização de cálcio promove o recrutamento de lisossomos para o local de entrada do parasito e, conseqüentemente, sua fusão com a membrana celular (TARDIEUX et al., 1992), doando membrana para a formação do vacúolo parasitóforo. Mais tarde, demonstrou-se que o parasito subverte o mecanismo de reparo de membrana celular para invadir a célula hospedeira. Este mecanismo envolve a fusão dos lisossomos à membrana plasmática da célula hospedeira, mediada por cálcio, ocasionando a liberação de esfingomielinase ácida, uma enzima lisossomal que, através da clivagem da esfingomielina presente na membrana celular, gera ceramida (TAM et al., 2010). A ceramida é um lipídeo que favorece a deformação da membrana e, por consequência, estimula a endocitose, levando à internalização das porções danificadas da membrana plasmática (HOLOPAINEN et al., 2000⁴ apud ANDREWS; ALMEIDA; CORROTTE, 2014). Essa endocitose, decorrente da exocitose de lisossomos, é denominada endocitose compensatória, que no processo de reparo de membrana internaliza a porção contendo a injúria, levando à recuperação da integridade da membrana (ZHA et al., 1998⁵ apud ANDREWS; ALMEIDA; CORROTTE, 2014). Corrotte e colaboradores (2013) observaram que as caveolas também desempenham papel no reparo de membrana e que a inibição de caveolina-1 (Cav-1) ou a depleção de colesterol inibem o reparo de membrana. Os autores propõem que após a exocitose lisossômica, disparada pelo Ca^{2+} , e a liberação de esfingomielinase ácida, as vesículas derivadas das caveolas se moveriam dentro das células enquanto passam por um processo de fusão homotípica, o que resultaria em grandes compartimentos de origem endocítica (CORROTTE et al., 2013).

No caso do *T. cruzi*, a endocitose, estimulada pela ceramida, promove a internalização do parasito na célula hospedeira (FERNANDES et al., 2011 e revisado por FERNANDES; ANDREWS, 2012). A internalização do parasito via a endocitose

⁴ HOLOPAINEN, J. M. et al. Vectorial budding of vesicles by asymmetrical enzymatic formation of ceramide in giant liposomes. *Biophys. J.*, 78 pp. 830-838, 2000.

⁵ ZHA, X. et al. Sphingomyelinase treatment induces ATP-independent endocytosis. *J. Cell Biol.*, 140, pp. 39-47, 1998.

compensatória, induzida pela secreção de lisossomos, promove a formação de um vacúolo contendo membrana plasmática e lisossomal (FERNANDES et al., 2011). Após a entrada, mais lisossomos vão se fundindo até que toda a superfície do vacúolo se encontra positiva para marcadores lisossomais. A fusão de lisossomos é crucial para a viabilidade da infecção já que promove a retenção dos parasitos, impedindo que os mesmos escapem da célula hospedeira (ANDRADE; ANDREWS, 2004).

Após algum tempo de residência no vacúolo, o qual pode variar dependendo da cepa do parasito e da célula infectada (ANDRADE; ANDREWS, 2004, 2005b), os parasitos escapam para o citosol da célula, se transformam na forma amastigota e iniciam seu processo de multiplicação intracelular. O conteúdo ácido dos lisossomos fornece o ambiente ideal para o escape do vacúolo e posterior replicação do parasito no citosol da célula (revisado por ANDRADE; ANDREWS, 2005). O pH ácido do lisossomo parece favorecer a atividade de uma hemolisina com ação lítica, possivelmente secretada pelo parasito e que permite a formação de poros na membrana do vacúolo parasitóforo (ANDREWS; WHITLOW, 1989). Esses poros permitiriam o escape do parasito para o citosol, após o rompimento da membrana vacuolar (ANDREWS et al., 1990 e revisado por ROMANO et al., 2012). Além disso, a remoção dos resíduos de ácido siálico de proteínas presentes na membrana do lisossomo, pela ação das *trans*-sialidases, também participa do processo de rompimento do vacúolo parasitóforo (HALL et al., 1992). Foi demonstrado que a taxa de atividade de *trans*-sialidase pode interferir na velocidade de escape do parasito de seu vacúolo parasitóforo (RUBIN-DE-CELIS et al., 2006). Parasitos superexpressores de *trans*-sialidases ativas escapam mais rápido do vacúolo parasitóforo para o citosol celular (RUBIN-DE-CELIS et al., 2006). Livre no citosol da célula, a forma tripomastigota se transforma na forma multiplicativa, amastigota, colonizando a célula e dando continuidade ao ciclo de vida do *T. cruzi*.

1.4 Proteínas lisossomais, o ciclo intracelular e a infecção celular pelo *T. cruzi*

O lisossomo é uma importante organela para o sucesso da infecção celular pelo *T. cruzi* (TARDIEUX et al., 1992) e para sua retenção na célula hospedeira (ANDRADE; ANDREWS, 2004). Os lisossomos possuem glicoproteínas em sua membrana, ricas em ácido siálico, conhecidas como LAMP (*Lysosome-Associated*

Membrane Protein), a qual se apresenta sob duas isoformas principais, LAMP-1 e LAMP-2 (CHEN et al., 1985; KORNFELD; MELLMAN, 1989). Ambas isoformas consistem em um polipeptídeo, cuja maior parte encontra-se no lúmen do lisossomo e que é conectada a um domínio transmembrana, o qual se conecta a uma pequena cauda citoplasmática (Figura 4; ESKELINEN; TANAKA; SAFTIG, 2003). Embora estruturalmente muito parecidas, suas sequências divergiram precocemente ao longo da evolução (MATTEI et al., 1990), sendo o grau de similaridade entre as isoformas em torno de 37%, fato comprovado pela localização de suas sequências em cromossomos diferentes (revisado por FUKUDA, 1991).

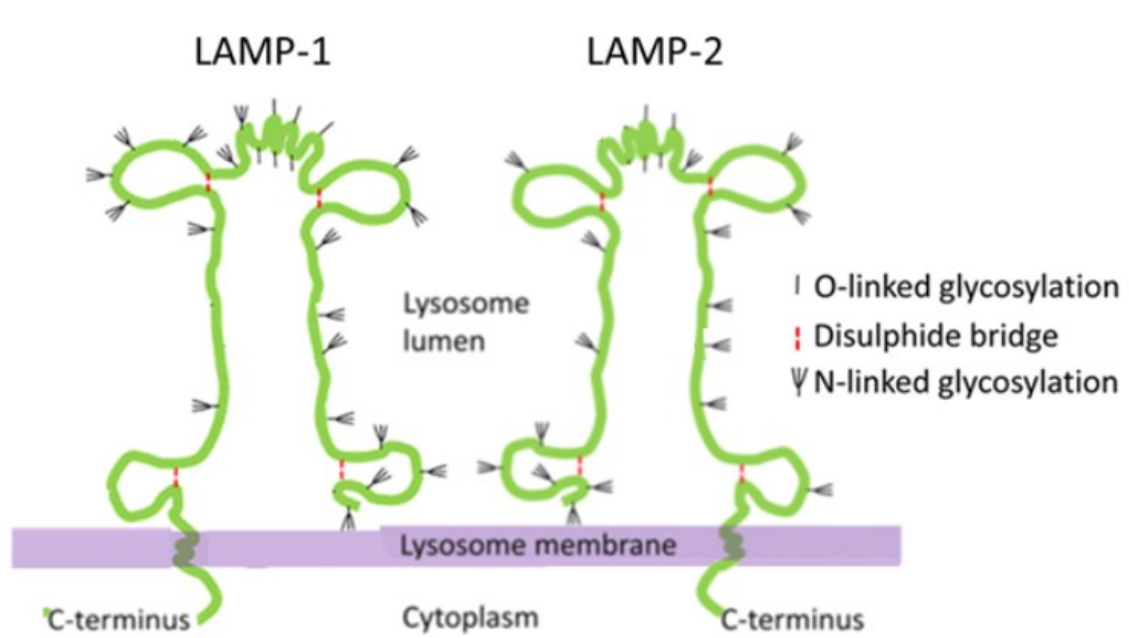


Figura 4. Esquema da estrutura das proteínas LAMP-1 e LAMP-2 e sua localização no lisossomo (adaptado de ESKELINEN; TANAKA; SAFTIG, 2003).

Andrejewski e colaboradores (1999) observaram que camundongos deficientes para LAMP-1 embora férteis, viáveis e com propriedades lisossomais normais, apresentavam alterações na imunorreatividade cerebral a Catepsina-D e uma leve astrogliose regional. Os autores ainda observaram um aumento nos níveis de LAMP-2 nos rins, baço e coração desses camundongos, inclusive em tecidos que possuíam apenas LAMP-1, indicando que os mecanismos podem estar correlacionados e que os níveis elevados de LAMP-2 compensaram a deficiência de LAMP-1 (ANDREJEWSKI et al., 1999). Por outro lado, a deficiência em LAMP-2 causou severos sintomas nos animais levando-os a morte 20-40 dias após o nascimento.

Observou-se nesses camundongos, um acúmulo e aumento no número de vacúolos autofágicos em tecidos como fígado, coração, rim e músculo esquelético, além do aumento na meia vida de autofagossomos em hepatócitos (TANAKA et al., 2000). Nestes hepatócitos, a degradação de proteínas de longa vida é prejudicada. Estes fatos foram atribuídos a uma deficiência na reciclagem do receptor da manose 6-fosfato de 46 kDa dos endossomos de volta à rede *trans*-Golgi (ESKELINEN et al., 2002).

Animais deficientes em LAMP-1 e LAMP-2 morrem ainda em estágio embrionário (ESKELINEN et al., 2004). Seus tecidos apresentam muito mais vacúolos citoplasmáticos do que os animais selvagens e grande parte desses vacúolos é autofágica e apresentam atrasos nas etapas finais de maturação (ESKELINEN et al., 2004). A capacidade fagocítica de células deficientes em LAMP-1 e LAMP-2 é normal. No entanto, ocorre um atraso na maturação das vesículas endocíticas comprometendo a fusão com vesículas lisossomais (HUYNH et al., 2007). Esses autores ligaram esta deficiência com uma menor mobilidade dos lisossomos, provavelmente por uma dificuldade no recrutamento de proteínas motoras.

Estudos recentes, realizados pelo nosso grupo, vêm demonstrando que estas proteínas desempenham papéis importantes no curso da infecção pelo *T. cruzi*. Um destes estudos mostrou que células deficientes para as proteínas LAMP-1 e LAMP-2 são menos permissivas à entrada do *T. cruzi* quando comparadas às células com fenótipo selvagem (ALBERTTI et al., 2010). Por outro lado, Albertti e colaboradores (2010) também observaram que após 72 horas de infecção, as células deficientes em LAMP-1 e LAMP-2 apresentavam um número maior de parasitos em seu citoplasma quando comparado às células selvagens, indicando que nas células deficientes em LAMP o desenvolvimento intracelular do parasito é favorecido. Este perfil de invasão e multiplicação intracelular em células deficientes em LAMP-1 e LAMP-2 não é específico para cepas do parasito, uma vez que as cepas Y (Tc-II) e CL (Tc-VI) apresentaram resultados similares (ALBERTTI et al., 2010). Mais recentemente, demonstrou-se que apenas a ausência de LAMP-2 é suficiente para induzir o fenótipo defectivo de invasão celular observado para células deficientes em LAMP-1 e LAMP-2 (COUTO et al., 2017). Neste estudo, Couto e colaboradores demonstraram que células deficientes em LAMP-2 eram capazes de realizar a exocitose de lisossomos, porém apresentavam um comprometimento na endocitose compensatória, a qual

efetivamente promove a internalização do parasito. De fato, essas células quando eram submetidas a injúria mecânica apresentavam um maior número de células mortas, indicando que seu processo de reparo de membrana, subvertido pelo parasito durante a invasão celular, estava prejudicado. Este defeito na endocitose compensatória foi demonstrado ser decorrente da diminuição de caveolina observada na superfície celular, já que regiões de caveola são consideradas importantes neste processo (CORROTTE et al., 2013). Em paralelo, foi demonstrado acúmulo de colesterol no interior de células deficientes em proteínas LAMP (ESKELINEN et al., 2004; SCHNEEDE et al., 2011). É possível que estas alterações observadas em células deficientes em LAMP-1 e LAMP-2 possam contribuir para diferenças no comportamento intracelular do parasito, como observado para sua taxa de multiplicação intracelular, ou mesmo levar a alterações no perfil de parasitos liberados por essas células, em relação àqueles liberados por células selvagens.

1.5 Proteômica e *T. cruzi*

Embora o genoma completo do *T. cruzi* tenha sido publicado apenas em 2005 por El-Sayed e colaboradores, o projeto de sequenciamento do genoma (*Trypanosoma cruzi* Genome Project – TcGP) teve seu início em meados dos anos 90, sendo a cepa CL Brener a escolhida para o genoma de referência do parasito (CANO et al., 1995). Durante o Simpósio Internacional *Problemática de la Enfermedad de Chagas* (Problema da Doença de Chagas) em 1999, portanto cerca de 5 anos após o início do TcGP, o Dr. Mariano Levin discutiu as contribuições e perspectivas que o projeto traria sobre a Doença de Chagas e seu agente etiológico. Uma dessas contribuições seria a possibilidade de se estudar as proteínas do parasito, portanto o seu proteoma, usando técnicas como gel bidimensional e espectrometria de massas (LEVIN, 1999).

O proteoma de um organismo pode ser definido como todo complemento proteico expresso por um genoma em um determinado momento (WILKINS et al., 1996), ou por um tecido ou tipo celular. O proteoma, além de apresentar uma complexidade importante, visto que não existe a relação um gene = uma proteína, também é dinâmico e pode se modificar sob diferentes condições, inclusive distinguindo-se em diferentes tecidos em um único organismo (WILKINS et al., 1996).

Os estudos de proteomas são conduzidos de acordo com duas abordagens classificadas como *bottom-up* ou *top-down* (CHAIT, 2006). A abordagem do tipo *bottom-up* visa analisar peptídeos tripticos e é a abordagem mais empregada nos estudos atuais (CHAIT, 2006; DUPREE et al., 2020). A abordagem do tipo *top-down*, por sua vez, visa analisar e caracterizar proteínas intactas, sendo mais vantajosa em estudos de modificações pós-traducionais (PTMs) e/ou proteoformas pois possibilita uma menor perda de sítios contendo PTMs de interesse (CATHERMAN; SKINNER; KELLEHER, 2014; CHAIT, 2006).

O *shotgun*, uma das abordagens do tipo *bottom-up* (WU; MACCOSS, 2002), utiliza-se da vantagem de que peptídeos são mais facilmente separados por cromatografia líquida de fase reversa (RPLC – *reversed-phase liquid chromatography*), apresentam uma boa ionização (ROGERS; BOMGARDEN, 2016) e fragmentam de maneira mais previsível do que proteínas. Dessa forma, esta abordagem tem como etapa inicial a digestão enzimática, normalmente realizada com tripsina, de amostras biológicas proteicas complexas (DUPREE et al., 2020). Após a digestão, os peptídeos tripticos gerados são separados por RPLC, gradualmente eluídos da coluna cromatográfica, ionizados, fragmentados via MS/MS, e a análise de sua razão massa/carga (m/z) e sequência predita são usados para identificar as proteínas presentes nas amostras, a partir de buscas em bancos de dados (DUPREE et al., 2020).

Outra vantagem da abordagem do tipo *shotgun* é a possibilidade de quantificar, de forma absoluta ou relativa, proteínas através da marcação dos peptídeos tripticos com etiquetas isobáricas. Atualmente, existem duas opções de etiquetas, *Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification* (iTRAQ) (ROSS et al., 2004) e *Tandem Mass Tag* (TMT) (THOMPSON et al., 2003). Essas *tags* consistem em marcar os peptídeos de diferentes amostras biológicas com etiquetas que apresentam a mesma massa. O grupo amino reativo da *tag* reage com aminas primárias da porção N-terminal dos peptídeos e na cadeia lateral dos resíduos de lisina e, durante a fragmentação do peptídeo no espectrômetro de massa, essa ligação é quebrada, liberando um íon repórter, cuja a intensidade representa a abundância relativa do peptídeo original (Figura 5) (ROSS et al., 2004; THOMPSON et al., 2003). Uma das várias vantagens do uso dessas *tags* é a possibilidade de analisar simultaneamente até 16 grupos experimentais e aumentar a qualidade dos espectros MS/MS,

aumentando assim a taxa de identificação dos peptídeos fragmentados (THOMPSON et al., 2019).

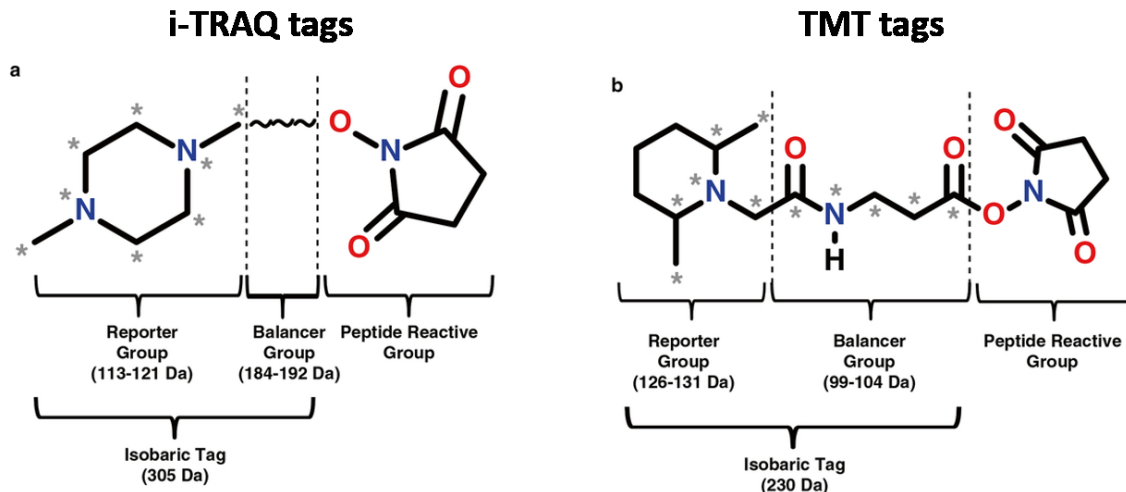


Figura 5. Estrutura química das etiquetas isobáricas. A estrutura geral para ambos (A) i-TRAQ 8-plex e (B) TMT 6-plex consiste em um grupo repórter passível de clivagem no MS, um grupo balanceador de tamanho variável para manter as etiquetas isobáricas, e um grupo reativo para marcar o peptídeo. Os asteriscos indicam as posições de C₁₃ e N₁₅ dos isótopos pesados os quais são usados para gerar os íons repórteres de vários tamanhos. As linhas verticais pontilhadas indicam as ligações que quebram durante a marcação (linhas à direita) e ligações que quebram durante a fragmentação no MS2 (linhas à esquerda). (Figura adaptada de CHENG et al., 2016. *Nota: à época da publicação desta figura, a estrutura do grupo balanceador do i-TRAQ 8-plex ainda não havia sido publicada).

Em um espectrômetro de massas, as moléculas de interesse são ionizadas a partir de uma fonte de ionização, analisadas por um analisador de massas capaz de separar a sua relação m/z e os íons são detectados gerando sinais elétricos que, por sua vez, produzem espectros de massas. Atualmente, as análises de proteomas são realizadas em instrumentos híbridos, ou seja, instrumentos que combinam dois tipos de analisadores de massa, como o *Q Exactive HF hybrid quadrupole-Orbitrap* da empresa Thermo Scientific. Este instrumento é um analisador de massas de alta acurácia e alta resolução capaz de atingir um poder de resolução até 240000 com acurácia na medição da massa menor do que 1 ppm (interno) e 3 ppm (externo), além de analisar amostras biológicas complexas de forma rápida e sensível (um ciclo completo em menos de 1 seg com resolução de 60000). O *Q Exactive* combina o analisador do tipo *ion trap* com o analisador do tipo Orbitrap, além de ter um filtro de massa do tipo quadrupolo acoplado, possibilitando rápida fragmentação de peptídeos por dissociação induzida por colisão com alta energia, também conhecida como

dissociação por colisão de alta energia (HCD – *high energy collisional dissociation*). Essas características do Q *Exactive* fazem deste instrumento bastante interessante para análises proteômicas, uma vez que combina a análise no Orbitrap de íons fragmentados por HCD e a fragmentação de diferentes precursores de massas pelo quadrupolo (MICHALSKI et al., 2011).

O primeiro estudo do proteoma de *T. cruzi* foi publicado em 2004 por Paba e colaboradores e tinha seu foco voltado para o processo de amastigogênese, o processo de transição da forma tripomastigota para a amastigota, usando técnicas de gel bidimensional, análise computacional e espectrometria de massas baseada em MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight*) (PABA et al., 2004a). O MALDI-TOF consiste em um espectrômetro de massas onde a amostra é depositada sobre um *spot* em uma placa de aço inoxidável, coberta com uma matriz e pulsos de laser UV ocasionam uma rápida dessorção/ionização das proteínas da amostra. Os íons gerados sobem através de um tubo de metal a vácuo até chegar em um detector, com íons menores voando mais rápido do que íons maiores. As proteínas separadas de acordo com seu tempo de voo criam um espectro formado pela relação m/z versus intensidade que é então analisado (PIELES et al., 1993). Embora o número de sequências de *T. cruzi* disponíveis à época ainda fosse reduzido, os autores conseguiram identificar várias proteínas do parasito, como proteínas *heat shock*, fatores de alongação, enzimas da via glicolítica e também proteínas estruturais (PABA et al., 2004a).

Ainda em 2004, o grupo também publicou o primeiro estudo do proteoma do parasito não baseado em técnicas eletroforéticas (PABA et al., 2004b). Para este estudo utilizou-se tecnologia baseada em ICAT (*Isotope-Coded Affinity Tag*), que consiste em marcar os peptídeos tripticos gerados, portanto digeridos com tripsina, com isótopos leves e pesados. Diferentemente do primeiro estudo, os autores utilizaram a técnica de LC-MS/MS (*Liquid chromatography tandem mass spectrometry*) que consiste em uma cromatografia líquida acoplada à um espectrômetro de massas (LC-MS) e também permite a fragmentação dos peptídeos em uma segunda análise MS para melhor diferenciação dos mesmos. Nesse trabalho, os autores identificaram 41 proteínas de *T. cruzi* com alta confiança que incluíam enzimas metabólicas, componentes paraflagelares, tubulinas e também proteínas *heat shock* (PABA et al., 2004b).

No ano de 2005, Atwood e colaboradores publicaram a análise do proteoma das quatro formas de vida de *T. cruzi* usando a técnica de LC-MS/MS (ATWOOD et al., 2005). Os autores conseguiram identificar 2784 proteínas totais do parasito, das quais 1008 correspondiam a sequências gênicas anotadas como hipotéticas. Além disso, os autores também fizeram uma análise de potenciais genes perdidos nas anotações provenientes do Tc-GP que revelou 79 novos genes, novos alelos ou modificações às anotações já existentes, portanto sugerindo que as anotações do consórcio *The Institute for Genomic Research–Seattle Biomedical Research Institute–Karolinska Institutet Trypanosoma cruzi Sequencing Consortium* (TSK-TSC) eram bastante eficientes (ATWOOD et al., 2005). Dessa análise menos de 15 genes haviam sido de fato perdidos na anotação inicial do sequenciamento (ATWOOD et al., 2005).

Nos últimos anos, alguns trabalhos se dedicaram a estudar subproteomas de membrana do parasito ou proteínas secretadas/excretadas pelo parasito, também conhecidos como secretoma ou exoproteoma (BAYER-SANTOS et al., 2013; BROSSAS et al., 2017; CORDERO et al., 2009; MANDACARU et al., 2019; QUEIROZ et al., 2013, 2014, 2016; WAGNER et al., 2013). Em sua maioria, esses trabalhos se fazem importantes para o entendimento do amplo repertório de proteínas secretadas ou presentes na membrana do parasito que atuam na adesão e infecção de células hospedeiras, no escape do sistema imune hospedeiro ou que podem também modular o metabolismo do organismo hospedeiro. Além disso, trabalhos como de Brossas e colaboradores (2017) que analisou o secretoma de duas cepas de *T. cruzi* (VD e CL Brener – ambas DTU-TcVI) possibilita a descoberta de novos marcadores moleculares para diagnóstico e contribuem significativamente para um entendimento mais aprofundado da biologia do parasito.

O sequenciamento e a anotação do genoma cepas de *T. cruzi* pertencentes aos diferentes DTUs (*discrete typing units*) como o clone DM28c DTU-TcI (BERNÁ et al., 2018; GRISARD et al., 2014), e as cepas SylvioX10/1 DTU-TcI (FRANZÉN et al., 2011), TCC DTU-TcVI (BERNÁ et al., 2018), BUG2148 DTU-TcV, Brazil DTU-TcI (WANG et al., 2021) e Y DTU-TcII (CALLEJAS-HERNÁNDEZ et al., 2018; WANG et al., 2021) contribuíram e vêm contribuindo de forma relevante para novas pesquisas e permitem análises mais apuradas e precisas do perfil proteômico (incluindo-se subproteomas, fosfoproteomas e glicoproteomas) deste parasito (ALVES et al., 2017;

AMORIM et al., 2017; AVILA et al., 2018; HERREROS-CABELLO et al., 2019; MULE et al., 2021; WATANABE COSTA et al., 2020).

A compreensão de diferenças moleculares entre cepas do parasito abre portas para descoberta de novos marcadores, proteínas relevantes para invasão e desenvolvimento do ciclo do parasito, além de auxiliar na descoberta de proteínas que podem ser potenciais alvos para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da Doença de Chagas.

2. JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

A doença de Chagas é uma doença tropical negligenciada ainda sem vacina disponível e os tratamentos disponíveis ainda são pouco eficazes no tratamento da doença crônica e causam efeitos colaterais indesejáveis (BUSTAMANTE; TARLETON, 2015; CAZORLA et al., 2015; GUPTA; GARG, 2015; URBINA; DOCAMPO, 2003; WILKINSON et al., 2008). Dessa forma, faz-se cada vez mais necessária a descoberta de moléculas-alvo para o desenvolvimento de fármacos e vacinas contra seu agente etiológico, o *T. cruzi*. A compreensão dos mecanismos envolvidos na interação parasito-hospedeiro e dos mecanismos celulares subvertidos pelo parasito podem auxiliar nesta descoberta. Como descrito anteriormente neste volume, sabe-se que o *T. cruzi* subverte o mecanismo de reparo de membrana para invadir suas células hospedeiras (FERNANDES et al., 2011). A interação do parasito com a célula induz uma sinalização de Ca^{2+} através de micro lesões e/ou da interação de moléculas do parasito com receptores da célula hospedeira (WALKER et al., 2013). Essa sinalização leva a uma excitose de lisossomos e a subsequente endocitose compensatória culmina na internalização do parasito.

Trabalhos anteriores do nosso grupo, mostraram que a ausência da proteína lisossomal LAMP-2 interfere na entrada do parasito, uma vez que impacta nos processos de reparo de membrana da célula (COUTO et al., 2017). As células deficientes em LAMP-2 apresentam uma alteração na distribuição de caveolina na superfície celular, um marcador de caveolas que são balsas de membrana importantes para o processo de endocitose compensatória que, por sua vez, faz parte do processo de reparo de membrana (CORROTTE et al., 2013). Outros trabalhos do nosso grupo também mostraram que tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* apresentam uma maior multiplicação intracelular em células deficientes para as isoformas de LAMP (LAMP-1 e LAMP-2) (ALBERTTI et al., 2010; PEDERSANE, 2014).

Dos Santos e colaboradores (2012) mostraram que tripomastigotas derivadas de tipos celulares distintos apresentam uma infectividade diferente entre si e maior para as células das quais se derivaram. Ou seja, pequenas alterações no ambiente celular são capazes de induzir mudanças nas características do parasito podendo impactar em sua interação com as células. Adicionalmente, dados anteriores do nosso

grupo, obtidos durante meu mestrado, sugerem que o ambiente intracelular pode modular o parasito em um período de tempo bem menor do que aquele estabelecido por Dos Santos e colaboradores. Estes dados mostraram que uma única passagem em ambientes intracelulares distintos seria suficiente para induzir mudanças biológicas em parasitos da cepa Y de *T. cruzi* mudando o seu perfil de invasão em fibroblastos e células epiteliais (OLIVEIRA, 2017).

Diante desses dados, nos indagamos se o ambiente intracelular ausente em LAMP, poderia induzir, não somente alterações na capacidade de infecção do *T. cruzi* e, portanto, modular sua interação com diferentes tipos celulares, mas também se tais mudanças poderiam estar correlacionadas ao conjunto de proteínas localizadas na superfície do parasito. Essas proteínas, por apresentarem funções similares, possivelmente refletem na ampla capacidade do parasito de se aderir, invadir e internalizar em diferentes tipos de células hospedeiras, e escapar das defesas do sistema imune hospedeiro (BUSCAGLIA et al., 2006; FERGUSON, 1999; GAZZINELLI; DENKERS, 2006; MCCONVILLE; FERGUSON, 1993; MCCONVILLE; MENON, 2000).

Compreender as alterações que um ambiente intracelular distinto induz no *T. cruzi* é um importante passo para o melhor entendimento de sua interação com a célula hospedeira, bem como de sua biologia. Dentro disso, correlacionar as alterações proteicas com o perfil biológico dos parasitos pode auxiliar em uma melhor compreensão de moléculas e mecanismos envolvidos com a invasão e infecção celular pelo *T. cruzi*.

3. OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Caracterizar, em nível biológico e molecular (via análise proteômica), formas tripomastigotas de *T. cruzi* provenientes de fibroblastos selvagens (WT), deficientes apenas em LAMP-2 (LAMP2^{-/-}) e deficientes em ambas isoformas de LAMP, LAMP-1 e LAMP-2 (LAMP1/2^{-/-}).

Objetivos Específicos

- i. Avaliar a taxa de adesão e invasão de tripomastigotas provenientes de fibroblastos WT, LAMP2^{-/-} e LAMP1/2^{-/-} (TcY-WT, TcY-L2^{-/-} e TcY-L1/2^{-/-}, respectivamente) em células da linhagem de mioblastos L6 e comparar com as taxas de invasão encontradas para fibroblastos selvagens;
- ii. Caracterizar quantitativamente a sinalização de cálcio, em diferentes linhagens celulares (mioblastos L6 e fibroblastos WT), induzidas por tripomastigotas TcY-WT, TcY-L2^{-/-} e TcY-L1/2^{-/-}, e correlacionar com a taxa de invasão celular;
- iii. Caracterizar quantitativamente o perfil de micro lesões na membrana plasmática de diferentes linhagens celulares (mioblastos L6 e fibroblastos WT) induzidas por tripomastigotas TcY-WT, TcY-L2^{-/-} e TcY-L1/2^{-/-}, e correlacionar com a taxa de invasão celular;
- iv. Determinar a abundância diferencial de proteínas de tripomastigotas TcY-WT, TcY-L2^{-/-} e TcY-L1/2^{-/-};
- v. Comparar e selecionar proteínas que possam auxiliar no entendimento interação entre parasito e célula hospedeira;
- vi. Avaliar o perfil proteolítico de extratos proteicos de tripomastigotas TcY-WT, TcY-L2^{-/-} e TcY-L1/2^{-/-}.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultivo e manutenção de células das linhagens LLC-MK2 e L6

Células da linhagem LLC-MK2, células epiteliais de rim de macaco (HULL; CHERRY; TRITCH, 1962) e células da linhagem de mioblastos L6 (YAFFE, 1968) foram mantidas em cultivo em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium/high glucose* - Invitrogen) suplementado com 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco) e 10% de soro fetal bovino (Gibco), inativado a 56°C por 30 min. Após a obtenção de uma monocamada de células em garrafa de cultivo celular de 75 cm², as células foram lavadas com PBS (*Phosphate Buffered Saline*), tripsinizadas com solução de Tripsina-EDTA 0,05% (Gibco) e ressuspensas com meio DMEM. As células foram semeadas na proporção 1:10 para manutenção do cultivo e, no caso das células LLC-MK2, também na proporção de 1:20 para a infecção com os parasitos. Todas as culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. As células foram rotineiramente testadas para contaminação com *Mycoplasma* sp (TIMENETSKY et al., 2006) por meio de PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

4.2 Cultivo de fibroblastos murinos

Linhagens de fibroblastos embrionários obtidas a partir de embriões de camundongos C57BL6 tipo selvagem (WT), deficientes para LAMP-2 (LAMP-2^{-/-}) ou deficientes para ambas isoformas de LAMP, LAMP-1 e LAMP-2 (LAMP-1/2^{-/-}), espontaneamente imortalizados em cultura, foram gentilmente cedidas pelo grupo do Professor Paul Saftig (*Biochemisches Institut/Christian-Albrechts-Universität Kiel, Alemanha*). Uma monocamada subconflente de cada uma das linhagens (WT, LAMP-2^{-/-} ou LAMP-1/2^{-/-}) foi mantida em garrafas de cultivo celular de 25 cm², em meio DMEM suplementado com 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco) e 10% de soro fetal bovino (Gibco). As células foram ressemeadas três vezes por semana e mantidas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. As células foram rotineiramente testadas para contaminação com *Mycoplasma* sp por meio de PCR.

4.3 Cultivo de formas tripomastigotas em células LLC-MK2

Tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y (DTU TcII) (ZINGALES et al., 2009) foram utilizadas para infectar monocamadas de células da linhagem LLC-MK2, cultivadas como descrito anteriormente (item 1). As células foram infectadas com 3×10^6 parasitos por cerca de 24 hs e mantidas em meio DMEM suplementado com 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco) e 2% de soro fetal bovino (Gibco) a 37 °C e atmosfera úmida com 5% de CO₂ (ANDREWS et al., 1987). Durante o cultivo, tanto as células hospedeiras quanto os parasitos foram testados por PCR para detectar contaminação por *Mycoplasma* sp. e utilizados nos experimentos somente quando negativos para este teste.

4.4 Cultivo de formas tripomastigotas em células fibroblastos murinos

Tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y (DTU TcII) (ZINGALES et al., 2009) foram utilizadas para infectar fibroblastos murinos selvagens, deficientes em LAMP-1 E LAMP-2 ou somente em LAMP-2, cultivados como descrito anteriormente (item 2). Garrafas de cultivo celular de 175 cm² foram semeadas no dia anterior na proporção de 1:10 ou 1:5, de acordo com o ritmo de crescimento das células, e então infectadas com 3×10^6 parasitos por cerca de 24 hs. Após a retirada do meio contendo os parasitos remanescentes, as culturas foram mantidas em meio DMEM suplementado com 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco) e 2% de soro fetal bovino (Gibco) a 37 °C e atmosfera úmida com 5% de CO₂ (ANDREWS et al., 1987). Devido à alta replicação dos parasitos em células deficientes em LAMP, após o sexto/sétimo dia de cultivo há uma alta abundância de amastigotas presentes no meio extracelular e, adicionalmente, os fibroblastos selvagens apresentam uma alta tendência a desaderir da garrafa quando em monocamada. Por esse motivo, os parasitos foram coletados e utilizados nos experimentos entre o quinto e sexto dia após a infecção, coincidindo com o pico de liberação dos parasitos nessas células. Durante o cultivo, tanto as células hospedeiras quanto os parasitos foram testados por PCR para detectar contaminação por *Mycoplasma* sp. e utilizados nos experimentos somente quando negativos para este teste.

4.5 Monitoramento das culturas para contaminação com *Mycoplasma* sp.

Testes para averiguar a existência de contaminação por *Mycoplasma* sp. nas culturas celulares de LLC-MK2, L6, de fibroblastos e nas formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram realizados utilizando-se iniciadores descritos por (TIMENETSKY et al., 2006), para amplificar parte do gene da subunidade 16S do RNA ribossomal de qualquer espécie do gênero *Mycoplasma*, pelo método de PCR. Aproximadamente 500 µL da suspensão de células ou de tripomastigotas foram coletados e aquecidos a 80°C por 15 min em banho-maria. Para a PCR foram utilizados 1 µL da suspensão de células aquecida, tampão *Green GoTaq* 1X (Promega), 200 µM de dNTPs (dTTP, dATP, dGTP e dCTP), 2 µM do iniciador MGSO [TGACCATCTGTCACCTCTGTAAACCTC] e 2 µM do iniciador GPO3 [GGGAGCAAACAGGATAGATACCCT] e 1,25 U de Taq DNA Polimerase (Phonetrria) para cada 30 µL de reação. As reações foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, 40 ciclos de 94°C por 1 min, anelamento dos iniciadores a 55°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min e, por último, extensão final a 72°C por 10 min. O produto da PCR foi separado por eletroforese em gel de agarose 1% a 100 V em tampão TAE 1X (4,8 g/L de Tris-base pH 8,0; 1,14 mL de ácido acético glacial; 2 mL de EDTA 0,5 M), contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizado por exposição à luz UV.

4.6 Avaliação dos fibroblastos para fenótipo deficiente para LAMP

Para assegurar o fenótipo selvagem ou deficiente para LAMP dos fibroblastos cultivados os fibroblastos foram avaliados bimensalmente. Para tanto, os fibroblastos foram plaqueados sobre lamínulas na proporção de 5×10^4 células por poço, em placas de 24 poços, em duplicata para cada tipo celular. Após 24 hs, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% (PFA 4%) em PBS suplementado com $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$ (*Phosphate Buffered Saline* contendo 0,133 g/L CaCl_2 e 0,1 g/L de MgCl_2 - $\text{PBS}^{+/+}$) durante 30 min, a temperatura ambiente (TA), lavadas 3 vezes com $\text{PBS}^{+/+}$, incubadas por 20 min com $\text{PBS}^{+/+}$ contendo 2% de Soro-albumina Bovina (BSA – *Bovine Serum Albumine* – Invitrogen) e 0,5% de Saponina (PBS/BSA 2%/Saponina 0,5%). Posteriormente, as lamínulas foram incubadas por 45 min, a TA, com anticorpo anti-

Lamp-1 ou anti-Lamp-2 diluídos 1:50 em PBS/BSA 2%/Saponina 0,5%. As lamínulas foram lavadas 3x com PBS/BSA 2%/Saponina 0,5%, incubadas por 30 min, a TA, com anticorpo anti-rato conjugado com Alexa 488 diluído 1:250 em PBS/BSA 2%/Saponina 0,5%, novamente lavadas 3x com PBS/BSA 2%/Saponina 0,5%, lavadas 3x com PBS^{+/+}, coradas por 1 min com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole - Invitrogen) diluído 1:1000 em PBS^{+/+} e lavadas 3x com PBS^{+/+}, quando foram então montadas sobre lâmina em gel de montagem *anti-fading* (PPD-*p-Fenilenodiamina* 0,1% em solução de glicerol:Tris1,5M–9:1). As lâminas foram visualizadas e analisadas em microscópio de fluorescência.

4.7 Ensaios de invasão celular do *T. cruzi*

Para os ensaios de invasão celular, células da linhagem L6 foram plaqueadas na proporção de 1×10^5 células por poço, em placas de 24 poços, 24 hs antes da exposição aos parasitos derivados de fibroblastos WT, LAMP-1/2^{-/-} ou LAMP-2^{-/-} (TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} e TcY-L2^{-/-}, respectivamente) a uma MOI de 50, por 40 min a 37°C. Logo após a exposição aos parasitos, as células foram lavadas com PBS^{+/+} aquecido a 37°C, para retirada dos parasitos não internalizados e fixadas com PFA 4% *overnight* a 4°C.

Para a marcação com anticorpos específicos, as lamínulas foram retiradas do fixador e lavadas 3x com PBS^{+/+}, em seguida incubadas durante 20 min, a TA, em PBS/BSA 2%. Para a identificação dos parasitos extracelulares remanescentes, as lamínulas foram incubadas por 50 min, a TA, com anticorpo primário anti-*T. cruzi* (soro de coelho infectado com formas tripomastigotas de *T. cruzi*, como previamente descrito – ANDREWS et al., 1987), diluído 1:500 em PBS/BSA 2%. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas 4x com PBS/BSA 2% e incubadas durante 40 min, a TA, com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com Alexa Fluor 546 (Alexa Fluor 546 *goat anti-rabbit* IgG, Molecular Probes), diluído 1:500 em PBS/BSA 2%. Em seguida, as lamínulas foram lavadas 3x com PBS/BSA 2% e mais 3x com PBS^{+/+}. O DNA da célula e do parasito foram marcados por incubação com DAPI diluído 1:1000 em PBS^{+/+} durante 1 min, a TA, e então as lamínulas foram lavadas com PBS^{+/+} para a montagem sobre lâmina para microscopia com gel de montagem *anti-fading*

contendo PPD. As lâminas foram analisadas em microscopia de fluorescência, onde foram contabilizadas no mínimo 250 células para cada replicata experimental.

4.8 Ensaios de adesão celular do *T. cruzi*

Os ensaios de adesão celular foram realizados segundo protocolo descrito anteriormente (SCHENKMAN; DIAZ; NUSSENZWEIG, 1991), com algumas adaptações. Células da linhagem L6 foram plaqueadas em placas de 24 poços, sendo cerca de 5×10^4 células por poço, e 24 hs depois lavadas 2x com HBSS (*Hanks' Balanced Salt Solution*) aquecido. Em seguida, as células foram pré-fixadas com glutaraldeído 2% (Sigma) em PBS^{+/+} por 5 min à 4°C. Seguindo esta etapa, as células foram lavadas com PBS e incubadas durante 24 hs em solução de etanolamina a 0,16 M pH 8,3. Após esta incubação, as células foram lavadas 3x com PBS e 1x com DMEM/BSA 0,2%. Posteriormente, as células foram mantidas em contato com tripomastigotas TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} ou TcY-L2^{-/-} em DMEM/BSA 0,2% por 40 min a 37°C, MOI 50. As células foram lavadas com HBSS para a retirada dos parasitos não aderidos, fixadas com PFA 4%, coradas com panótico rápido e analisadas em microscópio óptico.

4.9 Ensaios de injúria celular causada por parasitos derivados de fibroblastos selvagens e deficientes em LAMP

Para os ensaios de injúria celular, fibroblastos selvagens ou células da linhagem L6 ou fibroblastos selvagens (WT) foram plaqueadas em uma concentração de 5×10^4 células por poço, em placas de 24 poços, e 24 hs depois expostas por 30 min às seguintes condições: 1. meio de cultura somente; 2. meio de cultura contendo iodeto de propídeo (10 ug/mL); 3. meio de cultura contendo iodeto de propídeo (10 ug/mL) e raspagem das células – controle positivo de injúria; 4. meio contendo iodeto de propídeo (10 ug/mL) e parasitos TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} ou TcY-L2^{-/-} a uma MOI de 100. Após o período de exposição, as células foram lavadas 1x com PBS, tripsinizadas (na condição 3, as células foram apenas raspadas), coletadas em um tubo para citometria e levadas para análise em citometria de fluxo (FACS Scan, Benton Dickinson). Os dados foram analisados no software FlowJo v.10.1 (Tree Star, Inc.).

4.10 Ensaios de sinalização de cálcio

Para estes ensaios, fibroblastos selvagens ou células da linhagem L6 foram plaqueadas, na concentração de $2,5 \times 10^4$ células por divisão em placas confocais de 4 divisões. Após 24 hs, as células foram incubadas com solução contendo sensor de cálcio fluorescente (5 μ M de Fluo-4/AM (Thermo Fisher), 0,01% de ácido plurônico e 2,0 mM de Probenecid (Sigma)), por 50 min a 37 °C. Após esta etapa, as células foram expostas às seguintes condições: 1. somente meio DMEM 2%; 2. ionomicina (5 μ M); 3. parasitos provenientes dos diferentes tipos celulares (WT, LAMP-1/2^{-/-} ou LAMP-2^{-/-} - MOI 100). As células hospedeiras foram analisadas em microscópio confocal (Nikon), a partir do recurso de *time lapsing*, onde foram fotografadas por 600 segundos sem intervalos. As mudanças na concentração do cálcio intracelular foram expressas como o *fold change* da intensidade de fluorescência da sonda de acordo com a equação (F/F_0), onde F é a fluorescência no pico máximo e F_0 é a fluorescência base (OLIVEIRA et al., 2015; PINTO et al., 2013).

4.11 Ensaios de zimografia em gelatina

Para estes ensaios, extratos proteicos brutos dos parasitos TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} e TcY-L2^{-/-} foram produzidos em banho de gelo a partir da lise mecânica por sucessivas passagens (cerca de 12 vezes) em seringa de insulina e em tampão de lise contendo 5 mM Tris-HCl pH 8.0 (Sigma), 10% glicerol (Sigma), 1 mM EDTA (Sigma), 1 mM DTT (Promega) e 10 mM de inibidores de protease (cOmplete Mini EDTA-free – Roche). Os extratos foram dosados pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Os ensaios foram então realizados como descrito anteriormente (LEBER; BALKWILL, 1997) com algumas modificações. Cerca de 12,5 μ g de proteínas foram carregados em gel de poliacrilamida 12% copolimerizada a uma concentração final de 1 mg/mL de gelatina, usando tampão de amostra não redutor. A eletroforese das proteínas deu-se a 125 V, 50-60 mA/gel, em banho de gelo. Os géis foram então incubados com solução de renaturação contendo 2,5% (v/v) Triton X-100 (Sigma) por 30 min a temperatura ambiente sob leve agitação, seguido de uma etapa de incubação com tampão de desenvolvimento (40 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 , 0,2%

(v/v) Triton X-100, pH 7.5) por 30 min a temperatura ambiente sob leve agitação. Após essas etapas, os géis foram incubados por 24 hs a 37°C com tampão de desenvolvimento fresco sob leve agitação. Os géis foram então corados com Coomassie Brilliant Blue R-250 por 1h, seguido de descoloração com solução contendo 10% metanol e 5% ácido acético para visualização das bandas negativas. Como padrão de peso molecular foi utilizado *Prestained SDS-PAGE Standards, broad range* (Bio-Rad). As intensidades das bandas foram quantificadas usando o software ImageJ e expressas como o *fold change* de pixels em relação à média de leitura dos pixels de TcY-WT.

4.12 Ensaios de cinética enzimática

Para avaliar a atividade enzimática de cisteíno e serino-proteases em tripomastigotas TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} e TcY-L2^{-/-}, os extratos celulares foram descritos no item anterior e 5 µg de proteínas totais foram misturadas com 50 µM do substrato fluorogênico para caspase-like Ac-YVAD-AFC (N-Acetyl-Tyr-Val-Ala-Asp-7-amido-4-trifluoromethylcoumarin – #A9965 – Sigma-Aldrich) ou 13 µM do substrato fluorogênico para quimotripsina-like Suc-LLVY-AMC (N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-Amido-4-Methylcoumarin – #S6510 – Sigma-Aldrich). As reações foram feitas em tampão contendo 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM MgCl₂ e 1 mM DTT, na presença ou ausência de 20 uM do inibidor MG-132 (#M7449 – Sigma-Aldrich), e incubadas a 37°C do minuto 0 até 120 min com leituras a cada 20 min. As leituras foram realizadas no Synergy 2 Multi-Detection Microplate (BioTek Instruments, Inc.) com ondas de emissão de 380/20 e de excitação de 508/20 ou 440/40 para os substratos Ac-YVAD-AFC ou Suc-LLVY-AMC, respectivamente.

4.13 Western Blotting

Para avaliar o padrão de abundância de *trans*-sialidades, Western Blots (WB) usando o anticorpo anti-*trans*-sialidase mAb 39 (SCHENKMAN; PONTES DE CARVALHO; NUSSENZWEIG, 1992) foram realizados. Para cada WB, 20 µg de extrato proteico (obtido conforme descrito no item 4.10) de tripomastigotas TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} e TcY-L2^{-/-} foi resolvido por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12%,

transferido para membrana de nitrocelulose e bloqueado por 1h a TA com PBS contendo 5% leite em pó Molico® Desnatado (Nestlé). As membranas foram lavadas com PBS contendo 2,5% leite desnatado e 0,1% Tween 20 e incubadas a 4°C *overnight* com o anticorpo mAb 39 (1:1000). Após a incubação, as membranas foram lavadas com PBS contendo 2,5% leite desnatado e 0,1% Tween 20 e incubadas por 2 hs com anticorpo anti-IgGs de camundongo conjugado com peroxidase (1:2000). A reação foi evidenciada usando Novex™ ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit (Invitrogen) em um sistema ImageQuant LAS500 (GE Healthcare, Chicago, IL, USA).

4.14 Obtenção da fração enriquecida em proteínas de membrana

Para a obtenção das proteínas de membrana, aproximadamente 1×10^8 tripomastigotas provenientes dos fibroblastos selvagens ou deficientes em LAMP foram coletadas, centrifugadas a 800 g 10 min e incubadas a 37 °C por 4 hs para separação e eliminação de formas amastigotas. Esta etapa foi realizada para diminuir a contaminação da amostra por proteínas de amastigotas. Foram obtidas duplicatas para cada tipo celular com cerca de 70-80% de enriquecimento em formas tripomastigotas. As amostras foram lavadas 2x com meio DMEM sem complementações, 2x com PBS e armazenadas a -80 °C até o momento de extração das proteínas.

Para obtenção da fração enriquecida de proteínas de membrana, as amostras foram preparadas de acordo com protocolo descrito anteriormente (MELO-BRAGA et al., 2014). Brevemente, as amostras contendo as tripomastigotas foram ressuspensas em tampão de lise carbonato de sódio 0,1 M pH 11,5 suplementado com inibidores de protease (Protease Inhibitor Mix, GE Healthcare, USA) na razão de 1:100, sonicadas em banho de gelo por 2x de 20 segundos na frequência 40Hz no ruptor de células ultrassônico DES500 (Unique) e incubadas em gelo por 1 h com rotação. Posteriormente, o lisado foi ultracentrifugado a 150.000 g por 90 min a 4°C (Sorvall Ultra Pro 80 Ultracentrifuge) e o pellet contendo as proteínas de membrana foi lavado 1x com bicarbonato de trietilamônio (TEAB) 500 mM e 1x com TEAB 50 mM. O pellet contendo a fração enriquecida em proteínas de membrana foi ressuspensão em tampão ureia 6 M, tiourea 2 M, TEAB 50 mM e reduzido com dithiothreitol 10 mM

(DTT) por 1h a TA. Após a redução, os tióis livres foram alquilados com iodoacetamida 20mM (IAA) por 1h a TA no escuro. As amostras foram então digeridas por 3h a TA em uma razão 1:100 com Lys-C, posteriormente diluídas cerca de 8x com TEAB 50mM (pH 8,0) e digeridas overnight a 37°C com uma razão de 1:100 de tripsina (Promega, Madison, WI). A reação foi parada pela adição de ácido fórmico (AF; concentração final de 1%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), seguida de centrifugação à 14.000g por 10 min.

4.15 Marcação de peptídeos com *tags* TMT

Para a marcação dos peptídeos, o liofilizado, contendo cerca de 10 ug de peptídeo, como determinado usando o Qubit Protein Assay Kit (ThermoFisher), para cada *tag* TMT, foi ressuspensão em HEPES 100 mM pH 8.5. Para cada replicata biológica foi usada uma das seis *tags* TMT (126, 127N, 128N, 129N, 130N e 131N) de um kit TMT 11-plex (ThermoFisher), que contem ao total 11 *tags*. As amostras foram marcadas da seguinte forma: replicata 1 da amostra da fração enriquecida de membrana de tripomastigotas de fibroblastos selvagens (TcY-WT_1) foi marcada com a *tag* TMT 126, a replicata 2 de TcY-WT_2 foi marcada com a *tag* TMT 127N, a replicata 1 da amostra da fração enriquecida de membrana de tripomastigotas de fibroblastos deficientes em LAMP-1 e LAMP-2 (TcY-L1/2^{-/-}_1) foi marcada com a *tag* TMT 128N, a replicata 2 de TcY-L1/2^{-/-}_2 foi marcada com a *tag* TMT 129N, a replicata 1 da amostra da fração enriquecida de membrana de tripomastigotas de fibroblastos deficientes em LAMP-2 (TcY-L2^{-/-}_1) foi marcada com a *tag* TMT 130N e a replicata 2 de TcY-L2^{-/-}_2 foi marcada com a *tag* TMT 131N. Para isso, alíquotas (0,8 mg em 41 uL de acetonitrila anidra) de cada uma das *tags* foram incubadas por 2 hs a temperatura ambiente com as amostras, separadamente. As reações foram paradas pela adição de 8 uL de hidroxilamina 5% seguida de uma incubação por 15 min a temperatura ambiente. Para cada replicata biológica marcada com a *tag*, quantidades iguais, razão 1:1:1:1:1, foram misturadas e os peptídeos marcados com TMT foram purificados. Para isso, os peptídeos foram carregados em uma coluna Oasis HLB 10 mg cartridge (Waters Corporation), previamente umedecida com acetonitrila 100% e equilibrada 2x com solução aquosa 0,1% TFA (ácido trifluoroacético). Os peptídeos adsorvidos foram lavados com 2 mL de TFA 0,1% por 2x, eluídos com 300 uL de

acetonitrila 30% e 300 μ L de acetonitrila 60% e liofilizados em *SpeedVac*. Posteriormente, os peptídeos marcados foram solubilizados em solução 2% acetonitrila em 10 mM de formato de amônio pH 9.3 para cromatografia em fase reversa de alto pH.

4.16 Cromatografia em fase reversa de alto pH

Os peptídeos marcados com as *tags* TMT foram injetados em uma coluna C18 Acquity UPLC MClass CSH 1.7 μ m, 300 μ m X 100 mm (Waters), usando um sistema Dionex Ultimate 3000 HPLC. O tampão A era composto de 2% acetonitrila em 10 mM de formato de amônio pH 9.3 e o tampão B composto de 80% acetonitrila em 10 mM de formato de amônio pH 9.3. As colunas eram corridas a 5 μ L/min a 30°C, começando com 2% de tampão B, e aumentando até 40% de tampão B ao longo do curso de um gradiente linear de 27 min. O tampão B foi aumentado para 50% de por 4 min; para 70% de por 4 min; para 95% de por 10 min seguido de uma diminuição para 2% de tampão B por 1 min e essa condição mantida até o final da corrida a 71 min. As frações foram coletadas do 4 min até o 44 min com 180 seg por fração, produzindo 30 frações ao total. As frações foram concatenadas em 10 amostras, por exemplo as frações 1 (um), 11 (onze) e 21 (vinte e um) foram adicionadas ao mesmo poço de uma placa de 96 poços, e assim sucessivamente com as demais frações. As 11 amostras obtidas (sendo 10 amostras e o *flow through* – peptídeos eluídos no começo das condições iniciais da separação de alto pH) foram liofilizados em *SpeedVac* e solubilizados em AF 0,1%.

4.17 LC-MS/MS e análise de dados

As amostras foram analisadas por um sistema EASY-nano LC (Proxeon Biosystems, Odense, Denmark) acoplado *online* a um espectrômetro de massa Q Exactive HF – Orbitrap (QEHF) (Thermo Scientific, Waltham, USA). Os peptídeos de cada uma das 11 frações (2 μ g cada) foram carregados em uma coluna de sílica de 18 cm (75 μ m de diâmetro interior) empacotada *in-house* com uma resina de fase reversa ReproSil-Pur C18-AQ 3 μ m (Dr. Maisch GmbH, Germany) e eluídos usando um gradiente de 97% fase A (0.1% AF) para 28% fase B (0.1% AF, 95% acetonitrila)

por 64 min, seguido de um aumento de 28 para 45% fase B por 10 min, 45 para 100% fase B por 3 min e 100% fase B por 8 min em um total de 86 min a 250 nL/min. Após cada corrida, a coluna foi lavada com fase B e reequilibrada com fase A. Os espectros de massa foram adquiridos em um modo de íons positivos aplicando uma busca de escaneamento MS dependente de dados e aquisição de espectro de massa em *tandem* (MS/MS). Cada escaneamento MS no *Orbitrap* (faixa de massa m/z de 350–1500 e resolução 120,000 no m/z 200) foi seguido por um MS/MS dos vinte íons mais intensos (Top20). A fragmentação no QEHF foi realizada por uma dissociação por colisão de alta energia (*High energy collisional dissociation* – HCD) e íons selecionados foram dinamicamente excluídos por 20 seg. Os dados brutos foram visualizados no programa Xcalibur v.4.2 (Thermo Scientific, Waltham, USA). O processamento dos dados foi realizado usando o programa Proteome Discoverer v.2.4 (Thermo Scientific, Waltham, USA).

Os arquivos de dados brutos foram gerados e submetidos a busca usando o programa Proteome Discoverer com o algoritmo de busca SequestHT contra um banco de dados da cepa Y de *T. cruzi* (baixado e acessado em maio de 2020), contendo todas as proteínas anotadas encontradas no genoma recentemente sequenciado da cepa Y de *T. cruzi* (CALLEJAS-HERNÁNDEZ et al., 2018). Proteínas contaminantes (vários tipos de queratina humana, BSA e tripsina porcina) foram adicionadas ao banco de dados de busca e todas as proteínas contaminantes identificadas foram filtradas e removidas das listas resultantes. As buscas foram realizadas usando os seguintes parâmetros: acurácia MS de 10 ppm, acurácia MS/MS 0.02 Da, digestão com tripsina com até 2 clivagens perdidas permitidas, modificação carbamidometil da cisteína e TMT-6plex na extremidade N-terminal do peptídeo como modificações fixas, e oxidação da metionina e da lisina por TMT-6plex como modificações variáveis. O número de proteínas, grupos de proteínas e o número de peptídeos foram filtrados pela taxa de falso descobrimento (FDR – *false discovery rate*) menor do que 1%, ranqueamento 1 dos peptídeos e proteínas com no mínimo 2 peptídeos usando o programa Proteome Discoverer. O programa ProteinCenter (Thermo Scientific, Waltham, USA) foi usado para gerar arquivos no formato FASTA para as listas de grupos de proteínas de interesse. As proteínas foram consideradas como reguladas quando a sua razão de abundância (\log_2 *fold change*) foi maior do que a média adicionada de 2 vezes o desvio padrão ou menor do que a média

diminuída de 2 vezes o desvio padrão, e coeficiente de variação menor do que 40%. Predição de hélices transmembranas foram feitas usando a ferramenta *online* TMHMM v.2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>) (KROGH et al., 2001; SONNHAMMER; VON HEIJNE; KROGH, 1998) e a predição de glicosilfosfatidilinositol (GPI) foi feita usando as ferramentas *online* GPI-SOM (<http://gpi.unibe.ch/>) (FANKHAUSER; MÄSER, 2005) e big-PI Predictor (https://mendel.imp.ac.at/gpi/gpi_server.html) (EISENHABER et al., 2000; EISENHABER; BORK; EISENHABER, 1998, 1999; SUNYAEV et al., 1999). DeepLoc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/DeepLoc/index.php>) (ALMAGRO ARMENTEROS et al., 2017) foi usado para prever a localização subcelular das proteínas. A ferramenta SignalP v.5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>) (ALMAGRO ARMENTEROS et al., 2019) foi usada para prever proteínas secretadas pela via clássica ER/Golgi e a ferramenta SecretomeP v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>) (BENDTSEN et al., 2005) foi usada para prever proteínas secretadas pela via não clássica. Categorias super-representadas foram investigadas através da análise de enriquecimento de ontologia gênica (*Gene Ontology* – GO) usando a ferramenta disponível no website TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>) e os termos de GO redundantes foram sumarizados em grupos usando a ferramenta REVIGO (<http://revigo.irb.hr/>) (SUPEK et al., 2011).

4.18 Disponibilidade dos dados proteômicos

Os dados de espectrometria de massas foram depositados no *ProteomeXchange Consortium* (DEUTSCH et al., 2020) através do repositório parceiro PRIDE (PEREZ-RIVEROL et al., 2019) sob o identificador PXD028897.

4.19 Métodos estatísticos

Dados quantitativos foram representados como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes exceto quando indicado diferentemente. As análises estatísticas foram realizadas usando o programa Graph Pad Prism 7.0 através do método de *one-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Fisher's LSD (*Fisher's least significant difference*) ou através do controle da taxa de falsa descoberta (FDR – *false*

discovery rate) usando o método de Benjamini e Hochberg para múltiplas comparações. As médias foram consideradas como significativamente diferentes quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Parasitos liberados de células LAMP-1/2^{-/-} ou LAMP-2^{-/-} apresentam capacidade de adesão celular alterada em relação àqueles liberados por células WT

A adesão do parasito à célula hospedeira é considerada a etapa inicial de seu processo de invasão (ANDREWS; COLLI, 1982; PIRAS; PIRAS; HENRÍQUEZ, 1982, 1983), visto que, a interação de proteínas de superfície do parasito com proteínas de superfície da célula é importante para o desencadeamento de vias de sinalização que culminam em sua internalização (revisado por FERNANDES; ANDREWS, 2012). A ausência de LAMP (células LAMP1/2^{-/-} ou LAMP2^{-/-}) leva a uma maior multiplicação intracelular do *T. cruzi* (ALBERTTI et al., 2010), sugerindo que diferenças no ambiente intracelular são capazes de modificar o comportamento biológico intracelular do parasito. De fato, em trabalho anterior (OLIVEIRA, 2017 – dissertação de mestrado; Figura 6A), nosso grupo observou que, após um único ciclo de infecção em fibroblastos selvagens ou deficientes em LAMP, os parasitos liberados de células LAMP-1/2^{-/-} apresentavam as taxas de adesão mais baixas quando comparados aos parasitos liberados de células WT e LAMP-2^{-/-} em fibroblastos selvagens. Não foi observada diferença estatisticamente significativa quanto à taxa de adesão para as culturas expostas aos parasitos liberados de células LAMP-2^{-/-} em relação aos parasitos liberados de células WT.

Por estes resultados sugerirem que um ambiente intracelular deficiente em ambas isoformas de LAMP é capaz de induzir mudanças na superfície do parasito, suficientes para alterar o seu perfil de adesão em fibroblastos selvagens, nós resolvemos investigar se estas características também se manteriam em culturas de mioblastos, uma vez que as células musculares são alvo de infecção pelo *T. cruzi* durante o desenvolvimento da doença de Chagas. Para isso, mioblastos da linhagem L6 foram previamente fixados (de acordo com protocolo previamente descrito - SCHENKMAN; DIAZ; NUSSENZWEIG, 1991) e então expostos a formas tripomastigotas obtidas após um único ciclo de infecção em fibroblastos WT, LAMP-1/2^{-/-} ou LAMP-2^{-/-} (tripomastigotas TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} e TcY-L2^{-/-}, respectivamente), utilizando uma MOI de 50 por 40 minutos.

Novamente, diferenças nas taxas de adesão dos distintos parasitos foi observada. No entanto, para mioblastos da linhagem L6, a taxa de adesão de parasitos TcY-L1/2^{-/-} foi maior quando comparada aos parasitos TcY-WT ou TcY-L2^{-/-} (Figura 6B). Para esse tipo celular, a taxa de adesão de parasitos TcY-L2^{-/-} diferiu da taxa de adesão de parasitos TcY-WT, sendo estatisticamente menor. Esses dados reforçam que um ambiente intracelular deficiente em LAMP é capaz de induzir mudanças no perfil de adesão dos parasitos.

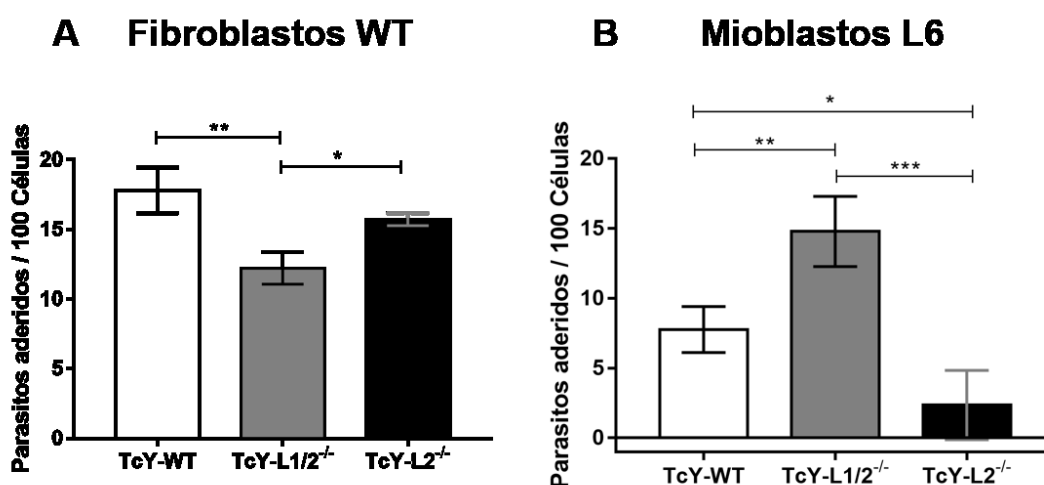


Figura 6. Taxa de adesão de tripomastigotas TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} e TcY-L2^{-/-}. (A) Fibroblastos selvagens ou (B) mioblastos L6 foram previamente fixados com glutaraldeído 2% e incubados com as tripomastigotas provenientes de fibroblastos selvagens ou deficientes em LAMP por 40 min a uma MOI de 50. As células foram fixadas com PFA 4% e coradas com panótico rápido. O gráfico mostra o número de tripomastigotas aderidos por 100 células para cada um dos parasitos estudados. Asteriscos representam significância estatística entre os grupos (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; One-way ANOVA, Fisher's LSD). *Nota: os dados apresentados em (A) referem-se aos dados obtidos durante dissertação de mestrado (OLIVEIRA, 2017).

5.2 A taxa de invasão celular também é alterada em parasitos liberados de células LAMP-1/2^{-/-} ou LAMP-2^{-/-} em relação aos liberados de células WT, porém não se correlaciona à taxa de adesão celular

Uma vez que as taxas de adesão foram variáveis, não só entre os diferentes parasitos, mas também para os diferentes tipos celulares, decidimos investigar se essas mudanças refletiriam em mudanças também na taxa de invasão celular. Para isso, novamente um único ciclo de infecção foi realizado em fibroblastos WT, LAMP-1/2^{-/-} ou LAMP-2^{-/-} e os parasitos liberados foram utilizados em ensaios de invasão em

mioblastos L6. Para os ensaios de invasão, as células foram expostas aos diferentes parasitos utilizando-se uma MOI de 50 por 40 minutos, após a qual as células foram lavadas, fixadas e processadas para a análise em microscópio de fluorescência, de acordo com protocolo descrito na metodologia.

Havíamos observado anteriormente que, em fibroblastos selvagens, parasitos TcY-L1/2^{-/-} apresentavam as taxas mais altas de invasão em relação aos parasitos TcY-WT e TcY-L2^{-/-}, enquanto os parasitos TcY-L2^{-/-} apresentavam as taxas mais baixas e os parasitos TcY-WT eram intermediários. Um perfil de invasão oposto ao observado para o perfil de adesão (OLIVEIRA, 2017 - dissertação de mestrado; Figura 7A e B).

Novamente, assim como para fibroblastos WT, para os ensaios em mioblastos L6 (Figura 7C e D) foram observadas diferenças nas taxas de invasão dos diferentes parasitos estudados. No entanto, observamos um perfil de invasão oposto ao observado para fibroblastos selvagens e um perfil parcialmente oposto ao perfil de adesão observado em mioblastos. Os parasitos TcY-WT e TcY-L1/2^{-/-} se mostraram os de menor capacidade de invasão, quando comparados aos parasitos TcY-L2^{-/-}, sendo a taxa de invasão destes últimos cerca de 3 vezes maior que a dos demais. Diferenças estatísticas não foram observadas entre parasitos TcY-WT e TcY-L1/2^{-/-}. O número de parasitos intracelulares por célula infectada foi cerca de 1 para todos os parasitos testados (Figura 7C). Dessa forma, o número de células infectadas por 100 células (Figura 7D) foi similar ao valor encontrado para parasitos intracelulares por 100 células.

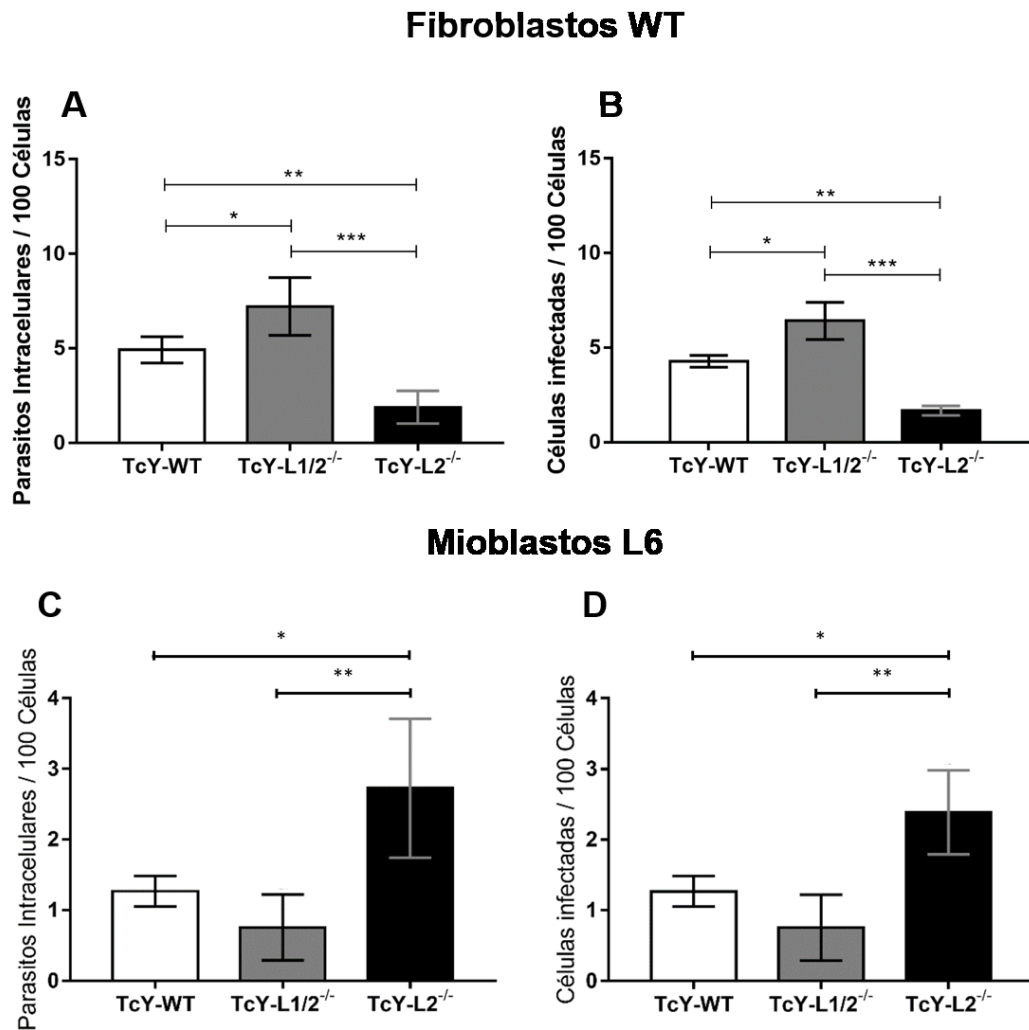


Figura 7. Taxa de invasão de tripomastigotas TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} e TcY-L2^{-/-}. Fibroblastos selvagens e mioblastos L6 foram expostos às tripomastigotas TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} e TcY-L2^{-/-} por 40 min a uma MOI de 50. As células foram fixadas com PFA 4%, marcadas com anticorpo anti-*T. cruzi* e os núcleos marcados com DAPI. (A) e (C) Número de parasitos intracelulares por 100 células. (B) e (D) Número de células infectadas por 100 células. Asteriscos representam significância estatística entre os grupos (*p < 0,05; **p < 0,01; One-way ANOVA, Fisher's LSD). *Nota: os dados apresentados em (A) e (B) referem-se aos dados obtidos durante dissertação de mestrado (OLIVEIRA, 2017).

Os dados, portanto, demonstram não haver similaridade entre os dados de taxa de adesão e invasão tanto em fibroblastos selvagens como em mioblastos L6 para os parasitos liberados dos três tipos de células analisadas (WT, LAMP-1/2^{-/-} e LAMP-2^{-/-}).

5.3 A sinalização de cálcio desencadeada pelos distintos parasitos se correlaciona com o perfil de invasão nos diferentes tipos celulares estudados

Como mencionado anteriormente, o *T. cruzi* subverte o mecanismo de reparo de membrana da célula hospedeira, que é dependente de cálcio. Para isso, o parasito pode tanto causar micro lesões na membrana da célula, induzindo o influxo de cálcio do meio extracelular, bem como sinalizar via proteínas de superfície e desencadear a mobilização de cálcio a partir de estoques intracitoplasmáticos da célula hospedeira (revisado por FERNANDES; ANDREWS, 2012). O aumento de cálcio intracelular leva então à exocitose de lisossomos e endocitose compensatória que culmina com a internalização do *T. cruzi* (TARDIEUX; NATHANSON; ANDREWS, 1994). Uma vez que o cálcio tem papel fundamental na invasão celular pelo *T. cruzi*, decidimos investigar se as diferenças encontradas nas taxas de invasão dos diferentes parasitos para os distintos tipos celulares (fibroblastos selvagens e mioblastos L6) se correlacionava à capacidade de indução de cálcio por esses parasitos. Para isso, os diferentes tipos celulares foram carregados com um indicador fluorescente de cálcio e expostos aos parasitos TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} ou TcY-L2^{-/-}, sendo o aumento da fluorescência medido por microscopia confocal em tempo real.

Para os mioblastos L6 (Figura 8A e C), os resultados revelaram que o sinal de cálcio induzido por parasitos TcY-L2^{-/-} é significativamente maior quando comparado ao sinal induzido por parasitos TcY-WT ou TcY-L1/2^{-/-}. O sinal de cálcio induzido por parasitos TcY-WT e TcY-L1/2^{-/-} não demonstrou diferenças estatisticamente significativas. Novamente, o sinal de cálcio induzido pelos parasitos se correlaciona com o perfil de invasão celular.

Para os fibroblastos selvagens (Figura 8B e D), os resultados revelaram que o sinal de cálcio induzido por parasitos TcY-L1/2^{-/-} é significativamente maior quando comparado ao sinal induzido por parasitos TcY-WT ou TcY-L2^{-/-}. O sinal de cálcio induzido por parasitos TcY-L2^{-/-} foi significativamente menor quando comparado ao sinal induzido pelos demais grupos de parasitos. Esses dados se assemelham aos encontrados para a taxa de invasão, reforçando o papel de cálcio no processo de entrada do parasito na célula hospedeira.

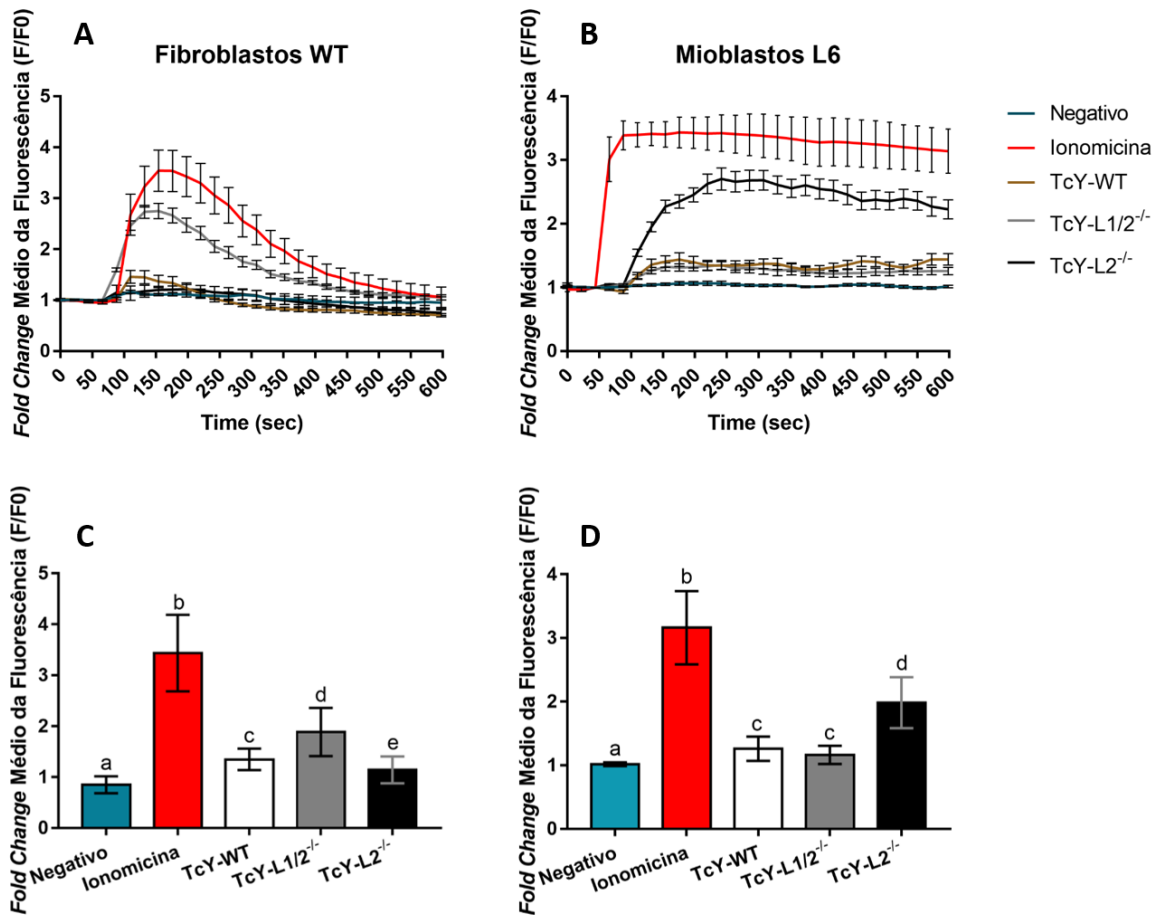


Figura 8. Sinal de cálcio induzido por tripomastigotas TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} e TcY-L2^{-/-}. Fibroblastos selvagens ou mioblastos L6 foram incubados com a sonda indicadora de cálcio Fluo4-AM e filmadas pelo recurso de *time lapsing* por 10 min (600 seg) em contato com os parasitos a uma MOI de 100. Como controles negativo e positivo, foram utilizados meio de cultura e ionomicina, respectivamente. Gráficos (A) e (B) são representativos da leitura média da fluorescência das células ao longo dos 600 segundos. Nos gráficos (C) e (D), letras diferentes representam significância estatística entre os grupos ($p < 0,0001$; exceto para negativo x TcY-L2^{-/-} em mioblastos e negativo x TcY-WT em fibroblastos – $p < 0,01$; assim como para TcY-WT x TcY-L2^{-/-} em mioblastos e negativo x TcY-L1/2^{-/-} em fibroblasto – $p < 0,05$; One-way ANOVA, pós-teste controlando o FDR pelo método de Benjamini e Hochberg para múltiplas comparações).

5.4 O perfil de micro lesão celular mostrou correlação direta com o perfil de indução de cálcio pelos diferentes parasitos nos distintos tipos celulares

Como observado, o perfil de indução de sinal de cálcio pelos diferentes parasitos se correlacionou ao perfil de taxa de invasão. Assim, decidimos investigar qual das duas vias de geração de cálcio, micro lesões com influxo de cálcio do meio extra para o meio intracelular ou estimulação de receptores com liberação de cálcio de estoques intracelulares, mais contribuiu para os resultados gerados. Para isso,

mioblastos L6 ou fibroblastos selvagens foram expostos aos diferentes parasitos a uma MOI de 100, na presença de iodeto de propídeo (IP). IP é um fluoróforo capaz de intercalar ao DNA e impermeável à membrana celular. Dessa forma, a marcação com PI indica permeabilização de membrana por injúria à membrana plasmática.

Para os mioblastos L6 (Figura 9A), parasitos TcY-L2^{-/-} induziram lesões à membrana de um maior número de células quando comparado aos parasitos TcY-WT e TcY-L1/2^{-/-}. Por outro lado, parasitos TcY-WT e TcY-L1/2^{-/-} não apresentaram diferenças estatísticas em seus níveis de indução de lesões. Observou-se uma correlação direta entre a indução de sinais de cálcio e de micro lesões com a invasão para todos os parasitos neste tipo celular.

Para os fibroblastos selvagens (Figura 9B), parasitos TcY-L1/2^{-/-} induziram lesões à membrana de um maior número de células quando comparado aos parasitos TcY-WT e TcY-L2^{-/-}. Nestes ensaios, os parasitos TcY-L2^{-/-} apresentaram níveis intermediários enquanto os parasitos TcY-WT induziram lesões a um número menor de células, indicando que para estes parasitos, a indução de sinais de cálcio via sinalização proteica tem papel relevante. Esses dados reforçam que outros mecanismos de indução de cálcio, via proteínas do parasito, também são importantes para o aumento nos níveis de cálcio intracelular e entrada do parasito na célula hospedeira.

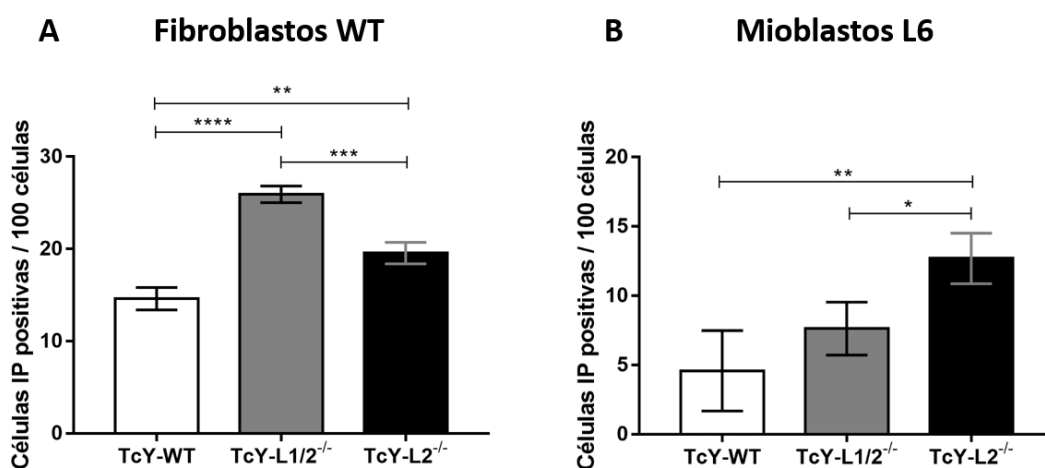


Figura 9. Ensaio de indução de micro lesões à membrana plasmática de células hospedeiras por tripomastigotas TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} e TcY-L2^{-/-}. Número de células positivas para iodeto de propídeo (IP) em um *gate* de 10.000 eventos. Fibroblastos WT(A) ou mioblastos L6 (B) foram plaqueados e expostos às tripomastigotas TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} ou TcY-L2^{-/-} por 30 min a uma MOI de 100. Posteriormente, as células foram tripsinizadas e analisadas em FACs Scan. Asteriscos representam significância estatística (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001; One-way ANOVA, Fisher's LSD).

5.5 Parasitos liberados de células LAMP-1/2^{-/-} ou LAMP-2^{-/-} apresentam perfis subproteômicos distintos em relação a parasitos liberados de células WT

Em 2012, Dos Santos e colaboradores mostraram que formas tripomastigotas de *T. cruzi* obtidas após várias passagens consecutivas em células epiteliais, apresentavam um perfil distinto de expressão de membros da família de proteínas de superfície MASP quando comparado às formas tripomastigotas obtidas do mesmo número de passagens consecutivas em mioblastos ou às formas tripomastigotas sanguíneas. Estes resultados indicam que alterações no ambiente celular são capazes de induzir mudanças na expressão de alguns genes, consequentemente alterando a abundância destas proteínas e possivelmente impactando na interação do parasito com potenciais células hospedeiras. Os dados descritos nas seções anteriores, mostram que a passagem por ambientes intracelulares diferentes é de fato capaz de modular a biologia do parasito e sugerem que tal modulação seja decorrente de alterações no perfil de abundância de proteínas de superfície do parasito.

Para melhor compreender a influência dos diferentes ambientes intracelulares nesta possível modulação de proteínas de superfície do parasito, nós utilizamos uma análise proteômica quantitativa baseada em espectrometria de massas para identificar e quantificar a fração enriquecida em proteínas de membrana de tripomastigotas TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} e TcY-L2^{-/-}. Para isso, as tripomastigotas foram coletadas, lisadas e posteriormente ultracentrifugadas para separar a fração enriquecida em proteínas de membrana. As proteínas obtidas foram então digeridas, reduzidas, alquiladas e os peptídeos trípticos foram marcados com *tags* TMT 6-plex (ThermoFisher), analisados por espectrometria de massas e bioinformática, e análises funcionais foram realizadas. Para a identificação das proteínas a partir das sequências de peptídeos, nós usamos as proteínas anotadas da cepa Y de *T. cruzi* disponíveis no website TriTrypDB (disponibilizadas em 23 de abril de 2020 e acessadas em maio de 2020) (CALLEJAS-HERNÁNDEZ et al., 2018).

Um total de 3806 proteínas foram identificadas com alto nível de confiança e tinham ao menos um peptídeo único em todas as três amostras (Tabela suplementar 1). Os valores normalizados foram utilizados para avaliar a similaridade entre as replicatas biológicas através de uma análise de componente principal, a qual mostrou uma similaridade aceitável entre as replicatas (Figura 10). Dentre as proteínas

identificadas, 1365 eram anotadas como não caracterizadas ou hipotéticas, correspondendo a cerca de 36% do nosso conjunto de dados. A presença de uma alta porcentagem de proteínas não caracterizadas não é surpreendente, uma vez que para o genoma da cepa Y de *T. cruzi*, 56,94% das proteínas corresponde a proteínas hipotéticas ou de função desconhecida (CALLEJAS-HERNÁNDEZ et al., 2018).

Para verificar se as amostras estavam enriquecidas em termos relacionados à membrana, foi realizada uma análise de enriquecimento de ontologia gênica (*Gene Ontology* – GO) usando o teste Exato de Fisher (*Fisher's Exact test*) e filtrando para FDR <0,05 utilizando a ferramenta disponível no website do TriTrypDB. Nosso conjunto de dados apresentou um enriquecimento em vários termos relacionados à membrana, como “*intrinsic component of membrane*”, “*integral component of membrane*”, “*endomembrane system*”, entre outros (Figura 11). Embora o termo mais enriquecido tenha sido citoplasma (*cytoplasm*), não significa que nosso conjunto de dados esteja enriquecido para proteínas citoplasmáticas. De acordo com a definição descrita na webpágina *QuickGO* (<https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/GTerm?id=GO:0005737>), o termo compreende a seguinte definição: os conteúdos de uma célula excluindo-se a membrana plasmática e o núcleo, mas incluindo outras estruturas subcelulares. Portanto, muitas proteínas de membrana de organelas presente no conjunto de dados entraram neste termo de GO.

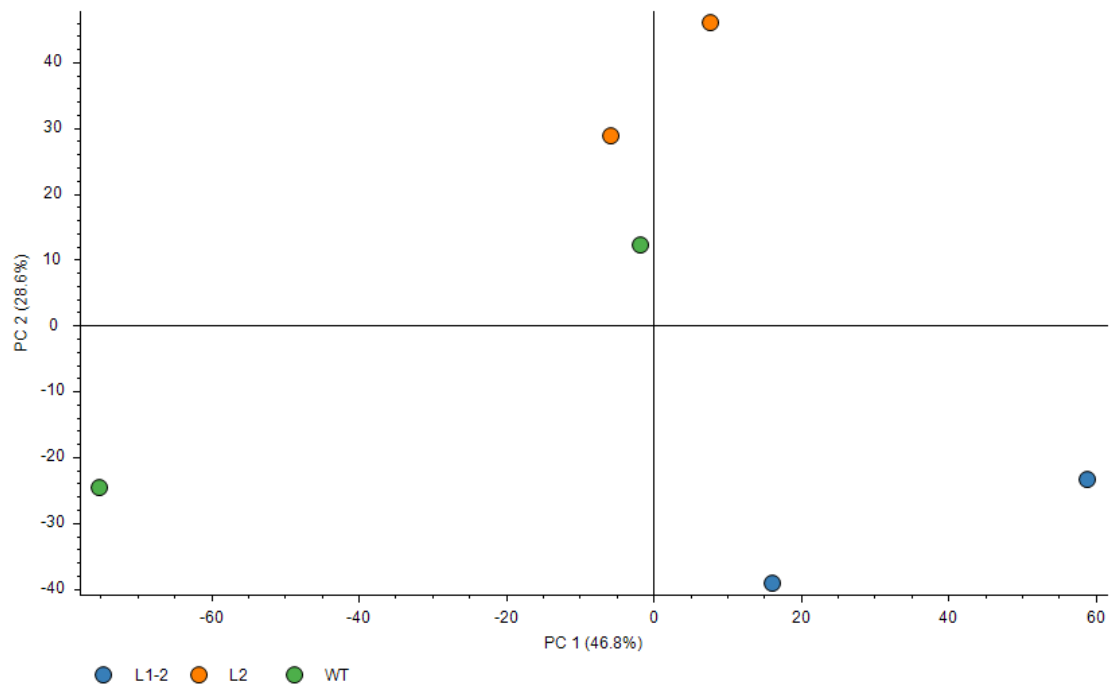


Figura 10. Análise de componente principal (PCA) das replicatas biológicas das amostras de tripomastigotas TcY-WT (pontos verdes – WT), TcY-L1/2^{-/-} (pontos azuis – L1-2) e TcY-L2^{-/-} (pontos laranjas – L2). Quanto mais próximos espacialmente os pontos, mais similares as amostras.

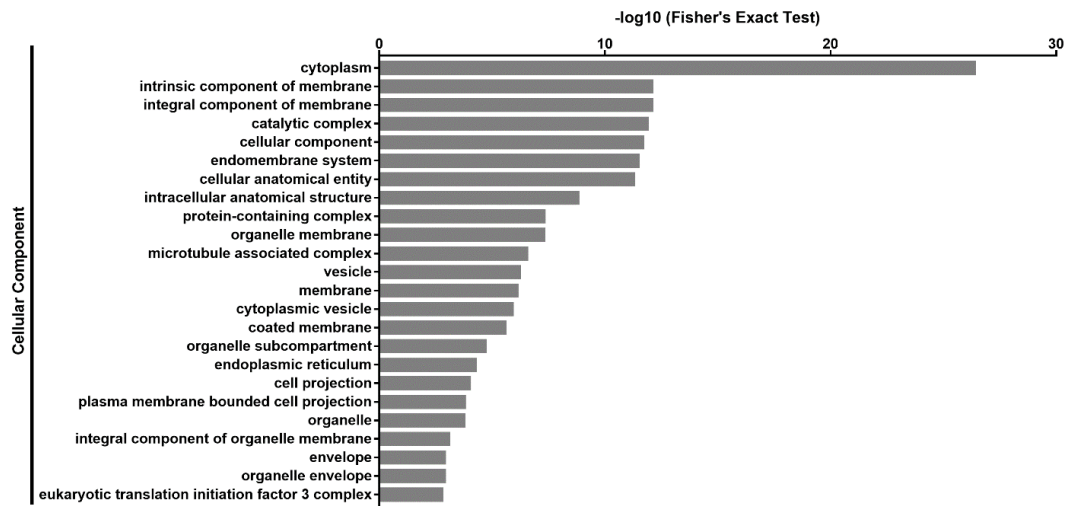


Figura 11. Análise GO de componente celular do proteoma da fração enriquecida em membrana de tripomastigotas TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} e TcY-L2^{-/-}. O gráfico representa o nível de termos GO para componente celular das 3806 proteínas identificadas submetidas à ferramenta de enriquecimento disponível no TriTrypDB.

Foram consideradas como diferencialmente reguladas as proteínas que apresentaram razões de abundância (\log_2 fold change) maior ou menor do que a média acrescida ou diminuída de duas vezes o desvio padrão e coeficiente de

variação menor do que 40% (Figura 12) e a estas proteínas denominamos de subproteoma regulado. Segundo o critério estabelecido, foram encontradas 75 e 90 proteínas reguladas nos proteomas regulados de TcY-L1/2^{-/-} e TcY-L2^{-/-}, respectivamente (Tabela suplementar 2). Destas proteínas, uma porcentagem considerável, em ambos subproteomas, foram preditas como tendo domínios transmembrana ou como secretada pela via clássica ou não clássica, além da presença de algumas enzimas (Tabela 1). Adicionalmente, importantes fatores de virulência de *T. cruzi*, como membros da superfamília de proteínas *trans*-sialidase, assim como outras famílias de proteínas de superfície como MASP e proteases de superfície GP63 (BAYER-SANTOS et al., 2013; GONÇALVES et al., 1991; TROCOLI TORRECILHAS et al., 2009), foram encontradas diferencialmente reguladas nestes parasitos (Tabela 2). Dentre estas, 51 proteínas estavam positivamente reguladas e 24 estavam negativamente reguladas no proteoma de TcY-L1/2^{-/-}, e 55 estavam positivamente e 35 estavam negativamente reguladas no proteoma de TcY-L2^{-/-}, ambos comparativamente ao proteoma de TcY-WT.

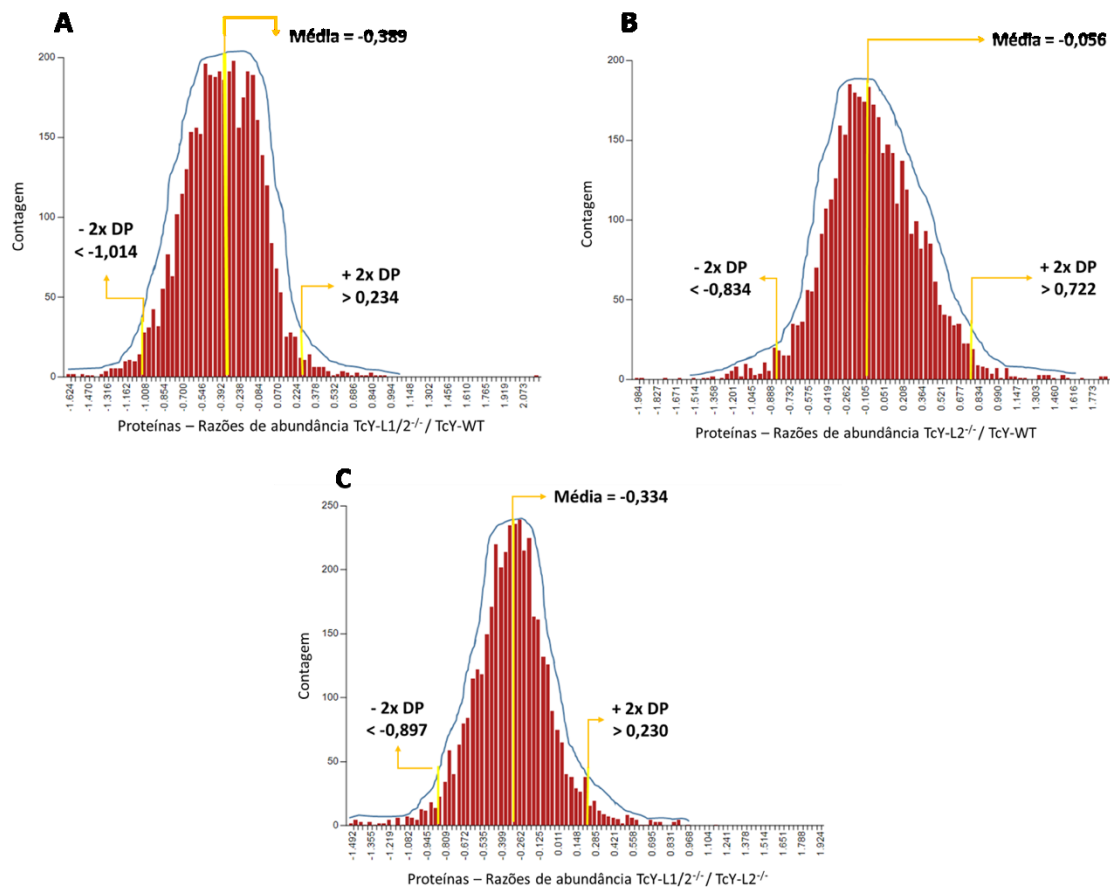


Figura 12. Histogramas representativos da distribuição normal das razões de abundância das proteínas. (A) Log₂ das razões de abundância entre os proteomas TcY-L1/2^{-/-} e TcY-WT. (B) Log₂ das razões de abundância entre os proteomas TcY-L2^{-/-} e TcY-WT. (C) Log₂ das razões de abundância entre os proteomas TcY-L1/2^{-/-} e TcY-L2^{-/-}. Para estabelecer as proteínas reguladas considerou-se a média das razões de abundância acrescida ou diminuída de 2 vezes o desvio padrão (2x DP) das proteínas que apresentaram coeficiente de variação menor do que 40%.

Tabela 1. Número de proteínas do subproteoma regulado com predição de domínios transmembrana, âncora-GPI, secretadas classicamente ou não classicamente, e enzimas

Subproteoma	Total reguladas	Domínios TM*	Âncoras GPI*	SignalP*	SecretomeP*	Enzimas**
TcY-L1/2 ^{-/-}	75	27 (36.0%)	8 (10.7%)	7 (9.3%)	19 (25.3%)	20 (26.7%)
↑ UP	51	26 (51.0%)	8 (15.7%)	6 (11.8%)	13 (25.5%)	12 (23.5%)
↓ DOWN	24	1 (4.2%)	0 (0.0%)	1 (4.2%)	4 (16.7%)	6 (25.0%)
TcY-L2 ^{-/-}	90	34 (37.8%)	8 (8.9%)	16 (17.8%)	11 (12.2%)	23 (25.6%)
↑ UP	55	31 (56.4%)	7 (12.7%)	12 (21.8%)	5 (9.1%)	18 (32.7%)
↓ DOWN	35	3 (8.6%)	1 (2.9%)	4 (11.4%)	5 (14.3%)	5 (14.3%)

*Números absolutos e porcentagens de grupos de proteínas reguladas com predição de domínios transmembrana (TM) ou âncoras-GPI, peptídeo sinal ER/Golgi (SignalP) ou secretadas pela via não clássica (SecretomeP) em relação ao número total de proteínas reguladas identificadas em cada subproteoma em comparação ao proteoma de TcY-WT.

**Números absolutos e porcentagens de enzimas em cada subproteoma regulado em relação ao número total de grupos de proteínas identificadas comparativamente ao proteoma de TcY-WT. UP = proteínas positivamente reguladas no subproteoma. DOWN = proteínas negativamente reguladas no subproteoma.

Tabela 2. Importantes proteínas de superfície reguladas em tripomastigotas TcY-L1/2^{-/-} e TcY-L2^{-/-} em comparação às tripomastigotas TcY-WT

TriTryp ID	Descrição da proteína	log2 FC	log2 FC
		TcY-L1/2 ^{-/-} /TcY-WT	TcY-L2 ^{-/-} /TcY-WT
TcYC6_0114230	membrane protein, putative	NDR	1,04
TcYC6_0162290	Mucin-associated surface protein (MASP), subgroup S002	NDR	0,88
TcYC6_0158360	Mucin-associated surface protein (MASP), subgroup S017	0,88	NDR
TcYC6_0161780	Mucin-associated surface protein (MASP), subgroup S061	NDR	-1,66
TcYC6_0160330	Mucin-associated surface protein (MASP), subgroup S097	0,31	NDR
TcYC6_0124770	Surface membrane protein	NDR	1,08
TcYC6_0169700	surface protease GP63, putative	NDR	1,32
TcYC6_0169840	surface protease GP63, putative	0,29	NDR
TcYC6_0016150	transmembrane protein	NDR	-0,98
TcYC6_0128720	trans-sialidase, Group II, putative	0,8	NDR
TcYC6_0131410	trans-sialidase, Group II, putative	0,36	NDR
TcYC6_0131440	trans-sialidase, Group II, putative	NDR	0,87
TcYC6_0130520	trans-sialidase, Group V, putative	0,69	NDR
TcYC6_0129770	trans-sialidase, Group VI, putative	0,32	NDR
TcYC6_0128910	trans-sialidase, putative	0,78	NDR
TcYC6_0130010	trans-sialidase, putative	NDR	0,9

NDR = não diferencialmente regulada. Vermelho = positivamente regulada e azul = negativamente regulada.

Foram observadas 4 proteínas compartilhadas entre os subproteomas regulados TcY-L1/2^{-/-} e TcY-L2^{-/-} dentre as proteínas com aumento de abundância, sendo 3 dessas proteínas hipotéticas (Figura 13). Em relação às proteínas negativamente reguladas, nós encontramos 9 compartilhadas entre os subproteomas regulados TcY-L1/2^{-/-} e TcY-L2^{-/-} (Figura 13). Estes resultados mostram que o

ambiente intracelular desempenha um papel capaz de modular as proteínas do parasito, reforçando nossa hipótese de que uma única passagem em ambientes distintos seja suficiente para desencadear mudanças a nível de abundância de proteínas do parasito. Estas diferenças em nível molecular podem possivelmente explicar as diferenças de comportamento biológico observado entre os parasitos liberados de fibroblastos selvagens ou deficientes para LAMP.

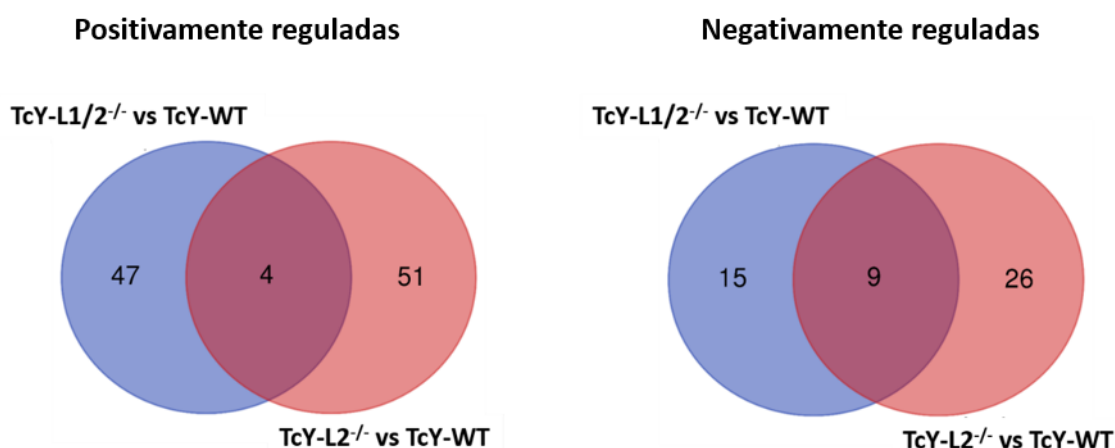


Figura 13. Proteínas diferencialmente reguladas nos proteomas de tripomastigotas TcY-L1/2^{-/-} e TcY-L2^{-/-} comparativamente ao proteoma de tripomastigotas TcY-WT. Diagramas de Venn mostrando as proteínas exclusivamente reguladas e compartilhadas pelos subproteomas de tripomastigotas TcY-L1/2^{-/-} e TcY-L2^{-/-} em comparação ao proteoma de tripomastigotas TcY-WT. Esta figura foi preparada usando a ferramenta online Draw Venn Diagram (disponível no site: <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

Para um entendimento de como estas mudanças em nível molecular poderiam ter um efeito no comportamento biológico desses parasitos, as proteínas reguladas foram classificadas e agrupadas de acordo com seus enriquecimentos de GO em processos biológicos (PB) através da ferramenta disponível no TriTrypDB usando teste exato de Fisher e filtrando FDR <0,05. Em relação ao subproteoma regulado de TcY-L1/2^{-/-}, não foram encontrados processos biológicos positivamente enriquecidos e haviam 15 processos enriquecidos negativamente. Para a remoção de termos redundantes, foi usada a ferramenta REVIGO (<http://revigo.irb.hr/>). Após esta etapa, foram então definidos 8 PBs negativamente regulados (*protein folding, cellular ketone metabolic process, quinone biosynthetic process, pentose-phosphate shunt, glyceraldehyde-3-phosphate metabolic process, microtubule-based movement, cellular process, movement of cell or subcellular component*) em comparação ao proteoma de TcY-WT (Figura 14 e Tabela 3). Seis proteínas foram relevantes para

dois ou mais PBs no subproteoma regulado de TcY-L1/2^{-/-}: 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating, putative (TcYC6_0069460), ubiquinone biosynthesis protein COQ7-like, putative (TcYC6_0110760), kinesin-13 3, putative (TcYC6_0081520), kinesin, putative (TcYC6_0110780), T-complex protein 1, delta subunit, putative (TcYC6_0023210) e chaperonin/T-complex protein 1 gamma subunit, putative (TcYC6_0030620).

Em seguida, realizamos análises de GO para enriquecimento de processos biológicos usando somente as proteínas associadas à membrana que apresentaram domínios transmembrana e/ou que foram assinaladas como pertencentes à membrana pela análise de DeepLoc (subproteoma de membrana). Desta análise, nós não encontramos PB enriquecido nem para a lista de proteínas positivamente reguladas nem para a lista de proteínas negativamente reguladas. No entanto, para o subproteoma de membrana positivamente regulado, usando a ferramenta de análise de enriquecimento de vias metabólicas disponível no TriTryp com o KEGG como fonte e filtrando por FDR <0,05, foi encontrada a via metabólica de esfingolipídeos (ec00600__PK__KEGG; p-value 0,00049; FDR 0,013) como enriquecida.

Tabela 3. Termos GO de processos biológicos enriquecidos nas proteínas negativamente reguladas em TcY-L1/2^{-/-} em relação à TcY-WT

GO ID	Processo Biológico	Lista de genes	Enriquecimento (<i>fold enrichment</i>)	p-value	Benjamini (FDR)
GO:0006928	movement of cell or subcellular component	TcYC6_0081520, TcYC6_0110780,	11,66	0,012056	0,047422
GO:0009987	cellular process	TcYC6_0018280, TcYC6_0023210, TcYC6_0030620, TcYC6_0069460, TcYC6_0081520, TcYC6_0110760, TcYC6_0110780, TcYC6_0110900,	2,09	0,011645	0,047422
GO:0007018	microtubule-based movement	TcYC6_0081520, TcYC6_0110780,	11,98	0,011446	0,047422
GO:0006098	pentose-phosphate shunt	TcYC6_0069460,	87,42	0,011392	0,047422
GO:0019682	glyceraldehyde-3-phosphate metabolic process	TcYC6_0069460,	87,42	0,011392	0,047422
GO:0042180	cellular ketone metabolic process	TcYC6_0110760,	145,7	0,006849	0,040411
GO:1901663	quinone biosynthetic process	TcYC6_0110760,	145,7	0,006849	0,040411
GO:0006457	protein folding	TcYC6_0023210, TcYC6_0030620,	19,87	0,004272	0,040411

Para o subproteoma regulado de tripomastigotas TcY-L2^{-/-}, não foram encontrados processos biológicos negativamente enriquecido mas haviam 25 processos positivamente enriquecidos. Após sumarizar os termos usando a ferramenta REVIGO, foram definidos 5 PBs como positivamente enriquecidos (*proteolysis involved in cellular protein catabolic process, catabolic process, proteolysis, cellular protein-containing complex assembly, mitochondrion organization*) em comparação ao proteoma de tripomastigotas TcY-WT (Figura 14 e Tabela 4). Seis proteínas foram relevantes para dois ou mais PBs no subproteoma de TcY-L2^{-/-}: proteasome alpha 1 subunit, putative (TcYC6_0071370), proteasome alpha 2 subunit, putative (TcYC6_0023180), proteasome beta 3 subunit, putative (TcYC6_0044600), proteasome beta 6 subunit, putative (TcYC6_0041700), proteasome beta 7 subunit,

putative (TcYC6_0091650) e putative mitochondrial chaperone BCS1 (TcYC6_0123290).

Usando a ferramenta de análise de enriquecimento de vias metabólicas disponível no TriTrypDB usando KEGG como fonte e filtrando FDR <0,05, nós encontramos duas vias positivamente enriquecidas (metabolismo de arginina e prolina (ec00330__PK__KEGG; p-value 0,00068; FDR 0,025) e biossíntese de diterpenoides (ec00904__PK__KEGG; p-value 0,002169; FDR 0,0401)) e uma via negativamente enriquecida (metabolismo de éter lipídeos (ec00565__PK__KEGG; p-value 0,00261; FDR 0,02094)). A análise de PBs enriquecidos do subproteoma de membrana, que seguiu o mesmo critério de análise descrito acima, revelou apenas um PB positivamente enriquecido, o *vacuolar proton-transporting V-type ATPase complex assembly* (GO:0070072; Gene TcYC6_0005310; ER protein Pkr1, putative; Enriquecimento 343,69; p-value 0,002909; FDR 0,04946). Não foram encontradas vias metabólicas enriquecidas a partir da análise do subproteoma de membrana.

Tabela 4. Termos GO de processos biológicos enriquecidos nas proteínas positivamente reguladas em TcY-L2^{-/-} em relação à TcY-WT

GO ID	Processo Biológico	Lista de genes	Enriquecimento (<i>fold enrichment</i>)	p-value	Benjamini (FDR)
GO:0007005	mitochondrion organization	TcYC6_0123290,	104,52	0,009545	0,032108
GO:0034622	cellular protein-containing complex assembly	TcYC6_0005310, TcYC6_0123290,	22	0,003563	0,023969
GO:0006508	proteolysis	TcYC6_0023180, TcYC6_0033380, TcYC6_0041700, TcYC6_0044600, TcYC6_0071370, TcYC6_0091650, TcYC6_0107360, TcYC6_0169700,	3,63	0,000899	0,006655
GO:0009056	catabolic process	TcYC6_0023180, TcYC6_0041700, TcYC6_0044600, TcYC6_0071370, TcYC6_0091650,	9,86	0,000116	0,000955
GO:0051603	proteolysis involved in cellular protein catabolic process	TcYC6_0023180, TcYC6_0041700, TcYC6_0044600, TcYC6_0071370, TcYC6_0091650,	28,25	6,21E-07	2,30E-05

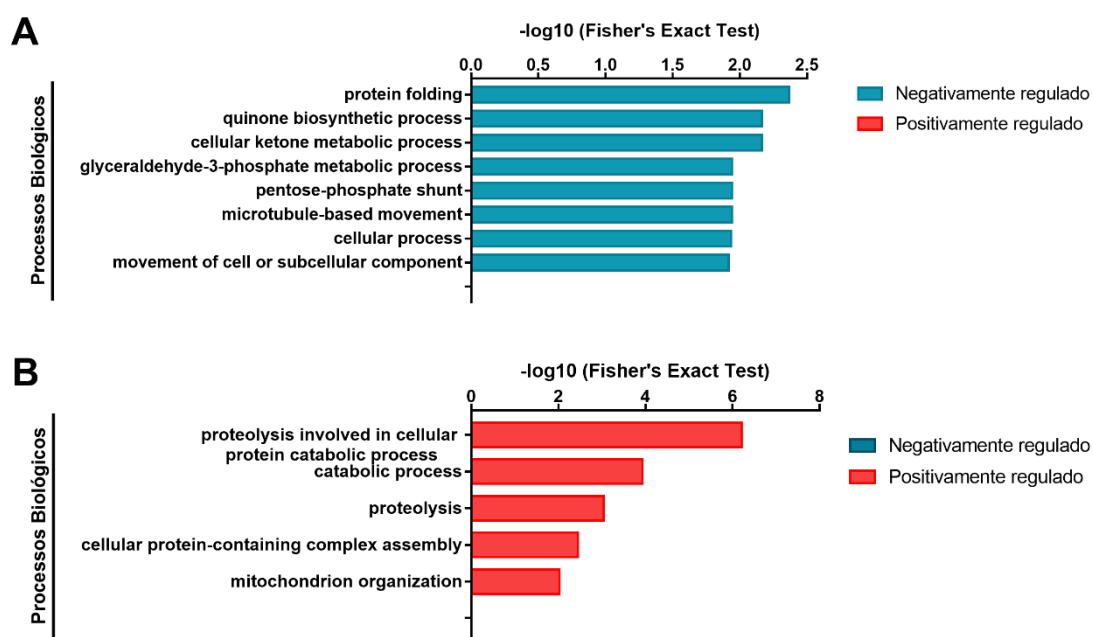


Figura 14. Análise de enriquecimento GO em nível de processos biológicos nos subproteomas regulados de tripomastigotas TcY-L1/2^{-/-} ou TcY-L2^{-/-}. Os gráficos mostram os diferentes termos de processos biológicos positivamente ou negativamente regulados, baseados nas proteínas diferencialmente reguladas no proteoma de tripomastigotas TcY-L1/2^{-/-} (A) ou TcY-L2^{-/-} (B) em comparação ao proteoma de tripomastigotas TcY-WT.

5.6 Parasitos liberados de células LAMP-1/2^{-/-} ou LAMP-2^{-/-} apresentam perfis subproteômicos distintos entre si

Para estabelecer um entendimento melhor dos parasitos derivados de células deficientes em LAMP, nós comparamos os proteomas de TcY-L1/2^{-/-} e TcY-L2^{-/-}. Estes parasitos apresentaram as maiores diferenças em relação às características biológicas avaliadas. E de fato, a análise proteômica revelou um alto número (n= 136) de proteínas diferencialmente reguladas entres eles, sendo 55 negativamente reguladas e 81 positivamente reguladas (usando os mesmos critérios estabelecidos para definir as proteínas diferencialmente reguladas – Figura 12C) (Tabela suplementar 2). Destas proteínas, uma porcentagem considerável apresentava predição de domínios transmembrana ou secreção pela via clássica ou não clássica (Tabela 5). Interessantemente, um alto número de proteínas de superfícies de *T. cruzi* já conhecidas foram encontradas diferencialmente reguladas entre tripomastigotas TcY-L1/2^{-/-} e TcY-L2^{-/-} (Tabela 6).

Tabela 5. Número de proteínas preditas com domínios transmembrana, âncora-GPI, secretadas classicamente ou não classicamente, e enzimas identificadas como reguladas nos parasitos TcY-L1/2^{-/-} em comparação às tripomastigotas TcY-L2^{-/-}

Subproteoma	Total reguladas	Domínios TM*	Âncora-GPI*	SignalP*	SecretomeP*	Enzimas**
TcY-L1/2 ^{-/-}	136	34 (25.0%)	10 (7.4%)	18 (13.2%)	28 (20.6%)	39 (28.7%)
↑ UP	81	10 (12.3%)	2 (2.5%)	6 (7.4%)	17 (21.0%)	17 (21.0%)
↓ DOWN	55	24 (43.6%)	8 (14.5%)	12 (21.8%)	11 (20.0%)	22 (40.0%)

*Números absolutos e porcentagens de grupos de proteínas reguladas e preditas com domínios transmembrana (TM) ou âncoras-GPI, peptídeo sinal ER/Golgi (SignalP) ou secretadas pela via não clássica (SecretomeP) em relação ao número total de proteínas reguladas identificadas no proteoma de tripomastigotas TcY-L1/2^{-/-} em comparação ao proteoma de TcY-L2^{-/-}. **Números absolutos e porcentagens de enzimas no subproteoma regulado de tripomastigotas TcY-L1/2^{-/-} em relação ao número total de grupos de identificadas no subproteoma regulado de tripomastigotas TcY-L1/2^{-/-} em comparação ao proteoma de TcY-L2^{-/-}. UP = proteínas positivamente reguladas no subproteoma. DOWN = proteínas negativamente reguladas no subproteoma.

Tabela 6. Importantes proteínas de superfície reguladas em tripomastigotas TcY-L1/2^{-/-} em comparação às tripomastigotas TcY-L2^{-/-}

TriTryp ID	Descrição da proteína	log2 FC TcY-L1/2 ^{-/-} /TcY-L2 ^{-/-}
TcYC6_0154080	mucin TcMUCII, putative	-1,46
TcYC6_0150670	mucin TcMUCII, putative	-0,98
TcYC6_0154140	mucin TcMUCII, putative	0,38
TcYC6_0158360	Mucin-associated surface protein (MASP), subgroup S017	0,71
TcYC6_0164190	Mucin-associated surface protein (MASP), subgroup S054	-0,98
TcYC6_0161500	Mucin-associated surface protein (MASP), subgroup S074	-1,47
TcYC6_0124770	Surface membrane protein	-1,09
TcYC6_0169090	surface protease GP63, putative	-1,11
TcYC6_0077110	surface protein ToIT, putative	-1,5
TcYC6_0078130	surface protein ToIT, putative	-1,46
TcYC6_0078140	surface protein ToIT, putative	-1,44
TcYC6_0141330	trans-sialidase (pseudogene), putative	0,34
TcYC6_0130150	trans-sialidase, Group II, putative	-1,18
TcYC6_0131910	trans-sialidase, Group II, putative	-1,01
TcYC6_0132210	trans-sialidase, Group II, putative	-1,01
TcYC6_0128720	trans-sialidase, Group II, putative	0,88
TcYC6_0130010	trans-sialidase, putative	-0,93
TcYC6_0128910	trans-sialidase, putative	0,76

NDR = não diferencialmente regulada. Vermelho = positivamente regulada e azul e arroxeadado = negativamente regulada.

A análise de enriquecimento de GO em nível de processos biológicos mostrou 13 PBs negativamente enriquecidos e nenhum PB positivamente regulado. Após sumarizar os termos com a ferramenta REVIGO, foram definidos três PBs (*proteolysis*

involved in cellular protein catabolic process, catabolic process and, proteolysis) (Figura 15 e Tabela 7). Cinco proteínas de proteassomo estavam presentes em todos os três PBs: proteasome alpha 1 subunit, putative (TcYC6_0071370), proteasome alpha 2 subunit, putative (TcYC6_0023180), proteasome alpha 7 subunit, putative (TcYC6_0044220), proteasome beta 3 subunit, putative (TcYC6_0044600) e proteasome beta 7 subunit, putative (TcYC6_0091650). As proteínas metallopeptidase, Clan MF, Family M17, putative (TcYC6_0033380), cytoskeleton-associated protein CAP5.5, putative (TcYC6_0107360) e, surface protease GP63, putative (TcYC6_0169090) também contribuíram para o enriquecimento do termo proteólise (*proteolysis*).

Tabela 7. Termos GO de processos biológicos negativamente enriquecidos em TcY-L1/2^{-/-} em relação à TcY-L2^{-/-}

GO ID	Processo Biológico	Lista de genes	Enriquecimento (<i>fold enrichment</i>)	p-value	Benjamini (FDR)
GO:0006508	proteolysis	TcYC6_0023180, TcYC6_0033380, TcYC6_0044220, TcYC6_0044600, TcYC6_0071370, TcYC6_0091650, TcYC6_0107360, TcYC6_0169090,	3,09	0,002888	0,021323
GO:0009056	catabolic process	TcYC6_0023180, TcYC6_0044220, TcYC6_0044600, TcYC6_0071370, TcYC6_0091650,	8,4	0,00026	0,002772
GO:0051603	proteolysis involved in cellular protein catabolic process	TcYC6_0023180, TcYC6_0044220, TcYC6_0044600, TcYC6_0071370, TcYC6_0091650,	24,06	1,46E-06	6,99E-05

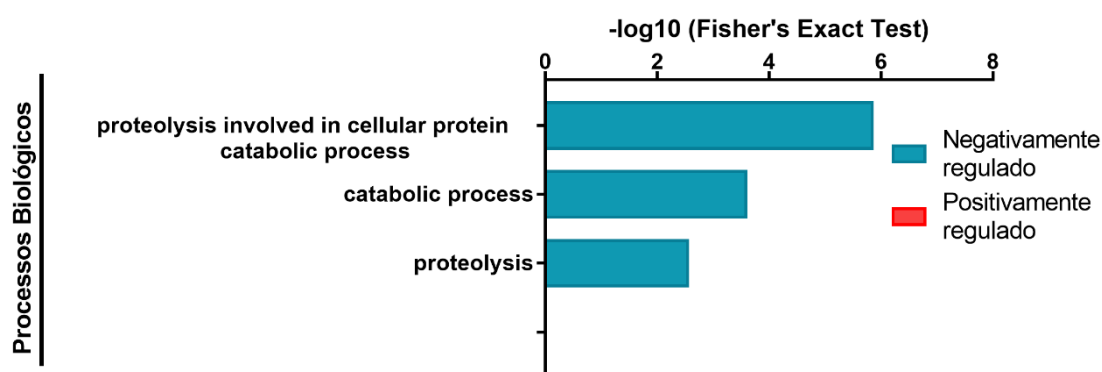


Figura 15. Análise de enriquecimento GO em nível de processos biológicos no subproteoma regulado de tripomastigotas TcY-L1/2^{-/-}. O gráfico mostra os diferentes termos de processos biológicos positivamente ou negativamente regulados, baseados nas proteínas diferencialmente reguladas no proteoma de tripomastigotas TcY-L1/2^{-/-} em comparação ao proteoma de tripomastigotas TcY-L2^{-/-}.

Uma vez que alguns representantes da família das *trans*-sialidases foram encontrados diferencialmente regulados no proteoma de TcY-L1/2^{-/-} e TcY-L2^{-/-}, avaliamos por meio de Western Blot o padrão de abundância dessas proteínas. Para isso, extratos proteicos de tripomastigotas TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} e TcY-L2^{-/-} foram separados por eletroforese, transferidos para membranas de nitrocelulose e incubados com o anticorpo monoclonal mAb 39, um anticorpo que reconhece um amplo padrão de bandas devido a heterogeneidade das *trans*-sialidases (120 a 220 kDa) (SCHENKMAN; PONTES DE CARVALHO; NUSSENZWEIG, 1992).

Os Western Blots revelaram padrões diferentes de bandas para os extratos proteicos dos parasitos estudados, evidenciando que de fato o perfil de abundância das *trans*-sialidases é distinto nesses parasitos (Figura 16). Além disso, esse resultado corrobora a regulação diferencial das *trans*-sialidases evidenciado pela análise proteômica assim como reforça o papel do ambiente intracelular na modulação do perfil de abundância de proteínas do *T. cruzi*.

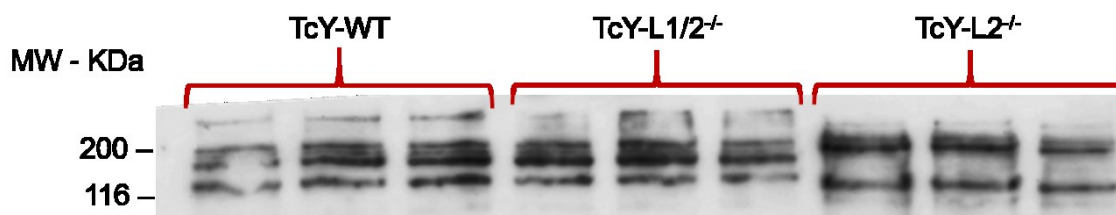


Figura 16. Reatividade de anticorpo anti-*trans*-sialidase ao extrato proteico de tripomastigotas derivadas de fibroblastos selvagens e deficientes em LAMP. Os antígenos de tripomastigotas TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} e TcY-L2^{-/-} (20 µg por canaleta) foram resolvidos por SDS-PAGE em géis de poliacrilamida 12%. Os Western Blots foram incubados com o anticorpo monoclonal mAb 39 que reconhece *trans*-sialidasas. MW = *molecular weight* (peso molecular).

5.7 O perfil proteolítico de tripomastigotas liberadas de células deficientes em LAMP é diferente do de tripomastigotas liberadas de células selvagens para LAMP

A análise do subproteoma regulado de tripomastigotas TcY-L2^{-/-} revelou que estas apresentavam um enriquecimento GO em processos biológicos para termos relacionados à proteólise em comparação tanto ao proteoma de tripomastigotas TcY-WT quanto ao proteoma de tripomastigotas TcY-L1/2^{-/-}. Por este motivo, resolvemos aprofundar nossa investigação no perfil proteolítico dos parasitos provenientes de células selvagens e deficientes em LAMP. Para isto, ensaios de zimografia em gelatina e também de cinética enzimática usando substratos específicos para cisteíno proteases e serino proteases.

Brevemente, extratos proteicos de tripomastigotas TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} e TcY-L2^{-/-} foram preparados e separados por eletroforese em géis de poliacrilamida copolimerizados com gelatina, que foram então incubados com solução renaturante por 30 min, incubados por 24 hs com solução de desenvolvimento, corados com Comassie R250 e descorados para a análise de bandas negativas indicativas de atividade proteolítica.

Os resultados de três ensaios realizados independentemente mostraram que os extratos proteicos de tripomastigotas TcY-L2^{-/-} apresentam atividade gelatinolítica maior do que os extratos de tripomastigotas TcY-WT e TcY-L1/2^{-/-} (Figura 17), portanto corroborando os resultados da análise proteômica.

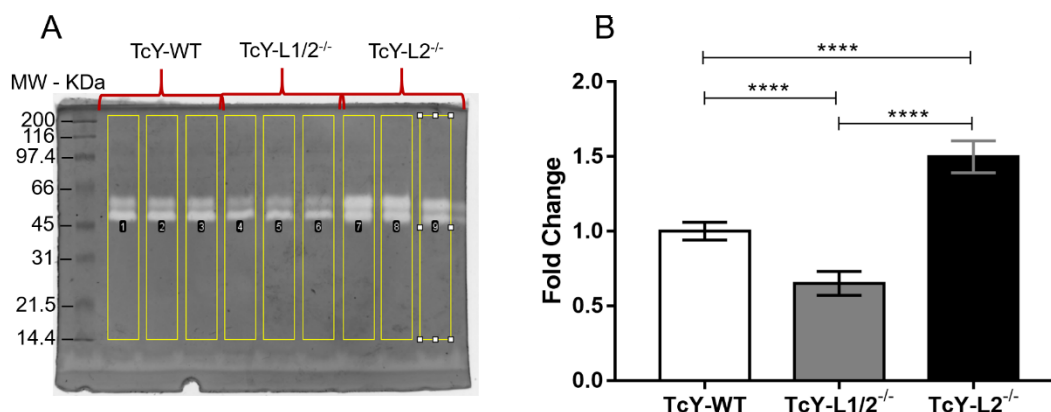


Figura 17. Ensaio de zimografia em gelatina. (A) Gel SDS-PAGE representativo mostrando as bandas negativas indicativas de atividade gelatinolítica. (B) Quantificação obtida das bandas gelatinolíticas usando o programa ImageJ – os valores médios da medida de pixels dos extratos TcY-WT foram usados como normalizadores para todos os grupos. Asteriscos representam significância estatística (**** $p < 0,0001$; One-way ANOVA, Fisher's LSD).

Além da atividade gelatinolítica dos extratos, nós também avaliamos a atividade de cisteíno proteases e serino proteases. Para isto, foram realizados ensaios cinéticos para atividade enzimática usando os substratos fluorogênicos Ac-YVAD-AFC para atividade semelhante à caspase de cisteíno proteases e o Suc-LLVY-AMC para atividade semelhante à quimotripsina de serino proteases. Os resultados revelaram que para atividade semelhante à caspase, os extratos proteicos TcY-L1/2^{-/-} e TcY-L2^{-/-} apresentam atividade ligeiramente maior do que os extratos TcY-WT (Figura 18A). Para todos os extratos proteicos, o inibidor MG-132 diminuiu a atividade enzimática em 2.23 ± 0.055 , 1.98 ± 0.25 e 1.94 ± 0.34 vezes para TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} e TcY-L2^{-/-} respectivamente. A análise das áreas sob a curva revelou que os extratos TcY-L1/2^{-/-} e TcY-L2^{-/-} apresentaram as maiores áreas quando comparados ao extrato TcY-WT, evidenciando assim suas maiores atividades (Figura 18C). Para a atividade semelhante à quimotripsina, o extrato proteico de TcY-L2^{-/-} apresentou as maiores atividades cinéticas a partir de 20 min até 120 min (Figura 18B). Novamente, para todos os extratos proteicos, o inibidor MG-132 diminuiu consideravelmente a atividade enzimática em 12.12 ± 1.53 , 8.91 ± 0.48 e 15.73 ± 0.53 vezes para TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} e TcY-L2^{-/-} respectivamente (Figura 18D). A análise das áreas sob a curva confirmou que o extrato TcY-L2^{-/-} possui a maior atividade quando comparado aos extratos TcY-WT e TcY-L1/2^{-/-}, os quais apresentaram as menores atividades (Figura 18D). Para

estes substratos, a atividade cinética e as áreas sob a curva apresentaram um perfil similar ao perfil observado nos ensaios zimográficos.

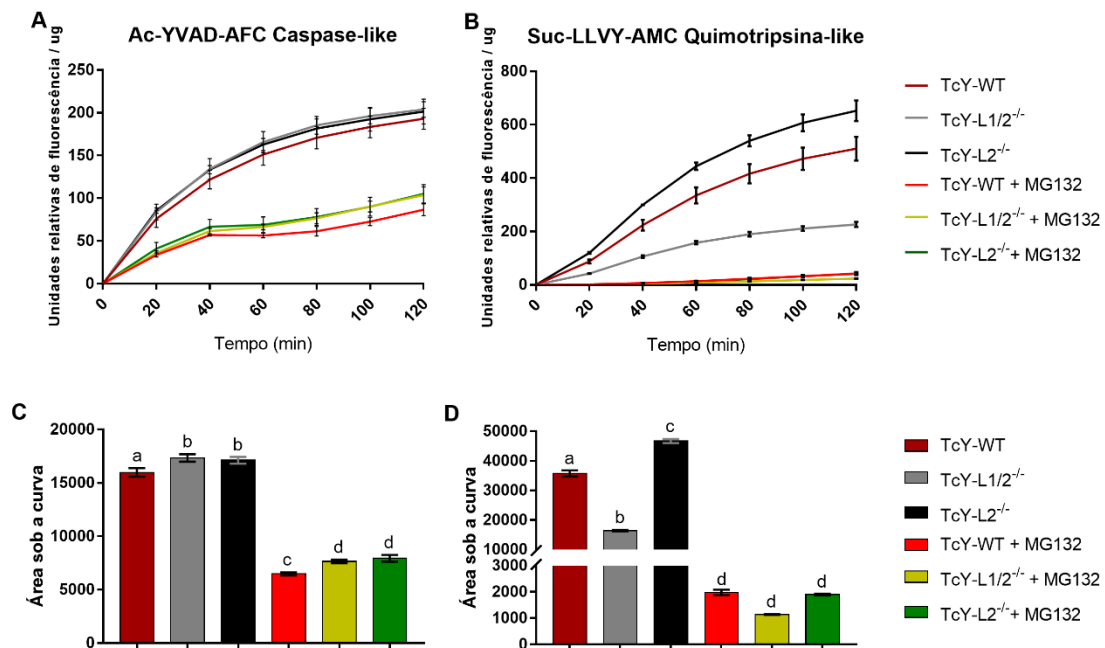


Figura 18. Cinética enzimática da atividade de cisteíno proteases e serino proteases.

Atividade de cisteíno (A) ou serino (B) proteases dos extratos proteicos de tripomastigotas TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} ou TcY-L2^{-/-} foram avaliadas usando método fluorescente com os substratos Ac-YVAD-AFC para atividade semelhante à caspase de cisteíno proteases e Suc-LLVY-AMC para atividade semelhante à quimotripsina de serino proteases. Os dados das curvas de cinética A e B foram representados como média \pm desvio padrão. Letras diferentes representam significância estatística entre os grupos ($p < 0.0005$, One-way ANOVA, pós-teste controlando o FDR pelo método de Benjamini e Hochberg para múltiplas comparações).

6. DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Nos últimos anos vem sendo demonstrado que alterações no ambiente intracelular podem induzir mudanças na abundância de proteínas de patógenos intracelulares, que por sua vez, podem modular a biologia do patógeno, alterando sua interação com células hospedeiras. Dos Santos e colaboradores (2012) mostraram que, após sucessivas infecções em células epiteliais e em mioblastos ou em infecções *in vivo*, o *T. cruzi* apresentou um perfil de expressão distinto de membros da família multigênica MASP. Essas alterações foram acompanhadas de mudanças na capacidade infectiva do parasito em diferentes tipos celulares. Ainda, em um estudo realizado por Dumetz e colaboradores (2017), com *Leishmania donovani*, outro protozoário parasito intracelular, observou-se mudanças induzidas pelo ambiente celular na aneuploidia desses parasitos, os quais levaram a grandes impactos na expressão gênica. Mais recentemente, Li e colaboradores (2019) demonstraram que a bactéria *Salmonella enterica* sorotipo *Typhimurium* se adapta a diferentes células hospedeiras mudando o seu perfil proteômico, inclusive sendo possível utilizar algumas das modificações como marcadores do ambiente intracelular do qual a bactéria se originou.

Em estudos anteriores, realizados pelo nosso grupo, mostramos que a alteração de uma única proteína (LAMP) foi capaz de alterar o comportamento biológico da cepa Y de *T. cruzi*. Em células deficientes em LAMP (LAMP1/2^{-/-} e LAMP 2^{-/-}), parasitos da cepa Y tinham seu crescimento intracelular aumentado, com maior liberação de parasitos ao final de um único ciclo intracelular (ALBERTTI et al., 2010). Sabe-se que os lisossomos são importantes organelas da célula hospedeira que impactam no sucesso de invasão pelo *T. cruzi*. Estas organelas são recrutadas para o local de entrada do parasito via sinalização de cálcio (ANDREWS, 2002) e são cruciais para a sua permanência na célula (ANDRADE; ANDREWS, 2004). Dessa forma, o presente estudo visou compreender se os parasitos liberados de células deficientes em LAMP apresentavam comportamento biológico distinto daquele liberado de células selvagens. Para avaliar se um ambiente intracelular ausente em proteína LAMP impacta em aspectos biológicos do parasito, quatro características relativas ao processo de entrada pelo parasito na célula hospedeira foram avaliadas, sendo elas: a taxa de adesão e invasão, a capacidade e o perfil de sinal de cálcio

induzido por estes parasitos, bem como a taxa de indução de micro lesões na membrana da célula hospedeira.

Tanto a adesão como a invasão são processos dependentes da interação entre proteínas de superfície do parasito e da célula hospedeira. Algumas dessas proteínas desencadeiam vias de transdução de sinais que levam ao aumento da concentração de cálcio citosólico em ambos parasito e célula hospedeira, as quais foram demonstradas serem importantes para a invasão celular pelo *T. cruzi* (MORENO; DOCAMPO, 2003; YOSHIDA et al., 2000). Na célula hospedeira, esta sinalização de cálcio leva ao recrutamento e fusão de lisossomos perinucleares no local de adesão do parasito, sugerindo que a adesão seria um processo importante para a invasão (TARDIEUX et al., 1992; TARDIEUX; NATHANSON; ANDREWS, 1994). De fato, outros estudos indicavam a existência de uma correlação entre taxas de adesão e invasão celular pelo *T. cruzi* (ANDREWS; COLLI, 1982; PIRAS; PIRAS; HENRÍQUEZ, 1982, 1983).

Sendo assim, decidimos investigar se os perfis de adesão de parasitos liberados de fibroblastos WT, LAMP1/2^{-/-} e LAMP2^{-/-} (TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} e TcY-L2^{-/-}, respectivamente) diferiam entre si. Os perfis de adesão demonstraram-se distintos entre os três tipos de parasitos, tanto para mioblastos L6 quanto para fibroblastos WT. No entanto, enquanto que para mioblastos L6 as tripomastigotas TcY-L1/2^{-/-} apresentaram a maior taxa de adesão e as tripomastigotas TcY-L2^{-/-} a menor taxa, para fibroblastos WT as tripomastigotas TcY-L1/2^{-/-} apresentaram a menor taxa de adesão enquanto tripomastigotas TcY-L2^{-/-} apresentaram uma maior taxa. Dessa forma, tripomastigotas TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} e TcY-L2^{-/-} apresentam não apenas perfis de adesão distintos entre si mas também entre tipos celulares diferentes. Esses resultados sugerem que o ambiente intracelular no qual os parasitos se desenvolveram, possivelmente, induziu alterações no conjunto de proteínas expressas em sua superfície, levando a modificações na interação desses parasitos com as células hospedeiras.

Como havia sido sugerido na literatura uma correlação entre adesão e invasão, decidimos investigar se as diferenças encontradas em relação a taxa de adesão desses parasitos interfeririam no perfil de invasão dos mesmos. De fato, nossos resultados revelaram padrões de infecção diferentes para os três grupos de parasitos estudados, tanto em mioblastos L6, quanto em fibroblastos WT. Para os mioblastos

L6, as tripomastigotas TcY-L2^{-/-} apresentaram a maior capacidade infectiva, enquanto que para os fibroblastos WT as tripomastigotas TcY-L1/2^{-/-} foram as mais infectivas. Estes resultados demonstram que não somente o desenvolvimento em um ambiente intracelular ausente em proteínas LAMP induziu mudanças nas formas tripomastigotas, provavelmente decorrentes da alteração no perfil de proteínas de superfície, mas também que estas modificações alteraram a capacidade infectiva destes parasitos. Ainda, estes resultados reforçam dados da literatura que demonstram que alterações no perfil de proteínas de formas tripomastigotas de *T. cruzi* alteram o tropismo deste parasito por células específicas (ANDRADE et al., 1999; DOS SANTOS et al., 2012; MACEDO et al., 2004). Por outro lado, os dados obtidos anteriormente e neste trabalho, claramente indicam que a capacidade de adesão do parasito à célula hospedeira, ao contrário do que havia sido anteriormente proposto, não se correlaciona diretamente com a capacidade do parasito em invadir a célula hospedeira. Na verdade, para alguns tipos celulares observou-se uma relação inversa, onde parasitos que se aderem menos apresentaram as maiores taxas de invasão. Estes dados suportam ainda a ideia de que as proteínas envolvidas em adesão podem diferir daquelas necessárias para a sinalização e desencadeamento do processo de invasão celular, sendo estas últimas provavelmente os fatores chave no processo de infecção da célula hospedeira.

A indução de sinal de cálcio, através do estímulo de receptores de superfície que levam à mobilização de estoques intracelulares deste íon ou através da indução de micro lesões na membrana plasmática da célula hospedeira, com consequente influxo de cálcio do meio extra para o meio intracelular, é uma etapa crucial para o sucesso de invasão pelo *T. cruzi* (FERNANDES; ANDREWS, 2012). Baseado no exposto acima, avaliamos se as alterações no perfil de invasão observado para as tripomastigotas TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} e TcY-L2^{-/-}, se correlacionavam a variações na capacidade de sinalização na célula hospedeira. Para isso, avaliamos o perfil de sinalização de cálcio e de injúria induzidos por tripomastigotas TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} e TcY-L2^{-/-} em mioblastos L6 e fibroblastos WT. Para esses ensaios, os dados obtidos, em geral, corroboraram os dados de invasão celular, com uma única exceção. Para os fibroblastos WT, tripomastigotas TcY-WT apresentaram taxas de invasão e indução de sinais de cálcio significativamente mais altas do que as tripomastigotas TcY-L2^{-/-}, no entanto, menores níveis de injúria às células hospedeiras. Vale ressaltar, no

entanto, que aqueles parasitos que induziram sinais de cálcio significativamente maiores e que apresentaram maior taxa de invasão, em geral apresentaram também as maiores porcentagens de células que sofreram micro injúrias após a exposição aos parasitos. Esses resultados reforçam que para a invasão celular, não só a indução de sinalização de cálcio via micro injúrias, mas também a sinalização através de estimulação de receptores na membrana da célula hospedeira e liberação de cálcio de estoques intracelulares é importante para o processo de invasão pelo *T. cruzi*. De fato, outras vias de indução de sinal de cálcio são utilizadas pelos parasitos que não somente a injúria celular (revisado por BURLEIGH; WOOLSEY, 2002). Como mencionado anteriormente, a sinalização de cálcio também pode ser induzida via sinalização proteica. Neste contexto, sinalizações mediadas por Oligopeptidase B (OPB), cruzipaína e gp82 já são conhecidas (revisado por BURLEIGH; WOOLSEY, 2002). Além disso, agonistas de cAMP (AMP cíclico), a ativação da célula hospedeira via sinalizações PI-3 quinase/Akt e a estimulação da fosforilação de resíduos de tirosina também auxiliam no processo de invasão celular pelo *T. cruzi* (revisado por BURLEIGH; WOOLSEY, 2002). É provável que a indução de micro injúrias seja um processo auxiliar e que pode contribuir juntamente com a sinalização via receptores para o processo de invasão. Vale ressaltar também que os diferentes grupos de parasitos apresentaram taxas menores de invasão nos mioblastos L6 quando comparado às taxas observadas com fibroblastos WT. Esses dados reforçam um papel complementar da indução de micro injúrias na invasão celular pelo *T. cruzi*.

Todas as alterações biológicas observadas para os três grupos de parasitos estudados apontam para diferenças no perfil de proteínas de superfície. Gonçalves e colaboradores (1991), demonstraram pela primeira vez que formas tripomastigotas de *T. cruzi* eram capazes de liberar no meio extracelular vesículas de tamanho em torno de 20-80nm (GONÇALVES et al., 1991). Posteriormente, mostrou-se que o principal componente dessas vesículas, após purificação e separação por tamanho, eram membros da superfamília TS/gp85 (TRIBULATTI et al., 2005). Outros autores também demonstraram a existência de moléculas contendo α -Gal (ACOSTA-SERRANO et al., 2001; ALMEIDA et al., 1994), proteases como cruzipaína (APARICIO; SCHARFSTEIN; LIMA, 2004), proteínas do citoesqueleto, proteínas da família MASP e várias outras proteínas com funções ainda desconhecidas (revisado por CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016). Estas vesículas possuem uma série de

proteínas presentes na superfície do parasito e, através de análises proteômicas, mostrou-se que parasitos de cepas diferentes, cepas Y (Tc-II) e YuYu (Tc-I), podem liberar vesículas de tamanhos distintos contendo proteínas diversas (RIBEIRO et al., 2018). As diferenças encontradas no conteúdo proteico dessas vesículas podem refletir parcialmente o conteúdo de superfície desses parasitos, conseqüentemente refletindo em padrões distintos de interação desses parasitos com a célula hospedeira (RIBEIRO et al., 2018).

Através de análise proteômica quantitativa via TMT-6plex, no presente trabalho foi possível confirmar que uma única passagem pelo ambiente intracelular é capaz de modular a abundância de proteínas de *T. cruzi*. Ainda, de forma importante, mostramos que o desenvolvimento do *T. cruzi* em um ambiente intracelular deficiente em proteínas LAMP-1 e 2 ou somente em LAMP-2 modulou diferencialmente as proteínas do parasito, inclusive proteínas de membrana. Em comparação ao proteoma de TcY-WT, os proteomas de TcY-L1/2^{-/-} e TcY-L2^{-/-} compartilharam apenas 13 proteínas reguladas, sendo 4 positivamente reguladas e 9 negativamente reguladas. Esses dados revelam que somente apenas um ciclo de infecção em um ambiente intracelular distinto é capaz de induzir mudanças nas moléculas de superfície do parasito. Em relação à análise de enriquecimento em proteínas de membrana, nós observamos que uma porcentagem considerável de proteínas apresentava predição de domínios transmembrana ou de secreção via clássica ou não clássica (Tabelas 1 e 5). As porcentagens encontradas em nosso conjunto de dados são corroboradas pela literatura, uma vez que, porcentagens próximas foram reportadas para os proteomas de superfícies de amastigotas axênicas e tripomastigotas de cultura (QUEIROZ et al., 2014) e para o secretoma de *T. cruzi* (BAYER-SANTOS et al., 2013).

A partir da comparação dos proteomas de TcY-L1/2^{-/-} ou TcY-L2^{-/-} com o proteoma de TcY-WT (Tabela 2) e da comparação entre os proteomas de TcY-L1/2^{-/-} e TcY-L2^{-/-} (Tabela 6), várias proteínas ancoradas à membrana por glicosilfosfatidilinositol (GPI), como *trans*-sialidases, mucinas, membros da família MASP e GP63, foram encontradas reguladas. E de fato, para as *trans*-sialidases, o padrão de reatividade dos extratos proteicos com o anticorpo mAb 39 foi diferente entre os parasitos, em especial para os extratos de TcY-L1/2^{-/-} e TcY-L2^{-/-}. É bastante reportado na literatura que proteínas contendo âncoras-GPI são vastamente encontradas na membrana plasmática de *T. cruzi* e que estas estão envolvidas em

vários aspectos da interação parasito-hospedeiro, como adesão e invasão de células hospedeiras, evasão do sistema imune, e também patogênese (BUSCAGLIA et al., 2006; FERGUSON, 1999; GAZZINELLI; DENKERS, 2006; MCCONVILLE; FERGUSON, 1993; MCCONVILLE; MENON, 2000).

Proteínas da família de mucinas e *trans*-sialidases são muito importantes para o processo de invasão pelo *T. cruzi*, visto que *trans*-sialidases podem se ligar a receptores da célula hospedeira e transferir resíduos de ácido siálico de glicoconjugados do hospedeiro para a principal família de proteínas do *T. cruzi*, as mucinas (BUSCAGLIA et al., 2006). A incubação de células LLC-MK2 com anticorpos produzidos contra glicopeptídeos sintéticos que mimetizam as glicoproteínas mucinas do parasito apresentaram um efeito considerável na invasão dessas por parasitos da cepa Y de *T. cruzi* (CAMPO et al., 2014). Outro trabalho mostrou que mucinas ancoradas por GPI purificadas de *T. cruzi* modularam a invasão de tripomastigotas da cepa Y durante a interação com células LLC-MK2 (SOARES et al., 2012). A análise transcriptômica de dois clones da cepa CL de *T. cruzi*, com alta virulência (CL Brener) e não virulenta (CL-14), revelou diferentes padrões de expressão de famílias gênicas que codificam para proteínas de superfície, como *trans*-sialidases, mucinas e MASPs (BELEW et al., 2017). Esta análise comparativa mostrou que o fenótipo não virulento da cepa CL-14 pode ser devido, em parte, a uma redução ou atraso na expressão de genes que codificam para essas proteínas de superfície (BELEW et al., 2017). Portanto, o fato de que estas proteínas foram evidenciadas como diferencialmente presentes em tripomastigotas TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} e TcY-L2^{-/-} talvez possa correlacionar com nossos achados biológicos para o processo de invasão.

Uma diferença notável observada no extrato proteico de tripomastigotas TcY-L2^{-/-} foram os altos níveis de atividade proteolítica quando comparado aos extratos de tripomastigotas TcY-WT e TcY-L1/2^{-/-}. De fato, a análise de seu subproteoma regulado mostrou um enriquecimento em termos relacionados à proteólise em comparação à TcY-WT e TcY-L1/2^{-/-} (Tabelas 4 e 7). Além das proteínas de proteassomo, outras 3 proteases de *T. cruzi* foram responsáveis por este enriquecimento de GO: metallopeptidase, Clan MF, Família M17, putative (TcYC6_0033380), cytoskeleton-associated protein CAP5.5, putative (TcYC6_0107360), e surface protease GP63, putative (TcYC6_0169090). A proteína metallopeptidase, Clan MF, Família 17, pertence à família de leucil-aminopeptidases (EC 3.4.11.1; LAPs) e é uma metaloaminopeptidase

que catalisa a remoção do N-terminal de resíduos de aminoácidos, preferencialmente leucina, de proteínas e peptídeos. Já foi demonstrado que esta peptidase é expressa em todas as formas de *T. cruzi* e não apresenta atividade gelatinolítica (CADAVID-RESTREPO et al., 2011). A proteína associada ao citoesqueleto CAP5.5, é uma proteína semelhante à calpaína que foi primeiramente reportada em *T. brucei* e apresenta modificações pós-traducionais como miristoilação e palmitoilação, indicando uma associação com a membrana plasmática (HERTZ-FOWLER; ERSFELD; GULL, 2001). Calpaínas são cisteíno proteinases dependentes de cálcio envolvidas em uma diversidade de processos celulares incluindo apoptose, transdução de sinais, remodelamento e diferenciação do citoesqueleto (ONO; SORIMACHI; SUZUKI, 1998). Proteínas semelhantes à calpaínas são calpaínas atípicas, envolvidas na transdução de sinais e diferenciação celular (DEAR et al., 1997). Em *T. cruzi*, a proteína associada ao citoesqueleto CAP5.5 foi identificada em estudos de membrana e miristoilação (CORDERO et al., 2009; ROBERTS; FAIRLAMB, 2016), e também estava presente no secretoma de tripomastigotas metacíclicas (BAYER-SANTOS et al., 2013). No entanto, Giese e colaboradores (2008) não detectaram atividade gelatinolítica em ensaios de zimografia para esta proteína, o que foi consistente com outras proteínas semelhantes à calpaína, sugerindo que esta proteína poderia ter um papel na transdução de sinais.

A protease de superfície GP63 é uma protease bem conhecida de *T. cruzi* importante para a infecção da célula hospedeira (CUEVAS; CAZZULO; SÁNCHEZ, 2003; KULKARNI et al., 2009). Essa proteína é expressa ao longo do ciclo de vida do parasito, mas apresentando membros com expressão estágio-específica (BERNÁ et al., 2017). A análise realizada por Cuevas, Cazzulo e Sánchez (2003) demonstrou que a família de GP63 apresenta vários membros, os quais foram agrupados pelos autores em Tcgp63-I e Tcgp63-II, e no grupo de pseudogenes Tcgp63-III. Apenas o grupo Tcgp63-I foi detectado em nível proteico sendo um grupo de enzimas proteolíticas ativas e que apresentam atividade gelatinolítica (CUEVAS; CAZZULO; SÁNCHEZ, 2003). Em nossos ensaios, nós observamos atividade gelatinolítica (bandas negativas com tamanhos entre 45 kDa e 66 kDa) que poderia ser relacionada à presença de GP63. Bandas com tamanhos similares foram reportadas anteriormente em estudos sobre as moléculas de GP63 em *T. cruzi* (REBELLO et al., 2019).

A partir da análise de enriquecimento de vias metabólicas, nós encontramos a via de metabolismo de esfingolipídeos enriquecida no subproteoma de membrana positivamente regulado de TcY-L1/2^{-/-}. Embora nós não tenhamos encontrado no subproteoma de membrana positivamente regulado, proteínas que se relacionassem diretamente com a via de metabolismo de esfingolipídios (BOOTH; SMITH, 2020), o *T. cruzi* sintetiza inositolfosforilceramida como seu fosfoesfingolipídio primário, o qual também é um lipídio anexo de âncoras GPI (BERTELLO et al., 1995; FIGUEIREDO et al., 2005; LESTER; DICKSON, 1993; MCCONVILLE; FERGUSON, 1993; UHRIG et al., 1996). De fato, as proteínas referentes à esta via pela análise de enriquecimento, a UDP-Gal or UDP-GlcNAc-dependent glycosyltransferase (TcYC6_0105630) e cinco membros de *trans*-sialidase (TcYC6_0128720, TcYC6_0128910, TcYC6_0129770, TcYC6_0130520, TcYC6_0131410), se correlacionariam melhor à via de âncoras GPI. O N-Acetilglucosamina (GlcNAc) é transferido para um acil/alquil-fosfatidilinositol por complexos de glicosiltransferases e *trans*-sialidasas são proteínas ancoradas à GPI (HEISE et al., 1996; PREVIATO et al., 2004). Tanto o processo de glicosilação quanto a produção de proteínas glicosiladas são conhecidamente importantes para mediação do reconhecimento celular, adesão e invasão de células hospedeiras, bem como evasão do sistema imune pelo parasito (ACOSTA-SERRANO et al., 2001; ALVES; COLLI, 2007; GIORGI; DE LEDERKREMER, 2011). Tripomastigotas TcY-L1/2^{-/-} possuem as taxas de invasão mais altas em fibroblastos WT quando comparados com tripomastigotas TcY-WT e TcY-L2^{-/-}. Essa diferença pode estar relacionada ao fato de essa via estar enriquecida positivamente.

A análise de enriquecimento de vias metabólicas também revelou três vias enriquecidas para tripomastigotas TcY-L2^{-/-} em comparação às tripomastigotas TcY-WT, sendo uma via proveniente da lista de proteínas negativamente reguladas (metabolismo de éter-lipídio) e duas vias da lista de proteínas positivamente reguladas (metabolismo de arginina e prolina, bem como biossíntese de diterpenóides). A síntese de éter-lipídios ainda não foi completamente elucidada e muitas proteínas envolvidas na via ainda carecem de caracterização em *T. cruzi* (BOOTH; SMITH, 2020). O aminoácido prolina tem sido demonstrado envolvido em vários aspectos essenciais do ciclo de vida do *T. cruzi*, da diferenciação de epimastigotas para tripomastigotas metacíclicas e entre os estágios intracelulares à invasão de células hospedeiras e sobrevivência de estresses termais e nutricionais (MARTINS et al.,

2009; PAES et al., 2013; TONELLI et al., 2004). Tonelli e colaboradores (2004) observaram que sob suplementação de L-prolina, culturas infectadas de células CHO-K1 liberaram um maior número de tripomastigotas para o meio extracelular do quinto ao nono dia após a infecção. No entanto, os autores não mediram a multiplicação intracelular do parasito (TONELLI et al., 2004). Baseados nesses dados, nos dados anteriores do nosso grupo (ALBERTTI et al., 2010) e na análise de enriquecimento de vias metabólicas mencionada acima, é possível que tripomastigotas derivadas de fibroblastos deficientes em LAMP-2 possam apresentar um metabolismo de prolina mais ativo o que poderia explicar a alta taxa de multiplicação intracelular anteriormente observada para estes parasitos (ALBERTTI et al., 2010). Dados experimentais ainda são necessários para explicar esta hipótese. Adicionalmente, Martins e colaboradores (2009) observaram uma recuperação da capacidade de invasão mediada por gp82, promovida pelo tratamento de L-prolina de tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* após 54hs em meio deficiente em nutrientes (MARTINS et al., 2009). Os autores também observaram que a L-prolina aumentou a habilidade de tripomastigotas da cepa CL de *T. cruzi* em atravessar a camada de mucina gástrica em direção às células epiteliais da camada mucosa do estômago, o que é um passo essencial para invasões celulares subsequentes.

Esta tese de doutorado provê evidências de que o ambiente intracelular é capaz de modular o comportamento biológico de *T. cruzi* através da indução de mudanças em suas proteínas de superfície. Os resultados descritos neste trabalho nos direciona a acreditar que essa modulação intracelular possa ser parte da adaptabilidade e também da habilidade do *T. cruzi* em infectar diferentes tipos celulares. Em consequência a modulação das proteínas de superfície poderiam contribuir para o tropismo para tecidos específicos e talvez também para o escape do sistema imune do hospedeiro pelo parasito. Evidências para esta hipótese ainda são necessárias.

7 CONCLUSÕES

O presente estudo representa uma tentativa de compreender as alterações que um ambiente intracelular distinto induz no *T. cruzi* através da caracterização de aspectos biológicos e moleculares do parasito. Considerando-se os resultados expostos neste trabalho, pode-se concluir que:

- a) Uma única passagem em um ambiente intracelular diferente é suficiente para desencadear alterações nas características biológicas do *T. cruzi*;
- b) A adesão e a invasão não se correlacionam diretamente, sendo possível que grupos de parasitos com menores taxas de adesão apresentem maiores taxas de invasão;
- c) A interação parasito-célula hospedeira também é dependente do par célula-parasito, uma vez que o *T. cruzi* é capaz de interagir diferencialmente com linhagens distintas de células, podendo ser mais infectante em um tipo celular do que em outro;
- d) Uma única passagem em um ambiente intracelular diferente desencadeia alterações na abundância de proteínas do *T. cruzi*, evidenciando sua capacidade adaptativa.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA-SERRANO, A. et al. The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: Structure and biological roles. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 114, n. 2, p. 143–150, 2001.
- ADEREM, A. Signal transduction and the actin cytoskeleton: the roles of MARCKS and profilin. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 17, n. 10, p. 438–443, Oct. 1992.
- ALBERTTI, L. A. G. et al. Role of host lysosomal associated membrane protein (LAMP) in *Trypanosoma cruzi* invasion and intracellular development. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 10, p. 784–789, 2010.
- ALMAGRO ARMENTEROS, J. J. et al. DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. **Bioinformatics**, v. 33, n. 21, p. 3387–3395, 1 Nov. 2017.
- ALMAGRO ARMENTEROS, J. J. et al. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 420–423, 18 Apr. 2019.
- ALMEIDA, I. C. et al. GPI-anchored glycoconjugates from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes are recognized by lytic anti-alpha-galactosyl antibodies isolated from patients with chronic Chagas' disease. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 27, n. 2, p. 443–7, Feb. 1994.
- ALVES, M. J. M. et al. Comprehensive glycoprofiling of the epimastigote and trypomastigote stages of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Proteomics**, v. 151, p. 182–192, Jan. 2017.
- ALVES, M. J. M.; COLLI, W. *Trypanosoma cruzi*: adhesion to the host cell and intracellular survival. **IUBMB life**, v. 59, n. 4–5, p. 274–9, 2007.
- AMORIM, J. C. et al. Quantitative proteome and phosphoproteome analyses highlight the adherent population during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 9899, 2017.
- ANDRADE, L. O. et al. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 100, n. 2, p. 163–172, 1999.
- ANDRADE, L. O. et al. Differential tissue tropism of *Trypanosoma cruzi* strains: an in vitro study. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 6, p. 834–837, Sep. 2010.
- ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. Lysosomal Fusion Is Essential for the Retention of *Trypanosoma cruzi* Inside Host Cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 200, n. 9, p. 1135–1143, 1 Nov. 2004.
- ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. **Nature reviews. Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 819–823, 2005a.
- ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 819–823,

9 Oct. 2005b.

ANDREJEWSKI, N. et al. Normal lysosomal morphology and function in LAMP-1-deficient mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 18, p. 12692–12701, 1999.

ANDREWS, N. W. et al. Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. **Experimental parasitology**, v. 64, n. 3, p. 474–84, Dec. 1987.

ANDREWS, N. W. et al. A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: Evidence for membrane pore-forming activity at low pH. **Cell**, v. 61, n. 7, p. 1277–1287, 1990.

ANDREWS, N. W. Lysosomes and the plasma membrane. **Journal of Cell Biology**, v. 158, n. 3, p. 389–394, 5 Aug. 2002.

ANDREWS, N. W.; ALMEIDA, P. E.; CORROTTE, M. Damage control: cellular mechanisms of plasma membrane repair. **Trends in Cell Biology**, v. 24, n. 12, p. 734–742, Dec. 2014.

ANDREWS, N. W.; COLLI, W. Adhesion and Interiorization of *Trypanosoma cruzi* in Mammalian Cells. **The Journal of Protozoology**, v. 29, n. 2, p. 264–269, May 1982.

ANDREWS, N. W.; WHITLOW, M. B. Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin active at low pH. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 33, n. 3, p. 249–256, 1989.

APARICIO, I. M.; SCHARFSTEIN, J.; LIMA, A. P. C. A. A new cruzipain-mediated pathway of human cell invasion by *Trypanosoma cruzi* requires trypomastigote membranes. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 10, p. 5892–5902, 2004.

ARGOLO, A. M. et al. **Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil**. [s.l.: s.n.].

ATWOOD, J. A. et al. The *Trypanosoma cruzi* proteome. **Science (New York, N.Y.)**, v. 309, n. 5733, p. 473–476, 2005.

AVILA, C. et al. Proteome-Wide Analysis of *Trypanosoma cruzi* Exponential and Stationary Growth Phases Reveals a Subcellular Compartment-Specific Regulation. **Genes**, v. 9, n. 8, p. 413, 15 Aug. 2018.

BALOUZ, V. et al. Mapping antigenic motifs in the trypomastigote small surface antigen from *Trypanosoma cruzi*. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 22, n. 3, p. 304–312, 2015.

BARBOSA, H. S.; DE MEIRELLES, M. DE N. Ultrastructural detection in vitro of WGA-, RCA I-, and Con A-binding sites involved in the invasion of heart muscle cells by *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology research**, v. 78, n. 5, p. 404–409, 1992.

BARRIAS, E. S.; DE CARVALHO, T. M. U.; DE SOUZA, W. *Trypanosoma cruzi*: Entry into Mammalian Host Cells and Parasitophorous Vacuole Formation. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. AUG, 2013.

BAYER-SANTOS, E. et al. Proteomic analysis of *trypanosoma cruzi* secretome: Characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 2, p. 883–897, 2013.

- BELEW, A. T. et al. Comparative transcriptome profiling of virulent and non-virulent *Trypanosoma cruzi* underlines the role of surface proteins during infection. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 12, p. e1006767, 14 Dec. 2017.
- BENDTSEN, J. D. et al. Non-classical protein secretion in bacteria. **BMC microbiology**, v. 5, p. 58, 7 Oct. 2005.
- BERNÁ, L. et al. Transcriptomic analysis reveals metabolic switches and surface remodeling as key processes for stage transition in *Trypanosoma cruzi*. **PeerJ**, v. 5, p. e3017, 2017.
- BERNÁ, L. et al. Expanding an expanded genome: long-read sequencing of *Trypanosoma cruzi*. **Microbial genomics**, v. 4, n. 5, 2018.
- BERTELLO, L. E. et al. Structural analysis of inositol phospholipids from *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms. **The Biochemical journal**, v. 310 (Pt 1, p. 255–61, 15 Aug. 1995.
- BOOTH, L.; SMITH, T. K. Lipid metabolism in *Trypanosoma cruzi*: A review. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 240, n. June, p. 111324, 2020.
- BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 May 1976.
- BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma Cruzi*. **Annual Review of Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 347–382, Oct. 1973.
- BROSSAS, J.-Y. et al. Secretome analysis of *Trypanosoma cruzi* by proteomics studies. **PLOS ONE**, v. 12, n. 10, p. e0185504, 3 Oct. 2017.
- BURLEIGH, B. A. et al. A cytosolic serine endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* is required for the generation of Ca²⁺ signaling in mammalian cells. **Journal of Cell Biology**, v. 136, n. 3, p. 609–620, 1997.
- BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N. W. Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, n. 4, p. 461–465, Aug. 1998.
- BURLEIGH, B. A.; WOOLSEY, A. M. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. **Cellular Microbiology**, v. 4, n. 11, p. 701–711, Nov. 2002.
- BUSCAGLIA, C. A. et al. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 229–236, Mar. 2006.
- BUSTAMANTE, J.; TARLETON, R. Reaching for the holy grail: Insights from infection/cure models on the prospects for vaccines for *Trypanosoma cruzi* infection. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 445–451, 2015.
- CADAVID-RESTREPO, G. et al. The major leucyl aminopeptidase of *Trypanosoma cruzi* (LAPTc) assembles into a homohexamer and belongs to the M17 family of metallopeptidases. **BMC Biochemistry**, v. 12, n. 1, p. 46, 2011.
- CALER, E. V. et al. Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **EMBO Journal**, v. 17, n. 17, p. 4975–4986, 1998.
- CALER, E. V. et al. Dual role of signaling pathways leading to Ca²⁺ and cyclic AMP elevation in host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 12, p. 6602–6610, 2000.

- CALLEJAS-HERNÁNDEZ, F. et al. Genomic assemblies of newly sequenced *Trypanosoma cruzi* strains reveal new genomic expansion and greater complexity. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 14631, 2 Dec. 2018.
- CÁMARA, M. DE LOS M. et al. The Trypomastigote Small Surface Antigen (TSSA) regulates *Trypanosoma cruzi* infectivity and differentiation. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 8, p. e0005856, 11 Aug. 2017.
- CAMPO, V. L. et al. Antibodies against Mucin-Based Glycopeptides Affect *Trypanosoma cruzi* Cell Invasion and Tumor Cell Viability. **ChemBioChem**, v. 15, n. 10, p. 1495–1507, 7 Jul. 2014.
- CÁNEPA, G. E. et al. Involvement of TSSA (trypomastigote small surface antigen) in *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. **Biochemical Journal**, v. 444, n. 2, p. 211–218, 2012.
- CANO, M. I. et al. Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome project. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 71, n. 2, p. 273–8, May 1995.
- CARDOSO, M. S.; REIS-CUNHA, J. L.; BARTHOLOMEU, D. C. Evasion of the Immune Response by *Trypanosoma cruzi* during Acute Infection. **Frontiers in immunology**, v. 6, n. JAN, p. 659, 2015.
- CATHERMAN, A. D.; SKINNER, O. S.; KELLEHER, N. L. Top Down proteomics: Facts and perspectives. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 445, n. 4, p. 683–693, Mar. 2014.
- CAZORLA, S. I. et al. Oral Multicomponent DNA Vaccine Delivered by Attenuated Salmonella Elicited Immunoprotection Against American Trypanosomiasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 5, p. 698–707, 1 Mar. 2015.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159–218, 1909.
- CHAIT, B. T. CHEMISTRY: Mass Spectrometry: Bottom-Up or Top-Down? **Science**, v. 314, n. 5796, p. 65–66, 6 Oct. 2006.
- CHEN, J. W. et al. Identification of two lysosomal membrane glycoproteins. **The Journal of cell biology**, v. 101, n. 1, p. 85–95, 1 Jul. 1985.
- CHENG, L. et al. Peptide Labeling Using Isobaric Tagging Reagents for Quantitative Phosphoproteomics. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1355, p. 53–70, 2016.
- CIAVAGLIA, M. DO C.; DE CARVALHO, T. U.; DE SOUZA, W. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with cells with altered glycosylation patterns. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 193, n. 2, p. 718–721, 1993.
- CORDERO, E. M. et al. Proteomic analysis of detergent-solubilized membrane proteins from insect-developmental forms of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of proteome research**, v. 8, n. 7, p. 3642–52, Jul. 2009.
- CORREIA, J. R. et al. Doença de Chagas: aspectos clínicos, epidemiológicos e fisiopatológicos. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 13, n. 3, p. e6502, 2 Mar. 2021.

CORROTTE, M. et al. Caveolae internalization repairs wounded cells and muscle fibers. **eLife**, v. 2013, n. 2, 2013.

COURA, J. R. The main sceneries of chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 277–282, 2015.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 5–13, 2010.

COUTO, N. F. et al. LAMP-2 absence interferes with plasma membrane repair and decreases *T. cruzi* host cell invasion. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 6, p. e0005657, 6 Jun. 2017.

CUEVAS, I. C.; CAZZULO, J. J.; SÁNCHEZ, D. O. gp63 Homologues in *Trypanosoma cruzi*: Surface Antigens with Metalloprotease Activity and a Possible Role in Host Cell Infection. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 10, p. 5739–5749, Oct. 2003.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M. U.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host cell interaction. **International Journal of Cell Biology**, 2010.

DEAR, N. et al. A new subfamily of vertebrate calpains lacking a calmodulin-like domain: implications for calpain regulation and evolution. **Genomics**, v. 45, n. 1, p. 175–84, 1 Oct. 1997.

DEUTSCH, E. W. et al. The ProteomeXchange consortium in 2020: enabling “big data” approaches in proteomics. **Nucleic acids research**, v. 48, n. D1, p. D1145–D1152, 2020.

DI NOIA, J. M. et al. A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas’ disease is due to a single parasite lineage. **The Journal of experimental medicine**, v. 195, n. 4, p. 401–413, 2002.

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

DUMETZ, F. et al. Modulation of Aneuploidy in *Leishmania donovani* during Adaptation to Different In Vitro and In Vivo Environments and Its Impact on Gene Expression. **mBio**, v. 8, n. 3, 5 Jul. 2017.

DUPREE, E. J. et al. A Critical Review of Bottom-Up Proteomics: The Good, the Bad, and the Future of This Field. **Proteomes**, v. 8, n. 3, p. 14, 6 Jul. 2020.

EGIMA, C. M. et al. Organization of trans-sialidase genes in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 77, n. 2, p. 115–125, 1996.

EISENHABER, B. et al. Automated annotation of GPI anchor sites: case study *C. elegans*. **Trends in biochemical sciences**, v. 25, n. 7, p. 340–1, Jul. 2000.

EISENHABER, B.; BORK, P.; EISENHABER, F. Sequence properties of GPI-anchored proteins near the omega-site: constraints for the polypeptide binding site of the putative transamidase. **Protein Engineering Design and Selection**, v. 11, n. 12, p. 1155–1161, 1 Dec. 1998.

EISENHABER, B.; BORK, P.; EISENHABER, F. Prediction of potential GPI-modification sites in proprotein sequences. **Journal of molecular biology**, v. 292, n.

3, p. 741–58, 24 Sep. 1999.

EL-SAYED, N. M. et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science (New York, N.Y.)**, v. 309, n. 5733, p. 409–15, 15 Jul. 2005.

ESKELINEN et al. Role of LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. **Molecular biology of the cell**, v. 13, p. 3355–3368, 2002.

ESKELINEN, E.-L. et al. Disturbed Cholesterol Traffic but Normal Proteolytic Function in LAMP-1/LAMP-2 Double-deficient Fibroblasts. **Molecular Biology of the Cell**, v. 15, n. 7, p. 3132–3145, Jul. 2004.

ESKELINEN, E. L. Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 5–6, p. 495–502, 2006.

ESKELINEN, E. L.; TANAKA, Y.; SAFTIG, P. At the acidic edge: Emerging functions for lysosomal membrane proteins. **Trends in Cell Biology**, v. 13, n. 3, p. 137–145, 2003.

FANKHAUSER, N.; MÄSER, P. Sequence analysis Identification of GPI anchor attachment signals by a Kohonen self-organizing map. v. 21, n. 9, p. 1846–1852, 2005.

FERGUSON, M. A. The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. **Journal of cell science**, v. 112 (Pt 1, p. 2799–809, Sep. 1999.

FERNANDES, M. C. et al. *Trypanosoma cruzi* subverts the sphingomyelinase-mediated plasma membrane repair pathway for cell invasion. **Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 5, p. 909–921, 9 May 2011.

FERNANDES, M. C.; ANDREWS, N. W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: A unique strategy that promotes persistence. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 3, p. 734–747, 2012.

FERRI, G.; EDREIRA, M. M. All Roads Lead to Cytosol: *Trypanosoma cruzi* Multi-Strategic Approach to Invasion. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 5 Mar. 2021.

FIGUEIREDO, J. M. et al. Characterization of the inositol phosphorylceramide synthase activity from *Trypanosoma cruzi*. **The Biochemical journal**, v. 387, n. Pt 2, p. 519–29, 15 Apr. 2005.

FRANZÉN, O. et al. Shotgun sequencing analysis of *Trypanosoma cruzi* I Sylvio X10/1 and comparison with *T. cruzi* VI CL Brener. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 3, p. e984, 8 Mar. 2011.

FUKUDA, M. Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. **The Journal of biological chemistry**, v. 266, n. 32, p. 21327–30, 15 Nov. 1991.

GAZZINELLI, R. T.; DENKERS, E. Y. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. **Nature reviews. Immunology**, v. 6, n. 12, p. 895–906, Dec. 2006.

GIESE, V. et al. *Trypanosoma cruzi*: a stage-specific calpain-like protein is induced after various kinds of stress. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 6, p.

598–601, Sep. 2008.

GIORGI, M. E.; DE LEDERKREMER, R. M. Trans-sialidase and mucins of *Trypanosoma cruzi*: an important interplay for the parasite. **Carbohydrate research**, v. 346, n. 12, p. 1389–93, 6 Sep. 2011.

GOMES, C. et al. American trypanosomiasis and Chagas disease: Sexual transmission. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 81, p. 81–84, Apr. 2019.

GONÇALVES, M. F. et al. *Trypanosoma cruzi*: shedding of surface antigens as membrane vesicles. **Experimental parasitology**, v. 72, n. 1, p. 43–53, Jan. 1991.

GRISARD, E. C. et al. *Trypanosoma cruzi* Clone Dm28c Draft Genome Sequence. **Genome announcements**, v. 2, n. 1, 30 Jan. 2014.

GUHL, F. Chagas disease in pre-Colombian civilizations. In: **American Trypanosomiasis Chagas Disease**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 23–46.

GUHL, F.; RAMÍREZ, J. D. Poverty, Migration, and Chagas Disease. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 8, n. 1, p. 52–58, 11 Mar. 2021.

GUPTA, S.; GARG, N. J. A Two-Component DNA-Prime/Protein-Boost Vaccination Strategy for Eliciting Long-Term, Protective T Cell Immunity against *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 5, 2015.

HALL, B. F. et al. Desialylation of lysosomal membrane glycoproteins by *Trypanosoma cruzi*: a role for the surface neuraminidase in facilitating parasite entry into the host cell cytoplasm. **Journal of Experimental Medicine**, v. 176, n. 2, p. 313–325, 1 Aug. 1992.

HEISE, N. et al. Identification of Complete Precursors for the Glycosylphosphatidylinositol Protein Anchors of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 28, p. 16877–16887, Jul. 1996.

HERREROS-CABELLO, A. et al. Comparative proteomic analysis of trypomastigotes from *Trypanosoma cruzi* strains with different pathogenicity. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 76, p. 104041, Dec. 2019.

HERTZ-FOWLER, C.; ERSFELD, K.; GULL, K. CAP5.5, a life-cycle-regulated, cytoskeleton-associated protein is a member of a novel family of calpain-related proteins in *Trypanosoma brucei*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 116, n. 1, p. 25–34, Aug. 2001.

HULL, R. N.; CHERRY, W. R.; TRITCH, O. J. Growth characteristics of monkey kidney cell strains LLC-MK1, LLC-MK2, and LLC-MK2(NCTC-3196) and their utility in virus research. **The Journal of experimental medicine**, v. 115, n. 11, p. 903–918, 1962.

HUYNH, K. K. et al. LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. **The EMBO Journal**, v. 26, n. 2, p. 313–324, 24 Jan. 2007.

JANSEN, A. M.; ROQUE, A. L. R.; XAVIER, S. C. C. *Trypanosoma cruzi* enzootic cycle. In: **American Trypanosomiasis Chagas Disease**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 265–282.

JUNQUEIRA, C. et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert Reviews in Molecular**

Medicine, v. 12, p. e29, 2010.

KORNFELD, S.; MELLMAN, I. The Biogenesis of Lysosomes. **Annual Review of Cell Biology**, v. 5, n. 1, p. 483–525, 1989.

KROGH, A. et al. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. **Journal of molecular biology**, v. 305, n. 3, p. 567–80, 19 Jan. 2001.

KULKARNI, M. M. et al. Trypanosoma cruzi GP63 Proteins Undergo Stage-Specific Differential Posttranslational Modification and Are Important for Host Cell Infection. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 5, p. 2193–2200, May 2009.

LEBER, T. M.; BALKWILL, F. R. Zymography: A Single-Step Staining Method for Quantitation of Proteolytic Activity on Substrate Gels. **Analytical Biochemistry**, v. 249, n. 1, p. 24–28, Jun. 1997.

LESTER, R. L.; DICKSON, R. C. Sphingolipids with inositolphosphate-containing head groups. **Advances in lipid research**, v. 26, p. 253–74, 1993.

LEVIN, M. J. [Contribution of the Trypanosoma cruzi Genome Project to the understanding of the pathogenesis of Chagas disease]. **Medicina**, v. 59 Suppl 2, p. 18–24, 1999.

LI, Z. et al. Salmonella Proteomic Profiling during Infection Distinguishes the Intracellular Environment of Host Cells. **mSystems**, v. 4, n. 2, 30 Apr. 2019.

MACEDO, A. M. et al. Trypanosoma cruzi: Genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 1, p. 1–12, 2004.

MAEDA, F. Y. et al. Host cell invasion and oral infection by Trypanosoma cruzi strains of genetic groups TcI and TcIV from chagasic patients. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 189, 1 Dec. 2016.

MANDACARU, S. C. et al. Exoproteome profiling of Trypanosoma cruzi during amastigogenesis early stages. **PLoS one**, v. 14, n. 11, p. e0225386, 2019.

MARTINS, R. M. et al. Use of L-proline and ATP production by Trypanosoma cruzi metacyclic forms as requirements for host cell invasion. **Infection and immunity**, v. 77, n. 7, p. 3023–32, Jul. 2009.

MATTEI, M. G. et al. Two human lysosomal membrane glycoproteins, h-lamp-1 and h-lamp-2, are encoded by genes localized to chromosome 13q34 and chromosome Xq24-25, respectively. **The Journal of biological chemistry**, v. 265, n. 13, p. 7548–51, 5 May 1990.

MCCONVILLE, M. J.; FERGUSON, M. A. J. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. **Biochemical Journal**, v. 294, n. 2, p. 305–324, 1 Sep. 1993.

MCCONVILLE, M. J.; MENON, A. K. Recent developments in the cell biology and biochemistry of glycosylphosphatidylinositol lipids (review). **Molecular membrane biology**, v. 17, n. 1, p. 1–16, 2000.

MEIRELLES, M. N. L. et al. Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of Trypanosoma cruzi in vitro. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 52, n. 2, p. 175–184,

1992.

MELO-BRAGA, M. N. et al. Comprehensive quantitative comparison of the membrane proteome, phosphoproteome, and sialome of human embryonic and neural stem cells. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 13, n. 1, p. 311–328, 2014.

MICHALSKI, A. et al. Mass spectrometry-based proteomics using Q Exactive, a high-performance benchtop quadrupole Orbitrap mass spectrometer. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 10, n. 9, p. M111.011015, Sep. 2011.

MILES, M. A.; FELICIANGELI, M. D.; DE ARIAS, A. R. American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. **BMJ**, v. 326, n. 7404, p. 1444–1448, 26 Jun. 2003.

MORENO, S. N. J.; DOCAMPO, R. Calcium regulation in protozoan parasites. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 359–364, 2003.

MULE, S. N. et al. PhyloQuant approach provides insights into *Trypanosoma cruzi* evolution using a systems-wide mass spectrometry-based quantitative protein profile. **Communications biology**, v. 4, n. 1, p. 324, 2021.

MURTA, A. C. M. et al. Structural and functional identification of GP57/51 antigen of *Trypanosoma cruzi* as a cysteine proteinase. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 43, n. 1, p. 27–38, 1990.

OCAÑA-MAYORGA, S. et al. Triatomine Feeding Profiles and *Trypanosoma cruzi* Infection, Implications in Domestic and Sylvatic Transmission Cycles in Ecuador. **Pathogens**, v. 10, n. 1, p. 42, 7 Jan. 2021.

OLIVEIRA, A. C. S. **Caracterização biológica de tripomastigotas de T. cruzi provenientes de células deficientes em LAMP**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2017.

OLIVEIRA, A. G. et al. Calcium signalling from the type I inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is required at early phase of liver regeneration. **Liver International**, v. 35, n. 4, p. 1162–1171, Apr. 2015.

ONO, Y.; SORIMACHI, H.; SUZUKI, K. Structure and Physiology of Calpain, an Enigmatic Protease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 245, n. 2, p. 289–294, Apr. 1998.

ORTIZ, J. V. et al. Cardiac Evaluation in the Acute Phase of Chagas' Disease with Post-Treatment Evolution in Patients Attended in the State of Amazonas, Brazil. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 2018.

PABA, J. et al. Proteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. **PROTEOMICS**, v. 4, n. 4, p. 1052–1059, Apr. 2004a.

PABA, J. et al. Proteomic Analysis of *Trypanosoma cruzi* Developmental Stages Using Isotope-Coded Affinity Tag Reagents. **Journal of Proteome Research**, v. 3, n. 3, p. 517–524, Jun. 2004b.

PAES, L. S. et al. Proline dehydrogenase regulates redox state and respiratory metabolism in *Trypanosoma cruzi*. **PLoS one**, v. 8, n. 7, p. e69419, 2013.

PAIVA, C. N. et al. High expression of a functional cruzipain by a non-infective and non-pathogenic *Trypanosoma cruzi* clone. **Parasitology**, v. 117 (Pt 5, p. 483–490,

1998.

PECH-CANUL, Á. DE LA C.; MONTEÓN, V.; SOLÍS-OVIEDO, R.-L. A Brief View of the Surface Membrane Proteins from *Trypanosoma cruzi*. **Journal of parasitology research**, v. 2017, p. 3751403, 2017.

PEDERSANE, D. D. C. N. **ESTUDO DO PAPEL DIFERENCIAL DE CADA UMA DAS ISOFORMAS DA PROTEÍNA LISOSSOMAL LAMP (LAMP-1E LAMP-2) NO PROCESSO DE INFECÇÃO CELULAR PELO TRYPANOSOMA CRUZI**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.

PEREZ-RIVEROL, Y. et al. The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D442–D450, 8 Jan. 2019.

PIELES, U. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for the mass and sequence analysis of natural and modified oligonucleotides. **Nucleic acids research**, v. 21, n. 14, p. 3191–6, 11 Jul. 1993.

PINTO, M. C. X. et al. The Cytotoxic and Proapoptotic Activities of Hypnophilin are Associated with Calcium Signaling in UACC-62 Cells. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 27, n. 11, p. 479–485, Nov. 2013.

PIRAS, M.; PIRAS, R.; HENRÍQUEZ, D. Changes in morphology and infectivity of cell culture-derived trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 6, n. 2, p. 67–81, Aug. 1982.

PIRAS, R.; PIRAS, M. M.; HENRÍQUEZ, D. *Trypanosoma cruzi*-fibroblastic cell interactions necessary for cellular invasion. **Ciba Foundation symposium**, v. 99, p. 31–51, 1983.

PREVIATO, J. O. et al. Glycoinositolphospholipid from *Trypanosoma cruzi*: structure, biosynthesis and immunobiology. **Advances in parasitology**, v. 56, p. 1–41, 2004.

QUEIROZ, R. M. L. et al. Comprehensive proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* epimastigote cell surface proteins by two complementary methods. **Journal of proteome research**, v. 12, n. 7, p. 3255–63, 5 Jul. 2013.

QUEIROZ, R. M. L. et al. Cell Surface Proteome Analysis of Human-Hosted *Trypanosoma cruzi* Life Stages. **Journal of Proteome Research**, v. 13, n. 8, p. 3530–3541, 14 Aug. 2014.

QUEIROZ, R. M. L. et al. Insight into the Exoproteome of the Tissue-Derived Trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Chemistry**, v. 4, 7 Nov. 2016.

RASSI, A.; RASSI, A.; REZENDE, J. M. DE. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 275–291, Jun. 2012.

REBELLO, K. M. et al. Participation of *Trypanosoma cruzi* gp63 molecules on the interaction with *Rhodnius prolixus*. **Parasitology**, v. 146, n. 8, p. 1075–1082, 6 Jul. 2019.

RIBEIRO, A. L.; ROCHA, M. O. [Indeterminate form of Chagas disease: considerations about diagnosis and prognosis]. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 3, p. 301–14, 1998.

- RIBEIRO, K. S. et al. Proteomic analysis reveals different composition of extracellular vesicles released by two *Trypanosoma cruzi* strains associated with their distinct interaction with host cells. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 7, n. 1, p. 1463779, 1 Dec. 2018.
- ROBERTS, A. J.; FAIRLAMB, A. H. The N-myristoylome of *Trypanosoma cruzi*. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 31078, 5 Nov. 2016.
- RODRÍGUEZ, A. et al. A trypanosome-soluble factor induces IP3 formation, intracellular Ca^{2+} mobilization and microfilament rearrangement in host cells. **Journal of Cell Biology**, v. 129, n. 5, p. 1263–1273, 1995.
- ROGERS, J. C.; BOMGARDEN, R. D. Sample Preparation for Mass Spectrometry-Based Proteomics; from Proteomes to Peptides. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 919, p. 43–62, 2016.
- ROMANO, P. S. et al. The autophagic pathway is a key component in the lysosomal dependent entry of *Trypanosoma cruzi* into the host cell. **Autophagy**, v. 5, n. 1, p. 6–18, Jan. 2009.
- ROMANO, P. S. et al. Molecular and cellular mechanisms involved in the *Trypanosoma cruzi*/host cell interplay. **IUBMB Life**, v. 64, n. 5, p. 387–396, May 2012.
- ROSS, P. L. et al. Multiplexed Protein Quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* Using Amine-reactive Isobaric Tagging Reagents. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 3, n. 12, p. 1154–1169, Dec. 2004.
- RUBIN-DE-CELIS, S. S. C. et al. Expression of trypanomastigote trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* increases parasite escape from its parasitophorous vacuole. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 12, p. 1888–1898, 2006.
- SCHARFSTEIN, J. et al. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors. **The Journal of experimental medicine**, v. 192, n. 9, p. 1289–1300, 2000.
- SCHENKMAN, S. et al. A novel cell surface trans-sialidase of *trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. **Cell**, v. 65, n. 7, p. 1117–1125, 1991.
- SCHENKMAN, S. et al. Evidence for the participation of the Ssp-3 antigen in the invasion of non-phagocytic mammalian cells by *Trypanosoma cruzi*. **J. Exp. Med.**, v. 175, n. June, p. 1635–1641, 1992.
- SCHENKMAN, S.; DIAZ, C.; NUSSENZWEIG, V. Attachment of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to receptors at restricted cell surface domains. **Experimental Parasitology**, v. 72, n. 1, p. 76–86, 1991.
- SCHENKMAN, S.; PONTES DE CARVALHO, L.; NUSSENZWEIG, V. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and neuraminidase activities can be mediated by the same enzymes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 175, n. 2, p. 567–575, 1 Feb. 1992.
- SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 14–21, Jul. 2010.
- SCHNEEDE, A. et al. Role for LAMP-2 in endosomal cholesterol transport. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 15, n. 2, p. 280–295, Feb. 2011.

- SOARES, R. P. et al. Intraspecies variation in *Trypanosoma cruzi* GPI-mucins: biological activities and differential expression of α -galactosyl residues. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 87, n. 1, p. 87–96, Jul. 2012.
- SONNHAMMER, E. L.; VON HEIJNE, G.; KROGH, A. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. **Proceedings. International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology**, v. 6, p. 175–82, 1998.
- SUNYAEV, S. R. et al. PSIC: profile extraction from sequence alignments with position-specific counts of independent observations. **Protein engineering**, v. 12, n. 5, p. 387–94, May 1999.
- SUPEK, F. et al. REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. e21800, 18 Jul. 2011.
- TAM, C. et al. Exocytosis of acid sphingomyelinase by wounded cells promotes endocytosis and plasma membrane repair. **Journal of Cell Biology**, v. 189, n. 6, p. 1027–1038, 14 Jun. 2010.
- TANAKA, Y. et al. Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. **Nature**, v. 406, n. 6798, p. 902–906, 2000.
- TARDIEUX, I. et al. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. **Cell**, v. 71, n. 7, p. 1117–1130, Dec. 1992.
- TARDIEUX, I.; NATHANSON, M. H.; ANDREWS, N. W. Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic-free Ca^{2+} transients. **The Journal of experimental medicine**, v. 179, n. 3, p. 1017–22, 1994.
- THOMPSON, A. et al. Tandem Mass Tags: A Novel Quantification Strategy for Comparative Analysis of Complex Protein Mixtures by MS/MS. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 8, p. 1895–1904, 1 Apr. 2003.
- THOMPSON, A. et al. TMTpro: Design, Synthesis, and Initial Evaluation of a Proline-Based Isobaric 16-Plex Tandem Mass Tag Reagent Set. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 24, p. 15941–15950, 17 Dec. 2019.
- TIMENETSKY, J. et al. Detection of multiple mycoplasma infection in cell cultures by PCR. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 7, p. 907–914, 2006.
- TONELLI, R. R. et al. L-proline is essential for the intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **Cellular microbiology**, v. 6, n. 8, p. 733–41, Aug. 2004.
- TRIBULATTI, M. V. et al. The trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* induces thrombocytopenia during acute Chagas' disease by reducing the platelet sialic acid contents. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 1, p. 201–207, 2005.
- TROCOLI TORRECILHAS, A. C. et al. *Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 1, p. 29–39, 2009.
- UHRIG, M. L. et al. Characterization of inositolphospholipids in *Trypanosoma cruzi* trypomastigote forms. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1300, n. 3, p. 233–9, 20 May 1996.

- URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: Controversies and advances. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 495–501, 2003.
- WAGNER, G. et al. The *Trypanosoma rangeli* trypomastigote surfaceome reveals novel proteins and targets for specific diagnosis. **Journal of Proteomics**, v. 82, p. 52–63, Apr. 2013.
- WALKER, D. M. et al. Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 7, p. 1245–1263, 2013.
- WALTER, A. et al. Peridomestic habitat and risk factors for *Triatoma* infestation in a rural community of the Mexican occident. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 76, n. 3, p. 508–15, Mar. 2007.
- WANG, W. et al. Strain-specific genome evolution in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. **PLOS Pathogens**, v. 17, n. 1, p. e1009254, 28 Jan. 2021.
- WATANABE COSTA, R. et al. Comparative Analysis of the Secretome and Interactome of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* Reveals Species Specific Immune Response Modulating Proteins. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 1774, 2020.
- WATANABE COSTA, R.; DA SILVEIRA, J. F.; BAHIA, D. Interactions between *Trypanosoma cruzi* secreted proteins and host cell signaling pathways. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. MAR, 2016.
- WESTON, D.; PATEL, B.; VAN VOORHIS, W. C. Virulence in *Trypanosoma cruzi* infection correlates with the expression of a distinct family of sialidase superfamily genes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 98, n. 1, p. 105–116, 1999.
- WILKINS, M. R. et al. Progress with Proteome Projects: Why all Proteins Expressed by a Genome Should be Identified and How To Do It. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 13, n. 1, p. 19–50, Dec. 1996.
- WILKINSON, S. R. et al. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 13, p. 5022–5027, 2008.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Disponível em: <[https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))>. Acesso em: 9 aug. 2021.
- WU, C. C.; MACCOSS, M. J. Shotgun proteomics: tools for the analysis of complex biological systems. **Current opinion in molecular therapeutics**, v. 4, n. 3, p. 242–50, Jun. 2002.
- YAFFE, D. Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 61, n. 2, p. 477–483, 1 Oct. 1968.
- YOSHIDA, N. et al. Signal transduction induced in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes during the invasion of mammalian cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 3, p. 269–278, 2000.
- ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051–1054, 2009.

ANEXOS

ANEXO I – Documento de submissão do manuscrito

-----MANUSCRIPT DETAILS-----

Manuscript title: Biological and molecular effects of *Trypanosoma cruzi* residence in a LAMP deficient intracellular environment

Manuscript ID: 788482

Submitted By: Luciana Oliveira Andrade

Authors: Anny Carolline Silva Oliveira, Luisa Rezende, Vladimir Gorshkov, Marcella Nunes Melo-Braga, Thiago Verano-Braga, Wesley Fernandes Braga, Jorge Luís de Melo Guadalupe, Gustavo Batista Menezes, Frank Kjeldsen, Helida Monteiro Andrade and Luciana Oliveira Andrade

Journal: *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, section Parasite and Host

Research Topic: Host/Parasite Molecular and Cellular Interactions in the Establishment and Maintenance of Protozoan Infections

Article type: Original Research

Submitted on: 02 Oct 2021

ANEXO II – Manuscrito submetido de primeira autoria

Biological and molecular effects of *Trypanosoma cruzi* residence in a LAMP deficient intracellular environment

Anny Carolline Silva Oliveira^{1,2}, Luisa Rezende¹, Vladimir Gorshkov², Marcella Nunes Melo-Braga³, Thiago Verano-Braga⁴, Wesley Fernandes Braga³; Jorge Luís de Melo Guadalupe¹; Gustavo Batista de Menezes¹; Frank Kjeldsen², Héliida Monteiro de Andrade⁵, Luciana de Oliveira Andrade^{1*}

¹Department of Morphology, Biological Sciences Institute - ICB, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

²Protein Research Group, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Southern Denmark, Odense, Denmark.

³Department of Biochemistry and Immunology, Biological Sciences Institute - ICB, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

⁴Hypertension Lab / Functional Proteomics Group, Department of Physiology and Biophysics, Biological Sciences Institute - ICB, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

⁵Laboratory of Leishmanioses, Department of Parasitology, Biological Sciences Institute - ICB, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

***Correspondence:**

Luciana de Oliveira Andrade
luoandrade@gmail.com

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease, LAMP proteins, parasite invasion, intracellular environment, Proteomic analysis, TMT (tandem mass tags)

Abstract

Trypanosoma cruzi invades non-professional phagocytic cells by subverting their membrane repair process, which is dependent on membrane injury and cell signaling, intracellular calcium increase and lysosome recruitment. Cells lacking Lysosome Associated Membrane Proteins 1 and 2 are less permissive to parasite invasion, however more prone to parasite intracellular multiplication. Several passages through a different intracellular environment can significantly change *T. cruzi*'s gene expression profile. Here, we evaluated whether one single passage through LAMP deficient (KO) or wild type (WT) fibroblasts could influence invasion ability of *T. cruzi* Y strain trypomastigotes in L6 myoblasts and WT fibroblasts. Parasites released from LAMP2 KO cells (TcY-L2^{-/-}) showed higher invasion, calcium signaling and membrane injury rates, in L6 myoblasts, when compared to those released from WT (TcY-WT) or LAMP1/2 KO cells (TcY-L1/2^{-/-}). On the other hand, TcY-L1/2^{-/-} showed higher invasion, calcium signaling and cell membrane injury rates, in WT fibroblasts, compared to TcY-WT and TcY-L1/2^{-/-}. Albeit TcY-WT presented an intermediary invasion and calcium signaling rates in WT cells, they induced lower levels of injury, reinforcing that protein signaling may also have a significant contribution to parasite induced calcium signals. These results clearly show that parasites released from WT or LAMP KO cells are distinct from each other. Additionally, these parasites' ability to invade the cell may be distinct depending on which cell type they interact with. Since these alterations most likely would reflect differences

among parasite surface molecules, we also evaluated their proteome. We identified few protein complexes, membrane and secreted proteins regulated in our dataset. Among those, some members of MASP, mucins, trans-sialidases and gp63 proteins family, which are known to play an important role during parasite infection and could correlate to TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} and TcY-L2^{-/-} biological behavior.

1. Introduction

Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*) is an important human pathogen that causes the American Trypanosomiasis or Chagas Disease – a tropical neglected disease estimated to affect about 6 to 7 million people worldwide (1). *T. cruzi*'s infective trypomastigote forms invade non-professional phagocytic cells through a process dependent on parasite interaction with host cells and activation of calcium signaling pathways that lead to parasite internalization (2–4). For this invasion process, *T. cruzi* subverts plasma membrane repair mechanism through promoting small wounds at the host cell plasma membrane and by engaging host cell surface receptors. Both events trigger signaling pathways, which lead to intracellular calcium increase in the host cell (5) and promote lysosomal recruitment and fusion at the parasite contact site (6), triggering a compensatory endocytosis process that leads to parasite internalization into the host cell (4,7,8). Other lysosomes fuse to this newly formed parasitophorous vacuole (8) guaranteeing parasite's retention in the host cell cytoplasm (9).

In the last decade, our group has shown that cells deficient in two lysosomal membrane glycoproteins, both rich in sialic acid and known as LAMP (Lysosome-Associated Membrane Protein), LAMP-1 and LAMP-2 (10), are less permissive to *T. cruzi* invasion, but more prone to parasite intracellular development (11). We have also shown that LAMP-2 absence alone is sufficient for the decreased parasite invasion rate observed in LAMP-1/2 deficient cells (LAMP1/2^{-/-}) (12). The latter is due to the compromised ability of LAMP-2 deficient cells in performing plasma membrane repair. Even though lysosomal exocytosis is normal in these cells, the compensatory endocytosis triggered by these exocytic events is compromised and therefore also parasite internalization (12).

LAMP-2 proteins participate in the cholesterol trafficking and, therefore, LAMP-2 deficient cells present lower levels of cholesterol content in the plasma membrane (12,13). This altered cholesterol trafficking leads to less caveolin at the cell surface, interfering with the compensatory endocytosis process, imperative for the membrane repair process and parasite internalization (12). Also as a consequence of this altered trafficking, there is increased cholesterol content in LAMP-2 deficient (LAMP2^{-/-} and LAMP1/2^{-/-}) cells cytoplasm (14), creating a different intracellular environment.

Changes in the intracellular environment have been previously shown to interfere with parasite expression profile. Dos Santos and colleagues (2012) showed that trypomastigotes derived from distinct cell types presented a differential expression profile of the MASP surface protein family (15). For this study, they used *T. cruzi* CL Brener trypomastigote forms obtained after 17 weekly maintenance passages in L6 myoblasts or LLC-MK2 epithelial cells. This differential profile of MASP expression also reflected in differences in parasite invasion ability (15). As mentioned before, cells lacking LAMP-2 present higher cholesterol content in their cytoplasm. In addition, in these cells *T. cruzi* intracellular multiplication rates are higher when compared to the rates observed for control cells. Thus, in the present work, we evaluated whether one passage through wild type (WT) and LAMP deficient fibroblasts could also induce differences in parasite biological and biochemical parameters, such as protein expression profile, consequently influencing parasite invasion. For this, *T. cruzi* Y strain

trypomastigotes obtained from LLC-MK2 epithelial cells were used to infect WT, LAMP1/2^{-/-} and LAMP2^{-/-} cells, from which cultures recovered trypomastigotes were evaluated concerning their ability to adhere, invade, trigger intracellular calcium signaling and induce membrane injury in L6 myoblasts and wild type fibroblasts. In addition, through a proteomic approach, we also evaluated the newly released trypomastigotes' membrane and regulated subproteomes and their correlations to the parasites' biological characteristics and behavior.

2. Material and methods

2.1. *Trypanosoma cruzi* and cell cultures

Mouse fibroblasts cell lines, derived from WT, LAMP-1/2^{-/-} or LAMP-2^{-/-} knock out C57BL/6J mice, were obtained from a collection of cell lines from Dr. Paul Saftig's laboratory (Biochemisches Institut / Christian-Albrechts-Universität Kiel, Germany), which were previously generated by spontaneous immortalization of primary fibroblasts in culture around passages 10–20 (16–18). The cells were maintained in high-glucose DMEM (Thermo Fischer Scientific) supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS), 1 % penicillin/streptomycin (100 U/mL and 100 µg/mL, respectively) and 1 % glutamine (DMEM 10 %).

Tissue culture trypomastigotes from the *T. cruzi* Y strain were obtained and purified from the supernatant of infected LLC-MK2 monolayers, as described previously (18), and used to infect wild type or LAMP deficient fibroblasts.

2.2. *Trypanosoma cruzi* invasion assays

For invasion assays, 5x10⁴ cells (WT fibroblasts or L6 murine myoblasts) in high glucose DMEM 10 % were plated per well on a 24-well plate, containing 13 mm round glass coverslips. Cells were plated 24 h before the experiment and incubated at 37 °C and 5 % CO₂. Cells were then exposed to *T. cruzi* Y strain trypomastigotes obtained from wild type (TcY-WT), LAMP-2 deficient (TcY-L2^{-/-}) or LAMP-1 and LAMP-2 deficient (TcY-L1/2^{-/-}) fibroblasts for 40 min at 37 °C at a multiplicity of infection (MOI) of 50. After parasite exposure, the monolayers were washed 4 times with phosphate buffered saline containing Ca²⁺ and Mg²⁺ (PBS^{+/+}), in order to remove the non-internalized parasites, and fixed in paraformaldehyde 4 % overnight. After fixation, cells were processed for immunofluorescence.

2.3. Immunofluorescence and quantification of parasite invasion

After fixation, coverslips with attached cells were washed three times in PBS, incubated for 20 min with PBS containing 2 % BSA and processed for an inside/outside immunofluorescence invasion assay as described previously (18). Briefly, extracellular parasites were immunostained with rabbit anti-*T. cruzi* polyclonal antibodies in a 1:500 dilution in PBS/BSA for 1 h at room temperature (RT), washed and labeled with Alexa Fluor-546 conjugated anti-rabbit IgG antibody (Thermo Fischer Scientific) in a proportion of 1:500 in PBS/BSA for 45 min. After that, the DNA of host cells and parasites was stained for 1 min with DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride – Sigma), 0.1 µM in PBS, mounted, and examined on a ZEISS Axio Vert.A1 microscope.

2.4. *Trypanosoma cruzi* adhesion assays

The assays followed the protocol previously described by Schenkman, Diaz, and Nussenzweig (1991) (19). Briefly, WT fibroblasts or L6 myoblasts were plated in each well of a 24-well plate, containing 13 mm round glass coverslips, 24 h before the experiment and incubated at 37 °C and 5 % CO₂. Cells were then washed with HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution – Sigma), pre-fixed with 2 % glutaraldehyde in PBS^{+/+} for 5 min at 4 °C and incubated for 24 h in 0.16 M pH 8.3 ethanolamine solution. Before parasite exposure, cells were washed two times with DMEM containing 0.2 % BSA. Cells were exposed to TcY-WT, TcY-L2^{-/-} and TcY-L1/2^{-/-} trypomastigotes at 37 °C and 5 % CO₂ for 40 min at an MOI of 50. After exposure, cells were washed with PBS, fixed with PFA 4 % and stained using rapid panoptic staining. Attached parasites were counted using a microscope.

2.5. Host cell membrane injury assays

WT fibroblasts or L6 myoblasts were cultured in a 24-well plate (5x10⁴ cells/well) at 37 °C in 5 % CO₂ in DMEM 10 %. After 24 h, cell monolayers were exposed to DMEM 10 % containing PI (10 µg/mL) in the presence or absence of TcY-WT, TcY-L2^{-/-} or TcY-L1/2^{-/-} trypomastigotes for 30 min at 37 °C at a MOI of 100. Cells were then washed twice with PBS^{+/+}, trypsinized and analyzed by flow cytometry (FACS Scan; Becton Dickinson). The data were analyzed using FlowJo v10.1 software (Tree Star, Inc.).

2.6. Calcium signaling assays

For the calcium signaling assays, 1x10⁵ cells (WT fibroblasts or L6 myoblasts) in high glucose DMEM 10 % were plated in each well of 4-well confocal glass-bottom dishes and 24 h later incubated with a fluorescent calcium probe (5 µM Fluo-4/AM (Thermo Fisher), 0.01 % pluronic acid and 2.0 mM Probenecid (Sigma)) for 50 min at 37 °C. Afterwards, cells were exposed to the following conditions: 1. culture medium; 2. Ionomycin (5 µM); 3. TcY-WT, TcY-L2^{-/-} or TcY-L1/2^{-/-} trypomastigotes at a MOI of 100. Cells were analyzed in a Nikon C2 Plus confocal microscope using the time lapsing resource and photographed for 600 sec without intervals. The changes observed for the intracellular calcium concentration were expressed as the probe intensity fluorescence fold change accordingly with the equation (F/F₀), F being the maximum fluorescence intensity observed and F₀ the basal fluorescence observed for the point 0 (20,21).

2.7. Gelatin zymography assays

To evaluate proteolytic activity in TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} and TcY-L2^{-/-} trypomastigotes, cellular extracts were prepared using 5x10⁸ trypomastigotes (70 % pure regarding amastigote forms contamination) in lysis buffer (5 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 % glycerol, 1 mM EDTA (Sigma), 1 mM DTT (Promega), 10 mM cOmplete Mini EDTA-free protease inhibitors (Roche)) and protein concentration quantified by Bradford's method (22). Gelatin zymography assays were performed as previously described (23) with few adaptations. Briefly, 12.5 µg of total protein were mixed with loading buffer without reducing agents and electrophoresed through a 12 % polyacrylamide gel copolymerized with gelatin (Sigma) at final concentration of 1 mg/mL. Gels were soaked in renaturing buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 2.5 % Triton X-100 (Sigma)) for 30 min at (RT), followed by one wash for 30 min at (RT) in development buffer (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 7.5) and incubated for 24 h in development buffer at 37 °C. Gels were stained with R-250 Coomassie brilliant blue (Sigma). Gelatinolytic activities were detected as pale bands against the dark blue background. Band intensities were quantified using ImageJ software and expressed as the

pixels fold change regarding TcY-WT pixels read mean. The molecular weight standard was purchased from BioRad Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range.

2.8. Enzymatic kinetics assays

To evaluate the cysteine and serine enzymatic activities in TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} and TcY-L2^{-/-} trypomastigotes, cellular extracts were prepared as described above and 5 µg of total protein extract mixed with 50 µM Ac-YVAD-AFC (N-Acetyl-Tyr-Val-Ala-Asp-7-amido-4-trifluoromethylcoumarin – #A9965 – Sigma-Aldrich) caspase-like or 13 µM Suc-LLVY-AMC (N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr 7-Amido-4-Methylcoumarin – #S6510 – Sigma-Aldrich) chymotrypsin-like fluorogenic substrates. The reactions were performed in buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM MgCl₂ and 1 mM DTT, in the presence or absence of 20 µM MG-132 (#M7449 – Sigma-Aldrich) inhibitor, and incubated at 37 °C from 0 min to 120 min with readings every 20 min. The readings were performed in the Synergy 2 Multi-Detection Microplate (BioTek Instruments, Inc.) with excitation wavelength 380/20 and emission wavelengths 508/20 or 440/40 for Ac-YVAD-AFC or Suc-LLVY-AMC substrates, respectively.

2.9. Membrane proteins fraction and sample preparation for MS/MS analysis

For obtaining the membrane proteins fraction, about 1x10⁸ trypomastigotes forms released from wild type or LAMP deficient fibroblasts, presenting about 70-80 % purity regarding amastigote forms contamination, were centrifuged during 10 min at 2 200 g at 4 °C and washed 2 times with PBS (pH 7.2). Samples were resuspended in 0.1 M sodium carbonate lysis buffer (pH 11.5) supplemented with protease inhibitor cocktail (Protease Inhibitor Mix, GE Healthcare, USA), submitted to two ultrasonic pulses during 20 sec on ice and incubated for 1 h on ice before ultracentrifugation at 150 000 g for 90 min at 4 °C (Sorvall Ultra Pro 80 Ultracentrifuge). Pellets were washed one time with 500 mM triethylammonium bicarbonate (TEAB) and one time with 50 mM TEAB.

Samples were suspended in 6 M urea, 2 M thiourea, 50 mM TEAB buffer and reduced with 10 mM dithiothreitol (DTT) at (RT) for 1 h. After reduction, free thiols were alkylated with 20 mM iodoacetamide (IAA) in the dark for 1 h (RT). Samples were digested for 3 h (RT) in 1:100 ratio with Lys-C. Afterwards, samples were diluted 8-fold with 50 mM TEAB (pH 8.0) and proteins digested with 1:100 ratio trypsin (Promega, Madison, WI) for overnight at 37°C. The reaction was quenched by adding formic acid (FA; 1 % final concentration, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) followed by centrifugation at 14 000 g for 10 min.

2.10. Peptide TMT labelling

The dried and digested peptides were resuspended in 100 mM HEPES (pH 8.5) with about 10 µg of peptide, as determined using a Qubit Protein Assay Kit (ThermoFisher), from each sample used for TMT labelling. Six tags (tags 126, 127N, 128N, 129N, 130N and 131N) from a TMT eleven-plex kit (ThermoFisher) were used to label the samples from each biological replicate. Aliquots (0.8 mg) of each reagent in 41 µL of anhydrous acetonitrile were incubated with peptide samples for 2 h at (RT). The reaction was quenched by the addition of 8 µL of 5 % hydroxylamine followed by incubation for 15 min at (RT). For each biological replicate, equal amounts of the six TMT-labelled samples were mixed and the TMT-labelled peptides were purified on an Oasis HLB 10 mg cartridge (Waters Corporation), that had been wetted with 100 % acetonitrile and equilibrated twice with 0.1 % aqueous trifluoroacetic acid (TFA). Adsorbed peptides were washed with 2 mL 0.1 % TFA twice, eluted in 300 µL of 30 %

acetonitrile and 300 μ L of 60 % acetonitrile, and, dried using a SpeedVac evaporator. Afterwards, the dried TMT-labelled peptides were resuspended in 2 % acetonitrile in 10 mM ammonium formate (pH 9.3) for high-pH reverse phase chromatography.

2.11. High-pH reverse phase chromatography

TMT labelled peptides were injected onto an C18 Acquity UPLC MClass CSH 1.7 μ m, 300 μ m X 100 mm (Waters), using a Dionex Ultimate 3000 HPLC system. Buffer A was composed of 2 % acetonitrile in 10 mM ammonium formate (pH 9.3) and buffer B of 80 % acetonitrile in 10 mM ammonium formate (pH 9.3). Columns were run at 5 μ L/min at 30° C, starting at 2 % buffer B, and rising to 40 % B over the course of a 27 min linear gradient. Buffer B was increased to 50 % for 4 min; to 70 % for 4 min; to 95 % for 10 min, followed by a drop back to 2 % B for 1 min which was maintained until the end of the run at 71 min. Fractions were collected from the 4th to the 44th min with 180 seconds per fraction, producing 30 fractions. Fractions were concatenated into 10 samples, for example, the 1st, 11th and 21st fractions were pooled in the same well of a 96-well plate. The 11 samples (10 samples plus the flow through – peptides eluted in the beginning of the starting conditions of high pH separation) were dried using a SpeedVac evaporator and solubilized in 0.1 % FA.

2.12. LC–MS/MS and Data Analysis

Samples were analyzed by an EASY-nano LC system (Proxeon Biosystems, Odense, Denmark) coupled online to an Q Exactive HF - Orbitrap mass spectrometer (QEHF) (Thermo Scientific, Waltham, USA). Peptides from each fraction (2 μ g each) were loaded onto a 18 cm fused silica column with integrated emitter (75 μ m inner diameter) packed in-house with reverse phase resin ReproSil-Pur C18-AQ 3 μ m (Dr. Maisch GmbH, Germany) and eluted using a gradient from 97 % phase A (0.1 % FA) to 28 % phase B (0.1 % FA, 95 % acetonitrile) for 64 min, for all eleven fractions, 28 to 45 % phase B for 10 min, 45 to 100 % phase B for 3 min and 100 % phase B for 8 min in a total of 86 min at 250 nL/min. After each run, the column was washed with phase B and re-equilibrated with phase A. Mass spectra were acquired in positive ion mode applying data-dependent acquisition. Each MS scan in the Orbitrap (mass range of m/z of 350–1500 and resolution 120,000 at m/z 200) was followed by MS/MS of the twenty most intense ions (Top20). Fragmentation was performed by Higher Energy Collisional Dissociation (HCD) and selected ions were dynamically excluded for 20 sec. Raw data were viewed in Xcalibur v.4.2 (Thermo Scientific, Waltham, USA). Data processing was performed using Proteome Discoverer v.2.4 (Thermo Scientific, Waltham, USA), by searching raw files with SequestHT algorithm against a *T. cruzi* Y strain database (release 47, downloaded in May 2020), containing the proteins of the parasite found in the newly sequenced *T. cruzi* Y strain (24). Common contaminant proteins were also added to the database and all contaminant proteins identified were filtered and removed from the result lists. The searches were performed with the following parameters: MS accuracy 10 ppm, MS/MS accuracy 0.02 Da, trypsin digestion with up to 2 missed cleavage allowed, carbamidomethyl modification of cysteine and peptide N-terminus TMT-6plex modification as fixed modifications and oxidized methionine and lysine modification by TMT-6plex as variable modifications. Number of proteins, protein groups and number of peptides were filtered for false discovery rate (FDR) less than 1 %, peptides with rank 1 and proteins with at least 2 peptides using Proteome Discoverer. ProteinCenter software (Thermo Scientific, Waltham, USA) was used to generate FASTA formatted files of groups of proteins of interest. Proteins were considered as regulated when their log₂ fold change was higher than the mean plus 2 times the standard deviation or lower than the mean minus 2 times the standard deviation and, their coefficient of variation lower than 40%. Transmembrane domain

predictions were performed using TMHMM v.2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>) (25,26) and glycosylphosphatidylinositol (GPI) prediction was performed using the web tools GPI-SOM (<http://gpi.unibe.ch/>) (27) and big-PI Predictor (https://mendel.imp.ac.at/gpi/gpi_server.html) (28–31). DeepLoc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/DeepLoc/index.php>) (32) was used to predict the proteins subcellular localization. SignalP v.5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>) (33) was used to predict proteins secreted by classical ER/Golgi pathway and SecretomeP v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>) (34) was used to predict non-classical protein secretion. Overrepresented categories were investigated through Gene Ontology (GO) enrichment analysis using TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>) and redundant GO terms generated were summarized in clusters by REVIGO tool (<http://revigo.irb.hr/>) (35).

2.13. Statistical methods

Quantitative data were expressed as mean \pm standard deviation (SD) of three independent experiments unless otherwise indicated. Statistical analysis was carried out using Graph Pad Prism 7.0 software via one-way ANOVA followed by Fisher's least significant difference (LSD) test or by controlling the false discovery rate (FDR) using the original procedure of Benjamini and Hochberg for multiple comparisons. Means were considered significantly different when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. The residence in a LAMP deficient intracellular environment modifies *T. cruzi* invasion profile

T. cruzi multiplication is increased in a LAMP deficient environment (LAMP1/2^{-/-} or LAMP2^{-/-} fibroblasts) (11), which suggests that differences in the intracellular environment can modify parasite biological behavior inside the host cell. In order to evaluate whether this LAMP deficient environment may also influence the biological behavior of parasites released from these cells, *T. cruzi* Y strain trypomastigotes collected from a single infection cycle in WT (TcY-WT), LAMP1/2^{-/-} (TcY-L1/2^{-/-}) or LAMP2^{-/-} (TcY-L2^{-/-}) fibroblasts were evaluated concerning their ability to invade L6 myoblasts and WT fibroblasts. For this, these cells were exposed to TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} and TcY-L2^{-/-} infective trypomastigote forms at an MOI of 50 for 40 min.

For L6 myoblasts, TcY-L2^{-/-} parasites presented the highest invasion rates, as evidenced by the number of intracellular parasites per 100 cells, when compared to TcY-WT and TcY-L1/2^{-/-} parasites, which did not show statistically significant differences between them (Figure 1A). On the other hand, for WT fibroblasts, TcY-L2^{-/-} parasites presented the lowest invasion rates, when compared to the other parasites, TcY-L1/2^{-/-} and TcY-WT (Figure 1B). Additionally, for these fibroblasts, TcY-WT invasion rate was higher than that observed for TcY-L2^{-/-} parasites, which were the less infective ones. As expected, for both host cells, the number of parasites per infected cell was about one, for all tested groups.

3.2. *T. cruzi* adhesion profile is also affected by residence in a LAMP deficient intracellular environment, but does not correlate with parasite invasion rate

T. cruzi adhesion to the host cell has been considered as the initial step for the invasion process (36–38), since this proximity could aid the interaction between the parasite and host

cell surface proteins, which are responsible for triggering the necessary signaling pathways that lead to parasite internalization (4). To investigate whether the differences found in the parasite invasion rates were related to their ability in adhering to these cells, we exposed prefixed L6 myoblasts or WT fibroblasts to TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} and TcY-L2^{-/-} trypomastigotes at an MOI of 50, for 40 min, and analyzed parasites that remained attached to the cell surface after several washes.

The adhesion assay in L6 myoblasts, revealed that TcY-L1/2^{-/-} trypomastigotes presented the highest adhesion rates when compared to TcY-WT and TcY-L2^{-/-} parasites (Figure 1C). TcY-WT parasites showed an intermediate adhesion rate compared to TcY-L2^{-/-} parasites, which in turn showed the lowest adhesion rates (Figure 1C). For WT fibroblasts, TcY-L1/2^{-/-} trypomastigotes presented the lowest adhesion rates when compared to TcY-WT and TcY-L2^{-/-} parasites (Figure 1D). There was no statistically significant difference between TcY-L2^{-/-} and TcY-WT parasites. Despite the differences found in the adhesion rates among the studied parasites in the two studied cell types, these results revealed that adhesion and invasion rates did not necessarily correlate with each other.

3.3. *T. cruzi* biological characteristics correlates to its invasion profile reinforcing the modulatory role of residing in a LAMP deficient intracellular environment

As mentioned before, *T. cruzi* invasion into host cells is dependent on parasite's ability to trigger host cell intracellular calcium signaling and subverting the host cell plasma membrane repair mechanism. *T. cruzi* is able to initiate this calcium signaling by both causing micro lesions in the host cell plasma membrane or inducing calcium signaling events through engagement of host cell surface receptors (4). The increase in intracellular calcium concentration leads to lysosomal exocytosis and compensatory endocytosis events, culminating in parasite internalization (39). Since calcium ions play a crucial role in *T. cruzi* invasion, we decided to investigate whether the changes observed for the invasion rates could correlate to parasite ability in triggering calcium signals. For that, L6 myoblasts or WT fibroblasts were loaded with the fluorescent calcium-binding probe Fluo4-AM and exposed to TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} and TcY-L2^{-/-} infective trypomastigote forms at an MOI of 100, while recording the fluorescence increase in real time by confocal microscopy. For L6 myoblasts, calcium signaling induced by TcY-L2^{-/-} was significantly higher than the signaling induced by TcY-WT or TcY-L1/2^{-/-} parasites, while those two did not present statistically significant differences between them (Figure 2A). On the other hand, for WT fibroblasts, calcium signaling induced by TcY-L2^{-/-} was significantly lower than the signaling induced by the other two parasites, TcY-WT and TcY-L1/2^{-/-}, while the highest calcium signals were induced by TcY-L1/2^{-/-} parasites (Figure 2B). For both host cell types, the calcium signals induced by the different parasites directly correlated with their invasion rates, meaning the higher the calcium signaling triggered by the parasite the higher the cell invasion efficiency. These results reinforce the important role played by calcium signaling events during the *T. cruzi* invasion process.

To investigate further the differences in the calcium signaling triggered by the distinct parasites in the different cell types, we evaluated whether the calcium-signaling events were generated by micro-injuries at the host cell plasma membrane or triggered by activation of host cell surface receptors. To investigate the calcium signaling induced by plasma membrane injuries, we exposed L6 myoblasts or WT fibroblasts to TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} and TcY-L2^{-/-} trypomastigotes at an MOI of 100 in the presence of propidium iodide (PI) for 30 min. PI is a red-fluorescent nuclear and chromosome counterstain, not permeant to live cells. Therefore, PI staining indicates membrane permeabilization by injury. For L6 myoblasts, TcY-L2^{-/-}

parasites induced injury to a higher number of cells when compared to TcY-WT and TcY-L1/2^{-/-} parasites, corroborating their invasion profile and suggesting that for these parasites, calcium signals are triggered through injuries at the host cell membrane (Figure 2C). No statistically significant differences were observed between the number of PI positive cells for TcY-WT and TcY-L1/2^{-/-} parasites, indicating that these parasites likely induce similar levels of injury to L6 myoblasts (Figure 2C). Again, these results corroborate with the invasion profile observed for these parasites. For WT fibroblasts, TcY-L1/2^{-/-} parasites induced injury to a higher number of cells when compared to TcY-WT and TcY-L2^{-/-} parasites, corroborating their invasion profile in these cells (Figure 2D). TcY-WT parasites induced injury to the lowest number of cells, when compared to the others, even though calcium signaling triggered by these parasites in WT fibroblasts was higher than that observed for TcY-L2^{-/-} parasites (Figure 2B and D).

3.4. *T. cruzi* proteome is influenced by the residence in a LAMP deficient intracellular environment

Once parasites released from the distinct cell types presented different biological behaviors, we decided to investigate whether changes in these parasites' surface membrane protein profiles could account for the biological phenotypes obtained. For this, we performed quantitative mass spectrometry-based proteomic analysis to identify and quantify the membrane-enriched protein preparation from TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} and TcY-L2^{-/-} trypomastigotes. *T. cruzi* Y strain trypomastigotes were cultured in the wild type or LAMP deficient fibroblasts, collected, lysed and then ultra-centrifuged to separate the membrane-enriched protein fraction. Extracted proteins were digested, reduced, alkylated and the tryptic peptides were labeled with TMT 6-plex (ThermoFisher), analyzed by mass spectrometry-based proteomics and submitted to bioinformatics tools to perform functional analyses. For protein identification from the peptide sequences, we used the Y strain annotated proteins from TriTrypDB website (released on April 23, 2020 and downloaded on May 2020) (24).

We identified 3806 proteins with high confidence level and containing at least one unique peptide in all three samples (Supplementary Table 1). A principal component analysis was performed to evaluate the biological replicates similarity, using the normalized quantitative abundance values (Supplementary Figure 1). This analysis showed an acceptable level of similarity between replicates within the same group. A total of 1365 proteins were annotated as uncharacterized or hypothetical proteins, corresponding to about 36% of the identified proteins in our data set. The high percentage of uncharacterized proteins is not surprising, since for the *T. cruzi* Y strain genome, 56.94 % of the proteins correspond to hypothetical proteins of unknown function (24). Because of this, we performed a gene ontology (GO) analysis with Fisher exact test filtering for FDR < 0.05, using the GO enrichment analysis tool on the TriTrypDB in order to verify if our samples were in fact enriched in membrane terms. Regarding the GO Cellular Component level, the analysis showed that our data set presented an enrichment in many terms related to membrane, such as intrinsic component of membrane, integral component of membrane, endomembrane system, among others (Figure 3). Even though the most enriched term is cytoplasm, the QuickGO definition of this term comprises the contents of a cell excluding the plasma membrane and nucleus, but including other subcellular structures (<https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/GTerm?id=GO:0005737>). Therefore, many organelle membrane proteins present in our data set fell into this GO cytoplasm term.

We then compared the proteomes of TcY-L1/2^{-/-} and TcY-L2^{-/-} trypomastigotes' membrane-enriched proteins preparation to that from TcY-WT trypomastigotes. We considered as regulated proteins, all members that presented a log₂ fold change higher than the mean plus 2

times the standard deviation or lower than the mean minus 2 times the standard deviation and, coefficient of variation lower than 40 % – referred from here as the regulated subproteome. We found 75 and 90 proteins in the TcY-L1/2^{-/-} and TcY-L2^{-/-} regulated subproteomes, respectively (Supplementary Table 2) that matched these criteria. From these proteins, either a considerable percentage, in both regulated subproteomes, had predicted transmembrane domains or to be classically or non-classically secreted (Table 1). Additionally, important *T. cruzi* virulence factors, such as members of trans-sialidase superfamily, as well as other surface proteins families, such as MASP and surface protease gp63 (40–42), were found to be differentially regulated in these parasites (Table 2).

In the TcY-L1/2^{-/-} regulated subproteome, 51 proteins were up regulated and 24 were down regulated, and in the TcY-L2^{-/-} regulated subproteome, 55 proteins were up regulated and 35 were down regulated, when compared to TcY-WT proteome. There were only four up-regulated proteins, three of them being hypothetical proteins, and nine down-regulated proteins shared between TcY-L1/2^{-/-} and TcY-L2^{-/-} regulated subproteomes (Figure 4).

For further understanding the possible role of these differentially regulated proteins in the biological behavior observed for TcY-L1/2^{-/-} and TcY-L2^{-/-}, we classified and grouped them in distinct biological processes, based on their gene ontology, using the enrichment test available on TriTrypDB with Fisher exact test filtering for FDR < 0.05. Regarding the TcY-L1/2^{-/-} regulated subproteome, there was no enriched biological processes (BP) from the up regulated proteins and we found 15 BP enriched from the down regulated. We removed the redundant terms from them using the REVIGO tool (<http://revigo.irb.hr/>) and, after summarizing the terms, we found 8 BP down regulated (protein folding, cellular ketone metabolic process, quinone biosynthetic process, pentose-phosphate shunt, glyceraldehyde-3-phosphate metabolic process, microtubule-based movement, cellular process, movement of cell or subcellular component) in comparison to TcY-WT proteome (Figure 5A and Supplementary Table 3). Six proteins were relevant for two or more down regulated BP in the TcY-L1/2^{-/-} regulated subproteome: 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating, putative (TcYC6_0069460), ubiquinone biosynthesis protein COQ7-like, putative (TcYC6_0110760), kinesin-13 3, putative (TcYC6_0081520), kinesin, putative (TcYC6_0110780), T-complex protein 1, delta subunit, putative (TcYC6_0023210) and chaperonin/T-complex protein 1 gamma subunit, putative (TcYC6_0030620). We next performed a GO biological process enrichment analysis using the membrane-associated proteins that presented transmembrane domains and/or were assigned as membrane by the DeepLoc analysis (referred from here as membrane subproteome). From this analysis we did not find any enriched BP either from the up regulated or the down regulated proteins list. However, for the up regulated membrane subproteome, we found the sphingolipid metabolism (ec00600__PK__KEGG) pathway enriched, using the Metabolic Pathway Enrichment analysis tool on TriTrypDB with KEGG as pathway source and filtering FDR < 0.05.

For TcY-L2^{-/-} regulated subproteome, there was no enriched BP from the down regulated proteins and we found 25 BP enriched from the up regulated. After summarizing the terms with the REVIGO tool, we found 5 BP up regulated (proteolysis involved in cellular protein catabolic process, catabolic process, proteolysis, cellular protein-containing complex assembly, mitochondrion organization) in comparison to TcY-WT proteome (Figure 5B and Supplementary Table 3). Six proteins were present in two or more up regulated BP: proteasome alpha 1 subunit, putative (TcYC6_0071370), proteasome alpha 2 subunit, putative (TcYC6_0023180), proteasome beta 3 subunit, putative (TcYC6_0044600), proteasome beta

6 subunit, putative (TcYC6_0041700), proteasome beta 7 subunit, putative (TcYC6_0091650) and putative mitochondrial chaperone BCS1 (TcYC6_0123290). Using the Metabolic Pathway Enrichment analysis tool on TriTrypDB with KEGG as pathway source and filtering FDR <0.05, we found 2 up regulated pathways (Arginine and proline metabolism (ec00330__PK__KEGG), and Diterpenoid biosynthesis (ec00904__PK__KEGG)) and 1 down regulated pathway (Ether lipid metabolism (ec00565__PK__KEGG)). The GO biological process enrichment analysis of TcY-L2^{-/-} membrane subproteome, revealed one up regulated BP, the vacuolar proton-transporting V-type ATPase complex assembly. We did not find any enriched pathways for this membrane subproteome.

In order to establish a better understanding of the LAMP deficient cells derived parasites, we compared the TcY-L1/2^{-/-} and TcY-L2^{-/-} proteomes. These parasites were the most different regarding their invasion characteristics. In fact, the proteomic analysis revealed a higher number of differentially regulated proteins between them, 136 proteins – 55 down regulated and 81 up regulated (using the same previously described criteria) (Supplementary Table 2). From these proteins, a considerable part is predicted to have transmembrane domains or to be classically or non-classically secreted (Table 3). Interestingly, we also found a higher number of membrane surface proteins regulated between TcY-L1/2^{-/-} and TcY-L2^{-/-} trypomastigotes (Table 4).

The GO BP enrichment analysis from these differentially regulated proteins between TcY-L1/2^{-/-} and TcY-L2^{-/-} trypomastigotes, showed 13 BP from the down regulated proteins list and no BP from the up regulated protein list. After summarizing the terms using the REVIGO tool, 3 down regulated BP remained (proteolysis involved in cellular protein catabolic process, catabolic process and, proteolysis) (Figure 5C and Supplementary Table 3). Five proteasome proteins were present in all 3 BP: proteasome alpha 1 subunit, putative (TcYC6_0071370), proteasome alpha 2 subunit, putative (TcYC6_0023180), proteasome alpha 7 subunit, putative (TcYC6_0044220), proteasome beta 3 subunit, putative (TcYC6_0044600) and proteasome beta 7 subunit, putative (TcYC6_0091650). The metallo-peptidase, Clan MF, Family M17, putative (TcYC6_0033380), cytoskeleton-associated protein CAP5.5, putative (TcYC6_0107360) and, surface protease GP63, putative (TcYC6_0169090) proteins also contributed to the proteolysis enrichment.

3.5. Residence in a LAMP-2 deficient intracellular environment increases *T. cruzi* proteolytic activity

Since many proteolysis-related terms were enriched in the TcY-L2^{-/-} regulated subproteome compared to TcY-WT and TcY-L1/2^{-/-} proteomes, we decided to further investigate the parasites proteolytic activity. For that, we evaluated the parasites proteolytic activity through gelatin zymography assays. The results showed a higher gelatinolytic activity for TcY-L2^{-/-} trypomastigotes compared to TcY-WT and TcY-L1/2^{-/-} (Figure 6), thus corroborating the proteomic analysis.

In order to investigate deeper the higher proteolytic profile observed for TcY-L2^{-/-} trypomastigotes, we decided to test the protein extracts for serine proteases and cysteine proteases activity. Enzyme activity assays were performed using Ac-YVAD-AFC caspase-like and Suc-LLVY-AMC chymotrypsin-like fluorogenic substrates, for cysteine and serine proteases, respectively. For caspase-like activity, TcY-L1/2^{-/-} and TcY-L2^{-/-} protein extracts showed slightly higher activities than TcY-WT protein extract (Figure 7A and C). For all protein extracts, the inhibitor MG-132 decreased caspase-like activity in 2.23 ± 0.055 , $1.98 \pm$

0.25 and 1.94 ± 0.34 times for TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} and TcY-L2^{-/-}, respectively (Figure 7A and C). For chymotrypsin-like activity, TcY-L2^{-/-} protein extract showed the highest activity, while TcY-L1/2^{-/-} presented the lowest (Figure 7B and D). Here again, for all protein extracts, the inhibitor MG-132 considerably decreased their activities in 12.12 ± 1.53 , 8.91 ± 0.48 and 15.73 ± 0.53 times for TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} and TcY-L2^{-/-} respectively. For Suc-LLVY-AMC substrate, the kinetic activity also showed a similar profile to the one revealed by the zymography assays.

4. Discussion

In previous studies carried out by our group, we showed that the alteration of a single protein in the host cell – LAMP (a lysosomal protein) – changed the biological behavior of two distinct *T. cruzi* strains, Y and CL, belonging to TcI and TcVI lineages, respectively (11). It was shown that parasites from both strains increased their intracellular growth in LAMP-deficient cells (LAMP1/2^{-/-}), releasing a significantly higher number of trypomastigote forms at the end of a single intracellular cycle, when compared to infections on wild type (WT) cells (11). Lysosomes are relevant host-cell organelles that affect *T. cruzi* invasion success, since they are recruited to the parasite entry site, not only donating membrane for the formation of the parasitophorous vacuole (6), but also are crucial for parasite's permanence in the cell (9). Therefore, the present study aimed to understand whether the parasites released from these LAMP-deficient cells exhibited different biological behavior from those released from WT cells. For this, we evaluated four characteristics related to the parasite's entry process into the host cell: the invasion and adhesion rates, the calcium signal profile induced by these parasites, as well as their ability to induce host cell membrane micro-injuries. These parameters were evaluated in two different cell lines: L6 myoblasts and WT fibroblasts.

Our results first revealed that only one passage through a LAMP deficient environment was able to modify the parasite's invasion rate. To the best of our knowledge, this is the first time that is shown that one single passage through different intracellular environments may induce such significant changes in the parasite behavior. As mentioned before, in the work from Dos Santos et al. (2012), changes in the MASP expression profile or invasion rates were studied upon several passages through different cell types (15). Additionally, we showed that the absence of only LAMP-2 or both LAMPs affect the parasite differently. Although LAMP2^{-/-} and LAMP1/2^{-/-} cells have similar lysosomal distribution and enzyme activity, it has been shown that the latter present an increased number of autophagic vacuoles, both before or after starvation, in relation to LAMP2^{-/-} or WT cells (43). Autophagosomes have been shown to participate in *T. cruzi* infection in host cells (44). In this study, Romano and colleagues (2009) showed that the induction of autophagy favors parasite invasion, also that an increasing number of internalized parasites co-localize with LC3, an autophagosome marker, with time of infection (44). Whether the percentage of parasites co-localizing with autophagosome markers or even the time length of association of these markers varies among WT, LAMP2^{-/-} and LAMP1/2^{-/-} cells, is not known, but if so, they may account for at least part of the distinct behavior observed for the parasites release from LAMP2^{-/-} and LAMP1/2^{-/-} cells. We also showed that the cell type the parasite is interacting with affected the invasion rate. For example, we observed that the TcY-L1/2^{-/-} trypomastigotes were the most infective in WT fibroblasts but the least infective in L6 myoblasts. On the other hand, TcY-L2^{-/-} trypomastigotes were the least infective in WT fibroblasts, but the most infective in L6 myoblasts. In fact, differences in *T. cruzi*'s ability to invade different cell types has been shown previously (45,46). This has to do with the fact that although parasite invasion is always dependent on calcium signaling, lysosome recruitment and fusion, the pathways

involved in eliciting these signals, may vary a lot among different parasite strains, as well as the host cell type (5,47,48).

The recruitment and fusion of perinuclear lysosomes, crucial steps for the invasion process, occur at the parasite adhesion site (6,39) and the existence of a correlation between cell adhesion and invasion rates by *T. cruzi* has been reported (36–38). Therefore, we also investigated whether the adhesion profiles of TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} or TcY-L2^{-/-} trypomastigotes differed from each other. Indeed, the adhesion profiles not only varied among the different parasites, but also between the two cell types for the same parasite population. Data obtained here, from both invasion and adhesion rates, demonstrate that developing in an intracellular environment absent in LAMP proteins most likely induce changes in the expression of trypomastigote surface proteins. It also reinforces data from literature demonstrating that changes in the *T. cruzi*'s trypomastigotes expression profile alters parasite tropism for specific cells (15,49,50). Nonetheless, contrary to expected, no correlation between adhesion and invasion was observed. In fact, we observed an inverse relation for some cell types since less adherent parasites had the highest invasion rates. Again, to the best of our knowledge this is the first time that an opposite relation between adhesion and invasion rates are shown for *T. cruzi*. These data also support the idea that proteins involved in adhesion may differ from those required for signaling and triggering the cell invasion process, the latter being probably the main factor in the host cell infection process. Therefore, high adhesion with low cell signaling would be ineffective to increase invasion.

Based on the above mentioned, we investigated whether differences in the invasion rates among TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} or TcY-L2^{-/-} would correlate with these parasites ability to trigger host intracellular calcium signaling. As mentioned previously, calcium signaling, either induced via surface receptors stimulus and intracellular calcium stock mobilization or via extracellular calcium influx triggered by micro-injuries, is a crucial step to *T. cruzi* invasion success (4). Indeed, a direct correlation between the amount of calcium signaling and invasion rates was observed, corroborating the data observed for cell invasion. To further understand the contribution of calcium triggered via host surface receptor engagement and parasite induced host membrane micro-injuries, we also performed a membrane injury assay. For most studied parasites and cell types tested, calcium signaling correlated with parasites ability to induce host cell membrane micro-injuries, showing that this pathway is relevant for parasite host cell entry. However, for TcY-WT and TcY-L2^{-/-} in WT fibroblasts, this correlation was not observed. TcY-WT showed significantly higher invasion rates and calcium signals in WT fibroblasts when compared to TcY-L2^{-/-} trypomastigotes, but also lower levels of host cell membrane micro-injury when compared to TcY-L2^{-/-}. These results reinforce that both calcium signaling via micro-injury and via host cell membrane receptors are relevant to *T. cruzi*'s invasion process.

All observed biological alterations for all three parasites groups indicated differences in their surface proteins expression profile. Based on our data, we hypothesize that the intracellular environment can induce changes in the parasite during its development, including surface molecules. To analyze possible differences in the protein surface profiles among the three studied parasites, we performed a quantitative mass spectrometry-based proteomic analysis in a membrane-enriched protein preparation.

The data obtained from this approach confirmed that the intracellular environment is indeed able to modulate *T. cruzi*'s protein abundance. In comparison to TcY-WT trypomastigotes, TcY-L1/2^{-/-} and TcY-L2^{-/-} regulated subproteomes only share thirteen regulated proteins (four

up regulated and nine down regulated – Figure 4), which confirms that only one cycle of infection in a different intracellular environment can induce changes in the parasite surface. Additionally, we observed that a considerable percentage of proteins had predicted transmembrane domains or to be classically or non-classically secreted (Tables 1 and 3). These percentages are similar to previously published data from tissue culture-derived trypomastigotes and axenic amastigotes cell surface proteomes (51) and *T. cruzi*'s secretome (40).

From the comparison between the TcY-L1/2^{-/-} or TcY-L2^{-/-} and the TcY-WT proteome (Table 2) as well as between the TcY-L1/2^{-/-} and the TcY-L2^{-/-} proteome (Table 4), several glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins, such as trans-sialidases, mucins, MASP members and gp63 proteins, were found regulated. It is very well known in the literature that GPI-anchored proteins widely coat *T. cruzi*'s plasma membrane and are involved in several aspects of host-parasite interactions, such as adhesion to and invasion of host cells, evasion from the host immune system, and pathogenesis (52–56). Mucin and trans-sialidase protein families are very relevant to *T. cruzi*'s invasion process (54). The latter protein family can bind to host cell receptors and transfer sialic-acid residues from host glycoconjugates to the major surface glycoproteins of *T. cruzi* – the mucin family, which has been shown to be important for parasite host cell invasion (55). Antibodies raised against synthetic glycopeptides that mimic the parasite mucin glycoproteins remarkably affected *T. cruzi* Y strain metacyclic trypomastigotes invasion in LLC-MK2 cells after incubation (57). Another work showed that purified GPI-mucins from *T. cruzi* modulated trypomastigote invasion during interaction with LLC-MK2 cells (58). A transcriptomic analysis of a virulent (CL Brener) and a non-virulent (CL-14) strain from *T. cruzi* revealed different patterns of expression for the gene families that encode surface proteins such as trans-sialidases, mucins and MASPs (59). This comparative analysis indicated that the non-virulent phenotype of the CL-14 strain could be due, in part, to a reduced or delayed expression of genes encoding these surface proteins (59). Thus, the fact that these proteins have been shown to be differentially present in TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} and TcY-L2^{-/-} parasites may correlate with our biological findings, particularly with the invasion rates.

One remarkable difference observed in the protein extract from TcY-L2^{-/-} trypomastigotes was its higher levels of proteolytic activity when compared to TcY-WT and TcY-L1/2^{-/-} trypomastigotes. In fact, the GO analysis showed an enrichment in proteolysis terms for TcY-L2^{-/-} regulated subproteome, when compared to both TcY-WT and TcY-L1/2^{-/-} proteomes. Besides proteasome proteins, three other *T. cruzi* proteases were responsible for this GO enrichment: metallo-peptidase, Clan MF, Family M17, putative (TcYC6_0033380), cytoskeleton-associated protein CAP5.5, putative (TcYC6_0107360) and surface protease GP63, putative (TcYC6_0169090). The metallo-peptidase, Clan MF, Family M17 belongs to the leucyl aminopeptidase family (EC 3.4.11.1; LAPs) and is a metalloaminopeptidase that catalyses the removal of N-terminal amino acid residues, preferentially leucine, from proteins and peptides. This peptidase was shown to be expressed in all *T. cruzi* forms and does not present gelatinolytic activity (60). The cytoskeleton-associated protein CAP5.5 is a calpain-like protein that was first reported in *T. brucei* and presents post-translational modifications, such as myristoylation and palmytoylation, indicating an association to plasma membrane (61). In *T. cruzi*, the cytoskeleton-associated protein CAP5.5 was identified in both membrane and myristoylation proteomic studies (62,63), and it was also present in the secretome of metacyclic trypomastigotes (40). However, Giese and colleagues (2008) detected no proteolytic activity in gelatin zymography assays, which was consistent with other calpain-like proteins and suggesting that this protein could have a role in signal transduction (64). The

surface protease gp63 is a very well-known protease from *T. cruzi* important for host cell infection (65) and that presents metalloprotease activity (66). In our gelatin zymography assays, we observed gelatinolytic activity that could be related to the presence of gp63, since the negative bands presented a size between 45kDa and 66 kDa (67).

Other differences found upon the proteomic analysis were related to specific metabolic pathways. The pathway enrichment analysis also revealed three pathways enriched for TcY-L2^{-/-} trypomastigotes in comparison to the TcY-WT trypomastigotes (Supplementary Table 3), one from the down regulated proteins list (ether lipid metabolism) and two from the up regulated proteins list (arginine and proline metabolism and, diterpenoid biosynthesis). The ether lipid synthesis has not been fully studied yet and many related proteins are still to be characterized in *T. cruzi* (68). The amino acid proline has been demonstrated to be involved in several essential aspects of *T. cruzi*'s life cycle, such as differentiation of epimastigotes into metacyclic trypomastigotes and among intracellular stages, host cell invasion, and survival to thermal and nutritional stress (69–71). Tonelli and colleagues (2004) observed that under L-proline supplementation, CHO-K1 infected cell cultures released a higher number of trypomastigotes to the extracellular milieu from the 5th to the 9th day post-infection (69). Although, the authors did not measure the intracellular parasite multiplication. Based on their data, the previous data from our group (11) and the above mentioned pathway enrichment analysis, we are prone to believe that perhaps trypomastigotes derived from LAMP-2 deficient fibroblasts possess a more active proline metabolism which, in turn, could also explain their higher multiplication rate previously observed by our group (11). Experimental data is still needed to prove this hypothesis. Additionally, Martins and colleagues (2009) have observed a recovery of gp82-mediated invasion capacity promoted by L-proline treatment of starved *T. cruzi*'s Y strain metacyclic trypomastigotes after 54h in starvation media (70). The authors also observed that L-proline increased *T. cruzi*'s CL strain parasites' ability to traverse a gastric mucin layer toward target epithelial cells in the stomach mucosa, which is an essential requirement for subsequent cell invasions (70).

We also found the sphingolipid metabolism pathway enriched in the TcY-L1/2^{-/-} membrane subproteome from the up regulated proteins (Supplementary Table 3). Therefore, indicating that this pathway was likely enriched in TcY-L1/2^{-/-} trypomastigotes in comparison to the TcY-WT trypomastigotes. We did not find up regulated proteins that would relate directly to the sphingolipid metabolism pathway (68). However, *T. cruzi* synthesizes the inositolphosphorylceramide as its primary phosphosphingolipid, which is also an attached lipid of GPI-anchors (52,72–75). Indeed, the proteins addressed to this pathway by the enrichment analysis, the UDP-Gal or UDP-GlcNAc-dependent glycosyltransferase (TcYC6_0105630) and five trans-sialidase members (TcYC6_0128720, TcYC6_0128910, TcYC6_0129770, TcYC6_0130520, TcYC6_0131410), would relate better to the GPI-anchor pathway. N-Acetylglucosamine (GlcNAc) is transferred onto an acyl/alkyl-PI by glycosyltransferase complexes and trans-sialidases are GPI-anchored proteins (76,77). Both the glycosylation process and the production of glycosylated proteins are known as important for mediating cellular recognition, host cell adhesion and invasion, as well as immune evasion by the parasite (78–80). Interestingly, TcY-L1/2^{-/-} trypomastigotes have the highest invasion rates in WT fibroblasts, when compared to TcY-WT and TcY-L2^{-/-}.

The present work provides evidence that the intracellular environment can modulate *T. cruzi*'s biological behavior through inducing changes on its surface molecules. The results described here lead us to think that this intracellular modulation could be part of *T. cruzi*'s adaptability and ability to infect different cell types. In turn, the surface molecules modulation could

contribute to *T. cruzi*'s tropism to host specific tissues and perhaps to immune system evasion as well. Evidence to this hypothesis needs still to be addressed.

5. Acknowledgements

We are especially grateful to Dr. Paul Saftig and Dr. Renato Mortara for providing the LAMP1/2 and LAMP2 knock out cells that have been used in this work, as well as the Laboratório de Equipamentos Multiusuários for the use of the Synergy2 and Jamil Silvano de Oliveira from Laboratório de Biologia Estrutural for technical assistance with the ultracentrifuge – Department of Biochemistry and Immunology, ICB / UFMG. We are also grateful to the funding agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (MCTIC/CNPq No 28/2018 – Universal 429635/2018-4), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG – APQ-02974-17) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES fellowship).

6. References

1. World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis) [Internet]. 2021 [cited 2021 Aug 9]. Available from: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
2. Andrade LO, Andrews NW. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3(10):819–23.
3. De Souza W, De Carvalho TMU, Barrias ES. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host cell interaction. *Int J Cell Biol*. 2010;
4. Fernandes MC, Andrews NW. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: A unique strategy that promotes persistence. *FEMS Microbiol Rev*. 2012;36(3):734–47.
5. Burleigh BA, Woolsey AM. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cell Microbiol*. 2002 Nov;4(11):701–11.
6. Tardieux I, Webster P, Ravesloot J, Boron W, Lunn JA, Heuser JE, et al. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell*. 1992 Dec;71(7):1117–30.
7. Tam C, Idone V, Devlin C, Fernandes MC, Flannery A, He X, et al. Exocytosis of acid sphingomyelinase by wounded cells promotes endocytosis and plasma membrane repair. *J Cell Biol*. 2010 Jun 14;189(6):1027–38.
8. Fernandes MC, Cortez M, Flannery AR, Tam C, Mortara RA, Andrews NW. *Trypanosoma cruzi* subverts the sphingomyelinase-mediated plasma membrane repair pathway for cell invasion. *J Exp Med*. 2011 May 9;208(5):909–21.
9. Andrade LO, Andrews NW. Lysosomal Fusion Is Essential for the Retention of *Trypanosoma cruzi* Inside Host Cells. *J Exp Med*. 2004 Nov 1;200(9):1135–43.
10. Kornfeld S, Mellman I. The Biogenesis of Lysosomes. *Annu Rev Cell Biol*. 1989;5(1):483–525.
11. Albertti LAG, Macedo AM, Chiari E, Andrews NW, Andrade LO. Role of host lysosomal associated membrane protein (LAMP) in *Trypanosoma cruzi* invasion and intracellular development. *Microbes Infect*. 2010;12(10):784–9.
12. Couto NF, Pedersane D, Rezende L, Dias PP, Corbani TL, Bentini LC, et al. LAMP-2 absence interferes with plasma membrane repair and decreases *T. cruzi* host cell

- invasion. Buscaglia CA, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 Jun 6;11(6):e0005657.
13. Schneede A, Schmidt CK, Hölttä-Vuori M, Heeren J, Willenborg M, Blanz J, et al. Role for LAMP-2 in endosomal cholesterol transport. *J Cell Mol Med*. 2011 Feb;15(2):280–95.
 14. Eskelinen E-L, Schmidt CK, Neu S, Willenborg M, Fuertes G, Salvador N, et al. Disturbed Cholesterol Traffic but Normal Proteolytic Function in LAMP-1/LAMP-2 Double-deficient Fibroblasts. *Mol Biol Cell*. 2004 Jul;15(7):3132–45.
 15. dos Santos SL, Freitas LM, Lobo FP, Rodrigues-Luiz GF, Mendes TA de O, Oliveira ACS, et al. The MASP Family of *Trypanosoma cruzi*: Changes in Gene Expression and Antigenic Profile during the Acute Phase of Experimental Infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(8).
 16. Eskelinen EL, Tanaka Y, Saftig P. At the acidic edge: Emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol*. 2003;13(3):137–45.
 17. Aderem A. Signal transduction and the actin cytoskeleton: the roles of MARCKS and profilin. *Trends Biochem Sci*. 1992 Oct;17(10):438–43.
 18. Andrews NW, Hong K su, Robbins ES, Nussenzweig V. Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol*. 1987 Dec;64(3):474–84.
 19. Schenkman S, Diaz C, Nussenzweig V. Attachment of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to receptors at restricted cell surface domains. *Exp Parasitol*. 1991;72(1):76–86.
 20. Oliveira AG, Andrade VA, Guimarães ES, Florentino RM, Sousa PA, Marques PE, et al. Calcium signalling from the type I inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is required at early phase of liver regeneration. *Liver Int*. 2015 Apr;35(4):1162–71.
 21. Pinto MCX, Cota BB, Rodrigues MA, Leite MF, de Souza-Fagundes EM. The Cytotoxic and Proapoptotic Activities of Hypnophilin are Associated with Calcium Signaling in UACC-62 Cells. *J Biochem Mol Toxicol*. 2013 Nov;27(11):479–85.
 22. Bradford M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72(1–2):248–54.
 23. Leber TM, Balkwill FR. Zymography: A Single-Step Staining Method for Quantitation of Proteolytic Activity on Substrate Gels. *Anal Biochem*. 1997 Jun;249(1):24–8.
 24. Callejas-Hernández F, Rastrojo A, Poveda C, Gironès N, Fresno M. Genomic assemblies of newly sequenced *Trypanosoma cruzi* strains reveal new genomic expansion and greater complexity. *Sci Rep*. 2018 Dec 2;8(1):14631.
 25. Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol*. 2001 Jan 19;305(3):567–80.
 26. Sonnhammer EL, von Heijne G, Krogh A. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proceedings Int Conf Intell Syst Mol Biol*. 1998;6:175–82.
 27. Fankhauser N, Mäser P. Sequence analysis Identification of GPI anchor attachment signals by a Kohonen self-organizing map. 2005;21(9):1846–52.

28. Eisenhaber B, Bork P, Eisenhaber F. Sequence properties of GPI-anchored proteins near the omega-site: constraints for the polypeptide binding site of the putative transamidase. *Protein Eng Des Sel*. 1998 Dec 1;11(12):1155–61.
29. Sunyaev SR, Eisenhaber F, Rodchenkov I V, Eisenhaber B, Tumanyan VG, Kuznetsov EN. PSIC: profile extraction from sequence alignments with position-specific counts of independent observations. *Protein Eng*. 1999 May;12(5):387–94.
30. Eisenhaber B, Bork P, Yuan Y, Löffler G, Eisenhaber F. Automated annotation of GPI anchor sites: case study *C. elegans*. *Trends Biochem Sci*. 2000 Jul;25(7):340–1.
31. Eisenhaber B, Bork P, Eisenhaber F. Prediction of potential GPI-modification sites in proprotein sequences. *J Mol Biol*. 1999 Sep 24;292(3):741–58.
32. Almagro Armenteros JJ, Sønderby CK, Sønderby SK, Nielsen H, Winther O. DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. Hancock J, editor. *Bioinformatics*. 2017 Nov 1;33(21):3387–95.
33. Almagro Armenteros JJ, Tsirigos KD, Sønderby CK, Petersen TN, Winther O, Brunak S, et al. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nat Biotechnol*. 2019 Apr 18;37(4):420–3.
34. Bendtsen JD, Kiemer L, Fausbøll A, Brunak S. Non-classical protein secretion in bacteria. *BMC Microbiol*. 2005 Oct 7;5:58.
35. Supek F, Bošnjak M, Škunca N, Šmuc T. REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms. Gibas C, editor. *PLoS One*. 2011 Jul 18;6(7):e21800.
36. Piras M, Piras R, Henríquez D. Changes in morphology and infectivity of cell culture-derived trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1982 Aug;6(2):67–81.
37. Piras R, Piras MM, Henríquez D. *Trypanosoma cruzi*-fibroblastic cell interactions necessary for cellular invasion. *Ciba Found Symp*. 1983;99:31–51.
38. Andrews NW, Colli W. Adhesion and Interiorization of *Trypanosoma cruzi* in Mammalian Cells1. *J Protozool*. 1982 May;29(2):264–9.
39. Tardieux I, Nathanson MH, Andrews NW. Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic-free Ca²⁺ transients. *J Exp Med*. 1994;179(3):1017–22.
40. Bayer-Santos E, Aguilar-Bonavides C, Rodrigues SP, Cordero EM, Marques AF, Varela-Ramirez A, et al. Proteomic analysis of *trypanosoma cruzi* secretome: Characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins. *J Proteome Res*. 2013;12(2):883–97.
41. Gonçalves MF, Umezawa ES, Katzin AM, de Souza W, Alves MJM, Zingales B, et al. *Trypanosoma cruzi*: shedding of surface antigens as membrane vesicles. *Exp Parasitol*. 1991 Jan;72(1):43–53.
42. Trocoli Torrecilhas AC, Tonelli RR, Pavanelli WR, da Silva JS, Schumacher RI, de Souza W, et al. *Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. *Microbes Infect*. 2009;11(1):29–39.
43. Eskelinen EL. Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Aspects Med*. 2006;27(5–6):495–502.
44. Romano PS, Arboit MA, Vázquez CL, Colombo MI. The autophagic pathway is a key component in the lysosomal dependent entry of *Trypanosoma cruzi* into the host cell.

- Autophagy. 2009 Jan;5(1):6–18.
45. Andrade LO, Galvão LM, Meirelles M de NS, Chiari E, Pena SD, Macedo AM. Differential tissue tropism of *Trypanosoma cruzi* strains: an in vitro study. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010 Sep;105(6):834–7.
 46. Maeda FY, Clemente TM, Macedo S, Cortez C, Yoshida N. Host cell invasion and oral infection by *Trypanosoma cruzi* strains of genetic groups TcI and TcIV from chagasic patients. *Parasit Vectors*. 2016 Dec 1;9(1):189.
 47. Barrias ES, de Carvalho TMU, De Souza W. *Trypanosoma cruzi*: Entry into Mammalian Host Cells and Parasitophorous Vacuole Formation. *Front Immunol*. 2013;4(AUG).
 48. Ferri G, Edreira MM. All Roads Lead to Cytosol: *Trypanosoma cruzi* Multi-Strategic Approach to Invasion. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 Mar 5;11.
 49. Andrade LO, Machado CRS, Chiari E, Pena SDJ, Macedo AM. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Mol Biochem Parasitol*. 1999;100(2):163–72.
 50. Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP, Pena SDJ. *Trypanosoma cruzi*: Genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004;99(1):1–12.
 51. Queiroz RML, Charneau S, Bastos IMD, Santana JM, Sousa M V., Roepstorff P, et al. Cell Surface Proteome Analysis of Human-Hosted *Trypanosoma cruzi* Life Stages. *J Proteome Res*. 2014 Aug 14;13(8):3530–41.
 52. McConville MJ, Ferguson MAJ. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochem J*. 1993 Sep 1;294(2):305–24.
 53. Ferguson MA. The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J Cell Sci*. 1999 Sep;112 (Pt 1):2799–809.
 54. McConville MJ, Menon AK. Recent developments in the cell biology and biochemistry of glycosylphosphatidylinositol lipids (review). *Mol Membr Biol*. 2000;17(1):1–16.
 55. Buscaglia CA, Campo VA, Frasc ACC, Di Noia JM. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nat Rev Microbiol*. 2006 Mar;4(3):229–36.
 56. Gazzinelli RT, Denkers EY. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nat Rev Immunol*. 2006 Dec;6(12):895–906.
 57. Campo VL, Riul TB, Carvalho I, Baruffi M-D. Antibodies against Mucin-Based Glycopeptides Affect *Trypanosoma cruzi* Cell Invasion and Tumor Cell Viability. *ChemBioChem*. 2014 Jul 7;15(10):1495–507.
 58. Soares RP, Torrecilhas AC, Assis RR, Rocha MN, Moura e Castro FA, Freitas GF, et al. Intraspecies variation in *Trypanosoma cruzi* GPI-mucins: biological activities and differential expression of α -galactosyl residues. *Am J Trop Med Hyg*. 2012 Jul;87(1):87–96.
 59. Belew AT, Junqueira C, Rodrigues-Luiz GF, Valente BM, Oliveira AER, Polidoro RB, et al. Comparative transcriptome profiling of virulent and non-virulent *Trypanosoma*

- cruzi underlines the role of surface proteins during infection. Taylor M, editor. *PLOS Pathog.* 2017 Dec 14;13(12):e1006767.
60. Cadavid-Restrepo G, Gastardelo TS, Faudry E, de Almeida H, Bastos IM, Negreiros RS, et al. The major leucyl aminopeptidase of *Trypanosoma cruzi* (LAPTc) assembles into a homohexamer and belongs to the M17 family of metallopeptidases. *BMC Biochem.* 2011;12(1):46.
 61. Hertz-Fowler C, Ersfeld K, Gull K. CAP5.5, a life-cycle-regulated, cytoskeleton-associated protein is a member of a novel family of calpain-related proteins in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* 2001 Aug;116(1):25–34.
 62. Cordero EM, Nakayasu ES, Gentil LG, Yoshida N, Almeida IC, da Silveira JF. Proteomic analysis of detergent-solubilized membrane proteins from insect-developmental forms of *Trypanosoma cruzi*. *J Proteome Res.* 2009 Jul;8(7):3642–52.
 63. Roberts AJ, Fairlamb AH. The N-myristoylome of *Trypanosoma cruzi*. *Sci Rep.* 2016 Nov 5;6(1):31078.
 64. Giese V, Dallagiovanna B, Marchini FK, Pavoni DP, Krieger MA, Goldenberg S. *Trypanosoma cruzi*: a stage-specific calpain-like protein is induced after various kinds of stress. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008 Sep;103(6):598–601.
 65. Kulkarni MM, Olson CL, Engman DM, McGwire BS. *Trypanosoma cruzi* GP63 Proteins Undergo Stage-Specific Differential Posttranslational Modification and Are Important for Host Cell Infection. *Infect Immun.* 2009 May;77(5):2193–200.
 66. Cuevas IC, Cazzulo JJ, Sánchez DO. gp63 Homologues in *Trypanosoma cruzi* : Surface Antigens with Metalloprotease Activity and a Possible Role in Host Cell Infection. *Infect Immun.* 2003 Oct;71(10):5739–49.
 67. Rebello KM, Uehara LA, Ennes-Vidal V, Garcia-Gomes AS, Britto C, Azambuja P, et al. Participation of *Trypanosoma cruzi* gp63 molecules on the interaction with *Rhodnius prolixus*. *Parasitology.* 2019 Jul 6;146(8):1075–82.
 68. Booth L, Smith TK. Lipid metabolism in *Trypanosoma cruzi*: A review. *Mol Biochem Parasitol.* 2020;240(June):111324.
 69. Tonelli RR, Silber AM, Almeida-de-Faria M, Hirata IY, Colli W, Alves MJM. L-proline is essential for the intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Cell Microbiol.* 2004 Aug;6(8):733–41.
 70. Martins RM, Covarrubias C, Rojas RG, Silber AM, Yoshida N. Use of L-proline and ATP production by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms as requirements for host cell invasion. *Infect Immun.* 2009 Jul;77(7):3023–32.
 71. Paes LS, Suárez Mantilla B, Zimbres FM, Pral EMF, Diogo de Melo P, Tahara EB, et al. Proline dehydrogenase regulates redox state and respiratory metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One.* 2013;8(7):e69419.
 72. Lester RL, Dickson RC. Sphingolipids with inositolphosphate-containing head groups. *Adv Lipid Res.* 1993;26:253–74.
 73. Bertello LE, Gonçalves MF, Colli W, de Lederkremer RM. Structural analysis of inositol phospholipids from *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms. *Biochem J.* 1995 Aug 15;310 (Pt 1):255–61.
 74. Figueiredo JM, Dias WB, Mendonça-Previato L, Previato JO, Heise N.

- Characterization of the inositol phosphorylceramide synthase activity from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J*. 2005 Apr 15;387(Pt 2):519–29.
75. Uhrig ML, Couto AS, Colli W, de Lederkremer RM. Characterization of inositolphospholipids in *Trypanosoma cruzi* trypomastigote forms. *Biochim Biophys Acta*. 1996 May 20;1300(3):233–9.
 76. Heise N, Raper J, Buxbaum LU, Peranovich TMS, de Almeida MLC. Identification of Complete Precursors for the Glycosylphosphatidylinositol Protein Anchors of *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem*. 1996 Jul;271(28):16877–87.
 77. Previato JO, Wait R, Jones C, DosReis GA, Todeschini AR, Heise N, et al. Glycoinositolphospholipid from *Trypanosoma cruzi*: structure, biosynthesis and immunobiology. *Adv Parasitol*. 2004;56:1–41.
 78. Acosta-Serrano A, Almeida IC, Freitas-Junior LH, Yoshida N, Schenkman S. The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: Structure and biological roles. *Mol Biochem Parasitol*. 2001;114(2):143–50.
 79. Giorgi ME, de Lederkremer RM. Trans-sialidase and mucins of *Trypanosoma cruzi*: an important interplay for the parasite. *Carbohydr Res*. 2011 Sep 6;346(12):1389–93.
 80. Alves MJM, Colli W. *Trypanosoma cruzi*: adhesion to the host cell and intracellular survival. *IUBMB Life*. 2007;59(4–5):274–9.

FIGURES

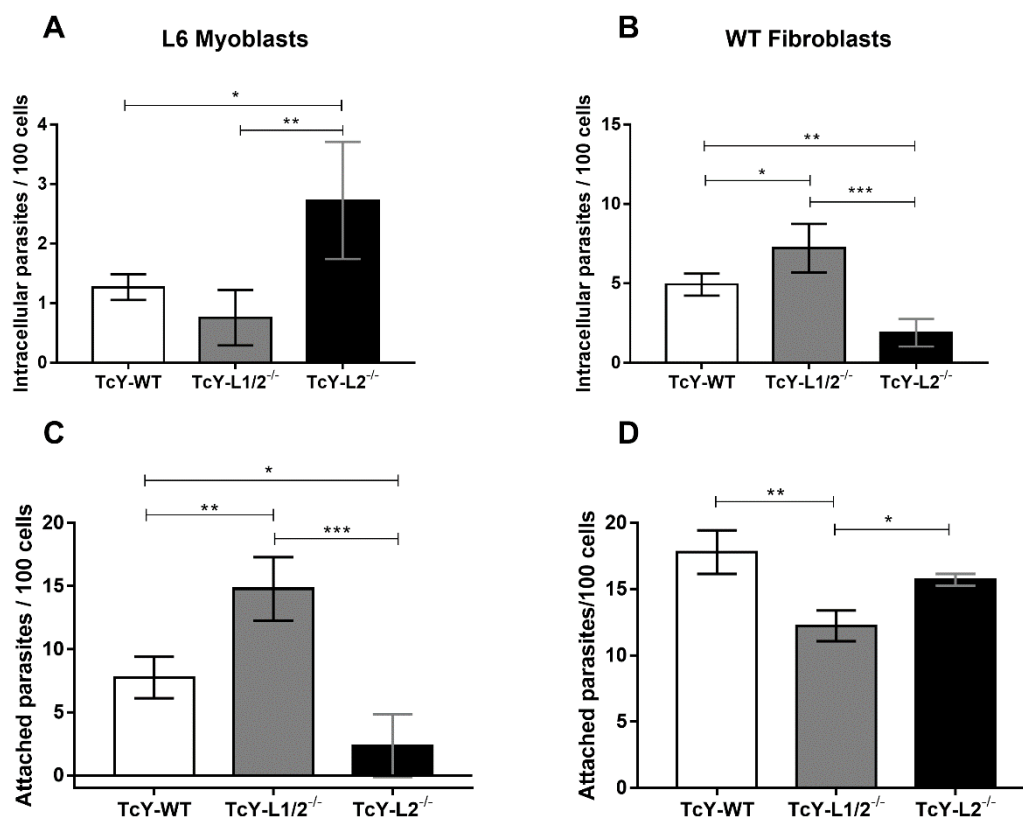


Figure 1: Parasite invasion and adhesion rates are altered by passage through WT or LAMP deficient fibroblasts, but do not correlate to each other. Invasion assays (A and B). L6 myoblasts (A) or WT fibroblasts (B) were exposed to TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} and TcY-L2^{-/-} trypomastigotes for 40 min at MOI 50. Cells were fixed with 4% PFA and labeled with *T. cruzi* antibody and DAPI. Adhesion assays (C and D). L6 myoblasts (C) or WT fibroblasts (D) were fixed with glutaraldehyde 2% prior incubation with to TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} and TcY-L2^{-/-} trypomastigotes for 40 min at MOI 50. Cells were fixed with 4% PFA and stained with rapid panoptic staining. Asterisks represent statistical significance between groups (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001, One-way ANOVA, Fisher's LSD).

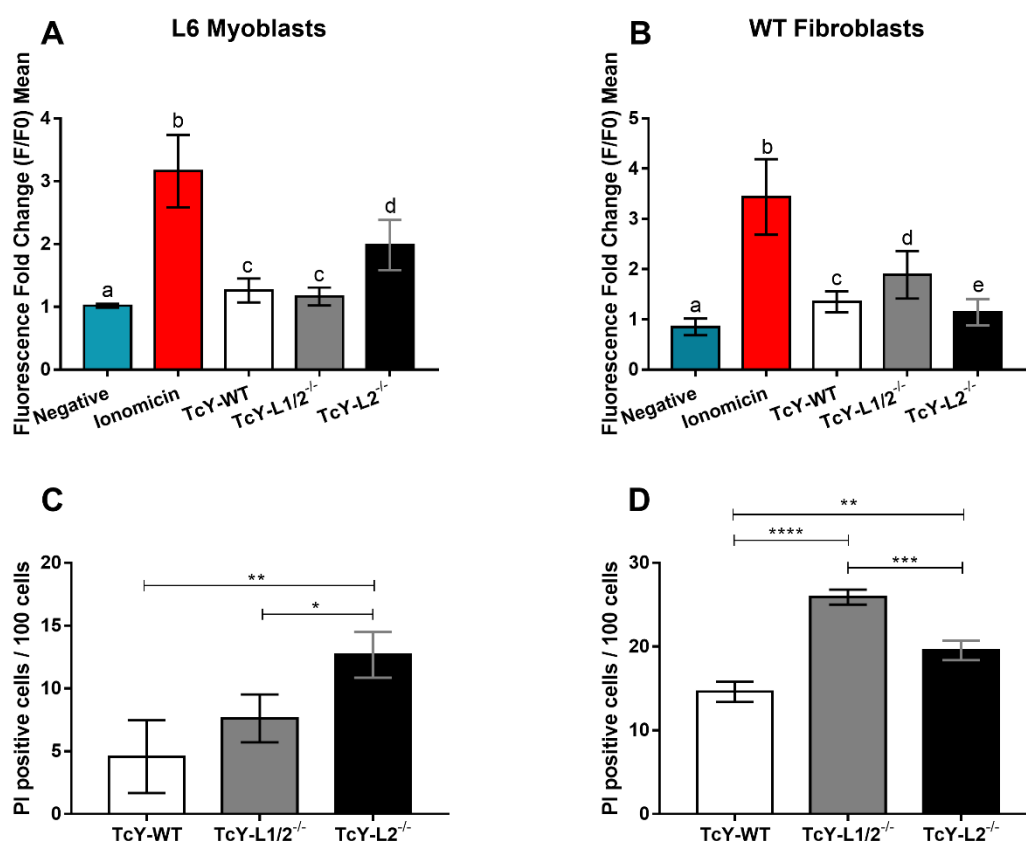


Figure 2: Parasites derived from WT or LAMP KO cells differ in their ability in triggering host calcium signaling events and these differences correlate, in part, with their ability to inducing micro-injuries in the host cell plasma membrane. L6 myoblasts or WT fibroblasts were exposed to TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} and TcY-L2^{-/-} trypomastigotes as described in the Materials and methods section. Calcium signaling assays in L6 myoblasts (A) and WT fibroblasts (B), the cells were also exposed to ionomycin as positive control and culture medium as negative control. Different letters represent statistical significance between the groups ($p < 0.0001$, except for negative x TcY-L2^{-/-} in L6 myoblasts and negative x TcY-WT in fibroblasts – $p < 0.01$, as well as TcY-WT x TcY-L2^{-/-} in L6 and negative x TcY-L1/2^{-/-} in fibroblast – $p < 0.05$; One-way ANOVA, FDR controlled). Membrane injury assays in L6 myoblasts (C) and WT fibroblasts (D). Asterisks represent statistical difference between groups (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, One-way ANOVA, Fisher's LSD).

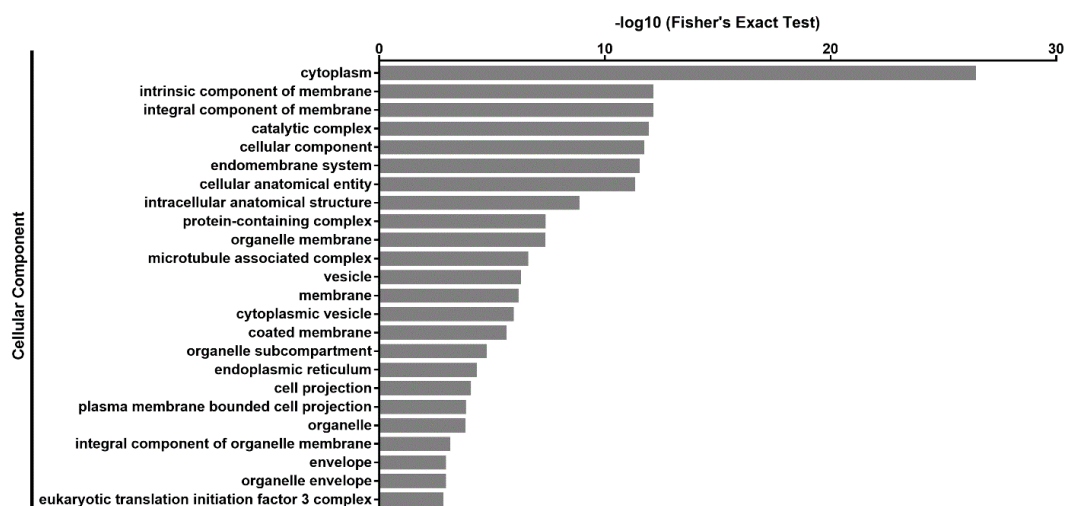


Figure 3: Gene ontology analysis of TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} and TcY-L2^{-/-} identified proteins confirmed that the samples were abundant in membrane terms. The graph displays the cellular component level of the 3806 identified proteins submitted to Gene ontology enrichment analysis using the TriTrypDB gene ontology tool.

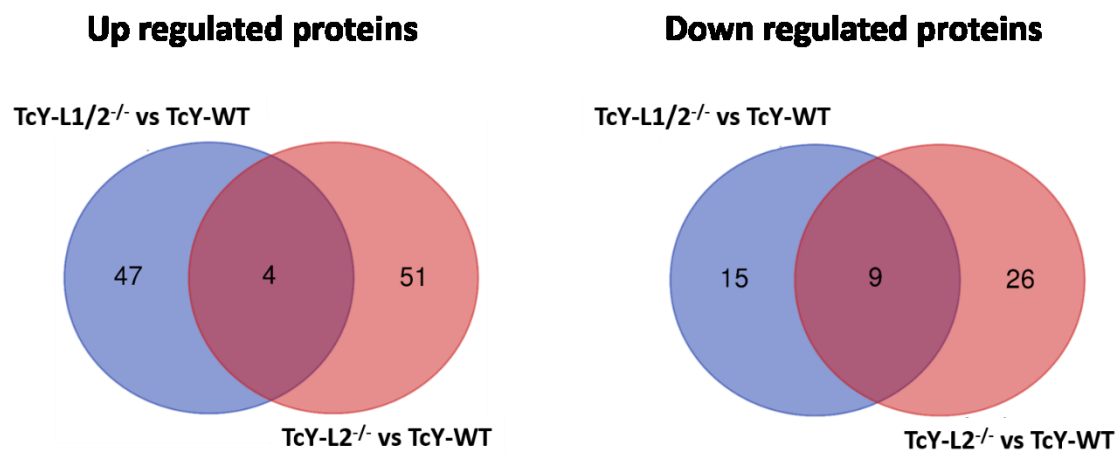


Figure 4: TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} and TcY-L2^{-/-} trypanomastigotes present differentially regulated proteins among them. Venn diagrams showing the exclusively regulated and the shared proteins in TcY-L1/2^{-/-} and TcY-L2^{-/-} regulated subproteomes in comparison to TcY-WT proteome. This figure was prepared using the Draw Venn Diagram webtool (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

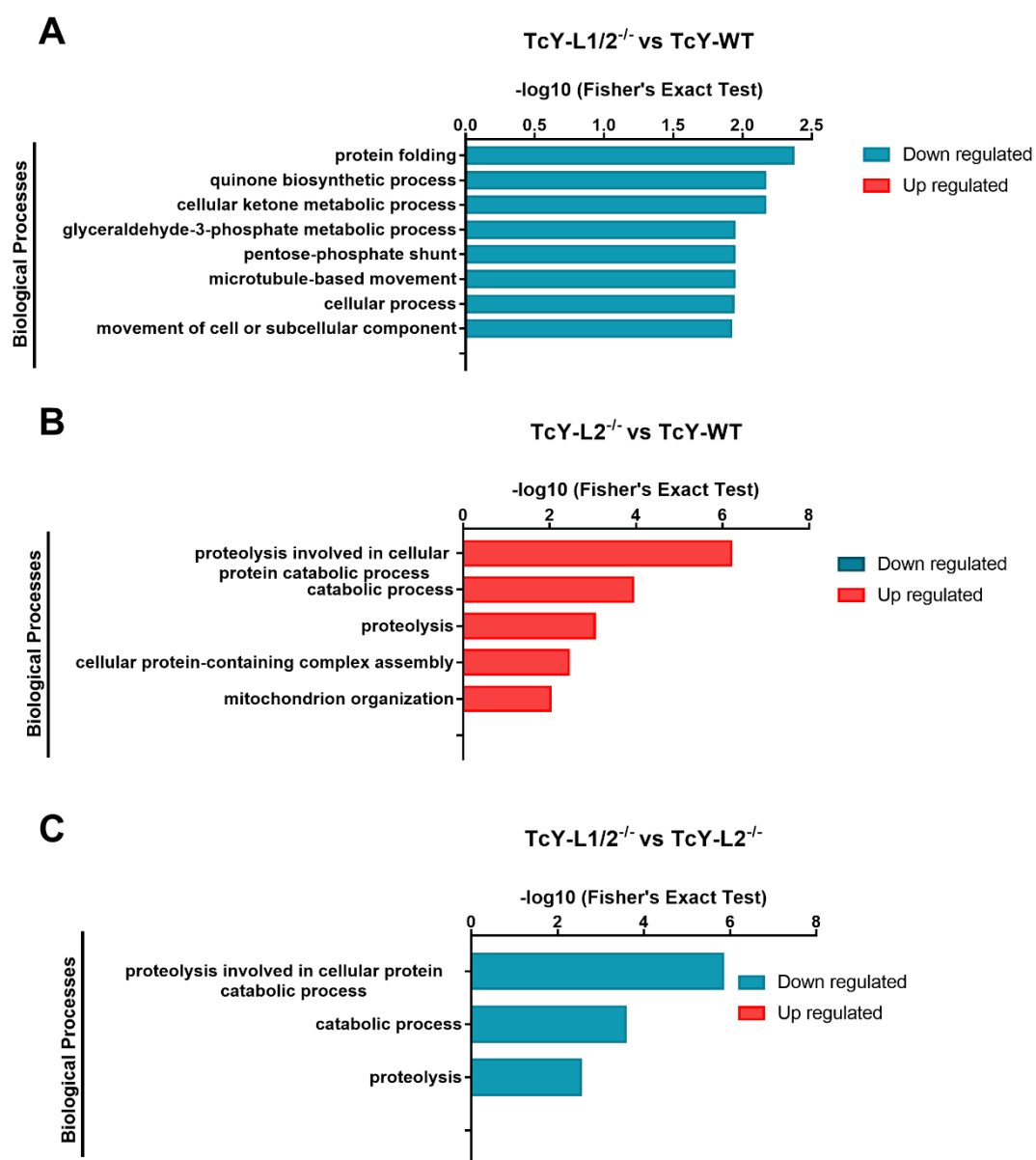


Figure 5: Gene ontology enrichment analysis of biological processes terms in TcY-L1/2^{-/-} or TcY-L2^{-/-} regulated subproteomes. The graph shows the different biological processes up or down regulated, based on the differentially expressed proteins of TcY-L1/2^{-/-} (A) or TcY-L2^{-/-} (B) compared to TcY-WT proteome, and on the differentially expressed proteins of TcY-L1/2^{-/-} (C) compared to TcY-L2^{-/-} proteome.

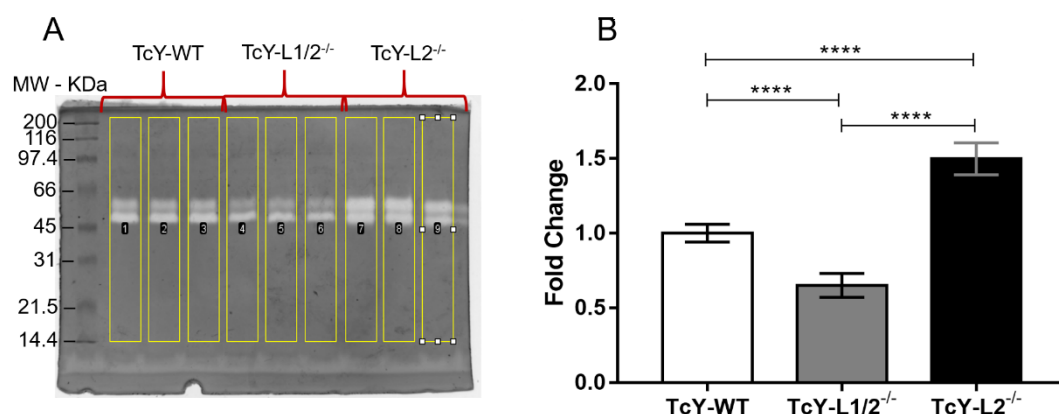


Figure 6: Increased proteolytic activity of TcY-L2^{-/-} assessed by gelatin zymography assays. (A) Representative SDS-PAGE gel showing the negative bands from gelatinolytic activity. (B) Quantification obtained from gels using ImageJ software – TcY-WT values were used as a normalizer for all groups. Asterisks represent statistical difference between groups (**** $p < 0.0001$, One-way ANOVA, Fisher's LSD).

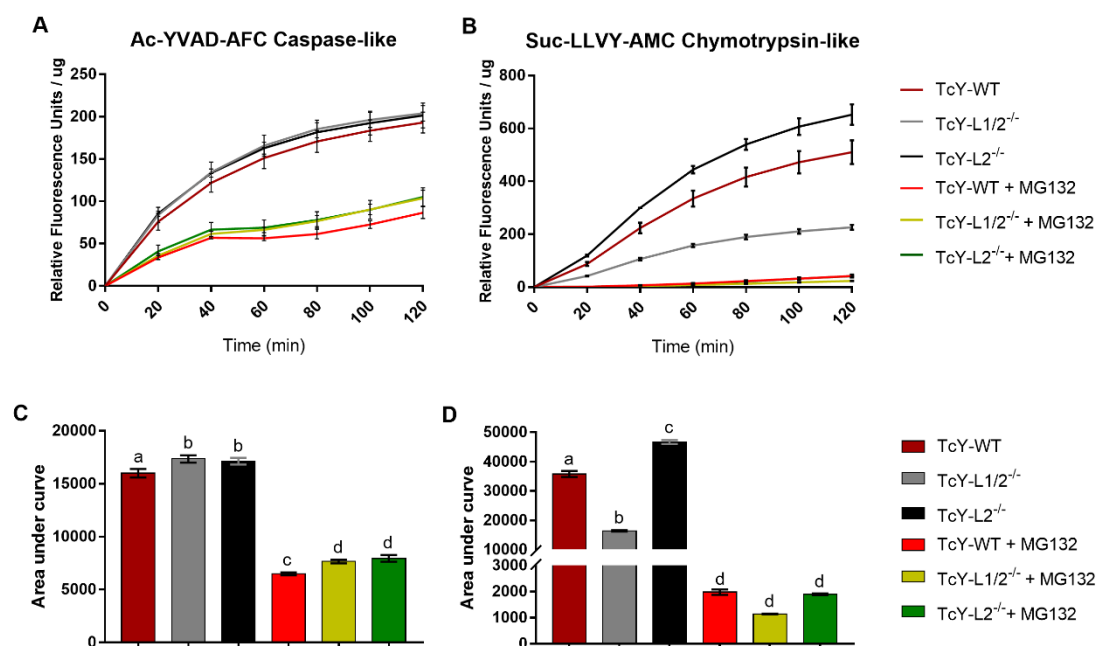


Figure 7: Cysteine protease and serine protease enzymatic activity kinetics. Cysteine (A) or serine (B) activity in TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} or TcY-L2^{-/-} trypomastigotes protein extracts were assayed using a fluorescence method with caspase substrate Ac-YVAD-AFC for caspase-like cysteine enzymes activity or chymotrypsin substrate Suc-LLVY-AMC for chymotrypsin-like serine enzymes activity. The data are mean \pm SD for the kinetic curves A and B. Different letters represent statistical difference between groups ($p < 0.0005$, One-way ANOVA, FDR controlled).

TABLES

Table 1. Number of proteins from the regulated subproteome with predicted transmembrane domains, GPI-anchor, classically and non-classically secreted, and enzymes

Subproteome	Total regulated	TM Domains*	GPI-anchored*	SignalP*	SecretomeP*	Enzymes**
TcY-L1/2 ^{-/-}	75	27 (36.0 %)	8 (10.7 %)	7 (9.3 %)	19 (25.3 %)	20 (26.7 %)
↑ UP	51	26 (51.0 %)	8 (15.7 %)	6 (11.8 %)	13 (25.5 %)	12 (23.5 %)
↓ DOWN	24	1 (4.2 %)	0 (0.0 %)	1 (4.2 %)	4 (16.7 %)	6 (25.0 %)
TcY-L2 ^{-/-}	90	34 (37.8 %)	8 (8.9 %)	16 (17.8 %)	11 (12.2 %)	23 (25.6 %)
↑ UP	55	31 (56.4 %)	7 (12.7 %)	12 (21.8 %)	5 (9.1 %)	18 (32.7 %)
↓ DOWN	35	3 (8.6 %)	1 (2.9 %)	4 (11.4 %)	5 (14.3 %)	5 (14.3 %)

*Absolute numbers and percentages of regulated protein groups with predicted transmembrane (TM) domains or GPI-anchored, ER/Golgi signal peptide (SignalP) or non-classically secreted (SecretomeP) related to the total number of regulated proteins identified in each subproteome compared to TcY-WT proteome. **Absolute numbers and percentages of enzymes in each subproteome related to the total number of regulated proteins compared to TcY-WT proteome.

Table 2. Important surface membrane proteins regulated in TcY-L1/2^{-/-} and TcY-L2^{-/-} trypomastigotes compared to TcY-WT trypomastigotes

TriTryp ID	Protein description	log2 FC	
		TcY-L1/2 ^{-/-} /TcY-WT	TcY-L2 ^{-/-} /TcY-WT
TcYC6_0114230	membrane protein, putative	NDR	1.04
TcYC6_0162290	Mucin-associated surface protein (MASP), subgroup S002	NDR	0.88
TcYC6_0158360	Mucin-associated surface protein (MASP), subgroup S017	0.88	NDR
TcYC6_0161780	Mucin-associated surface protein (MASP), subgroup S061	NDR	-1.66
TcYC6_0160330	Mucin-associated surface protein (MASP), subgroup S097	0.31	NDR
TcYC6_0124770	Surface membrane protein	NDR	1.08
TcYC6_0169700	surface protease GP63, putative	NDR	1.32
TcYC6_0169840	surface protease GP63, putative	0.29	NDR
TcYC6_0016150	transmembrane protein	NDR	-0.98
TcYC6_0128720	trans-sialidase, Group II, putative	0.8	NDR
TcYC6_0131410	trans-sialidase, Group II, putative	0.36	NDR
TcYC6_0131440	trans-sialidase, Group II, putative	NDR	0.87
TcYC6_0130520	trans-sialidase, Group V, putative	0.69	NDR
TcYC6_0129770	trans-sialidase, Group VI, putative	0.32	NDR
TcYC6_0128910	trans-sialidase, putative	0.78	NDR
TcYC6_0130010	trans-sialidase, putative	NDR	0.9

NDR = not differentially regulated. Red = up regulated and blue = down regulated.

Table 3. Number of proteins from the regulated subproteome with predicted transmembrane domains, GPI-anchor, classically and non-classically secreted, and enzymes

Subproteome	Total regulated	TM Domains*	GPI-anchored*	SignalP*	SecretomeP*	Enzymes**
TcY-L1/2 ^{-/-} vs TcY-L2 ^{-/-}	136	34 (25.0 %)	10 (7.4 %)	18 (13.2 %)	28 (20.6 %)	39 (28.7 %)
↑ UP	81	10 (12.3 %)	2 (2.5 %)	6 (7.4 %)	17 (21.0 %)	17 (21.0 %)
↓ DOWN	55	24 (43.6 %)	8 (14.5 %)	12 (21.8 %)	11 (20.0 %)	22 (40.0 %)

*Absolute numbers and percentages of regulated protein groups with predicted transmembrane (TM) domains or GPI-anchored, ER/Golgi signal peptide (SignalP) or non-classically secreted (SecretomeP) related to the total number of regulated proteins identified in each subproteome compared to TcY-WT proteome. **Absolute numbers and percentages of enzymes in each subproteome related to the total number of regulated proteins compared to TcY-WT proteome.

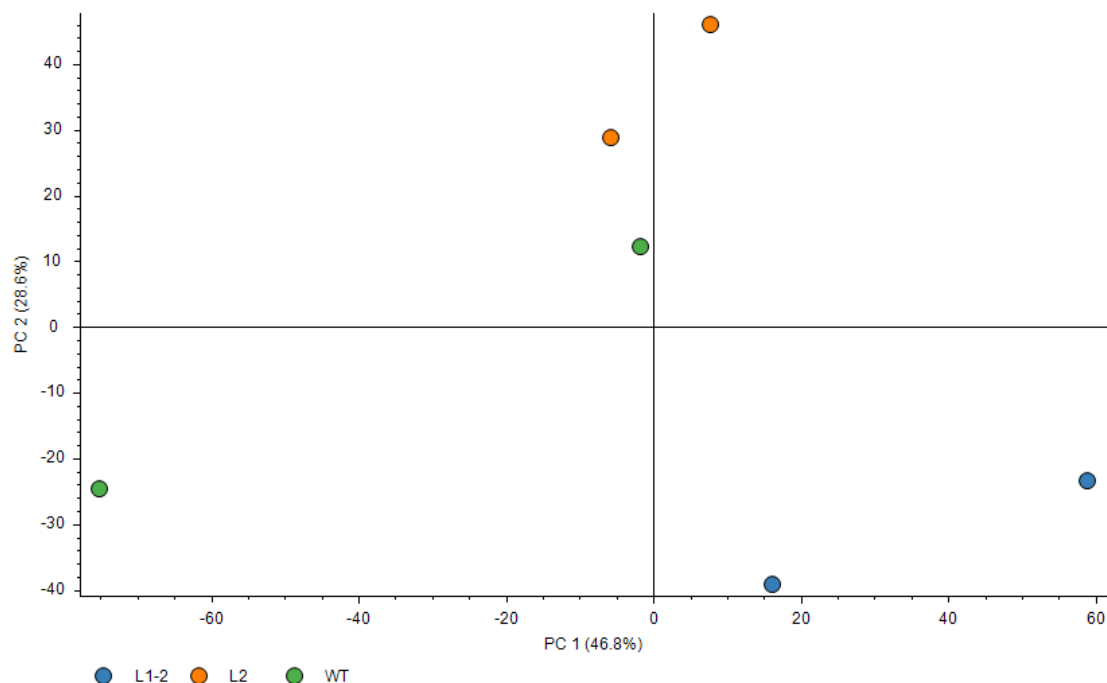
Table 4. Important surface membrane proteins regulated in TcY-L1/2^{-/-} trypomastigotes compared to TcY-L2^{-/-} trypomastigotes

TriTryp ID	Protein description	log2 FC TcY-L1/2 ^{-/-} /TcY-L2 ^{-/-}
TcYC6_0154080	mucin TcMUCII, putative	-1.46
TcYC6_0150670	mucin TcMUCII, putative	-0.98
TcYC6_0154140	mucin TcMUCII, putative	0.38
TcYC6_0158360	Mucin-associated surface protein (MASP), subgroup S017	0.71
TcYC6_0164190	Mucin-associated surface protein (MASP), subgroup S054	-0.98
TcYC6_0161500	Mucin-associated surface protein (MASP), subgroup S074	-1.47
TcYC6_0124770	Surface membrane protein	-1.09
TcYC6_0169090	surface protease GP63, putative	-1.11
TcYC6_0077110	surface protein TolT, putative	-1.5
TcYC6_0078130	surface protein TolT, putative	-1.46
TcYC6_0078140	surface protein TolT, putative	-1.44
TcYC6_0141330	trans-sialidase (pseudogene), putative	0.34
TcYC6_0130150	trans-sialidase, Group II, putative	-1.18
TcYC6_0131910	trans-sialidase, Group II, putative	-1.01
TcYC6_0132210	trans-sialidase, Group II, putative	-1.01
TcYC6_0128720	trans-sialidase, Group II, putative	0.88
TcYC6_0130010	trans-sialidase, putative	-0.93
TcYC6_0128910	trans-sialidase, putative	0.76

Red = up regulated and blue or purplish = down regulated.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

SUPPLEMENTARY FIGURE 1



Supplementary Figure 1. Principal component analysis of the biological replicates from TcY-WT (green dots), TcY-L1/2^{-/-} (blue dots) and TcY-L2^{-/-} (orange dots) samples.

SUPPLEMENTARY TABLE LEGENDS

Supplementary Table 1 – All identified proteins from TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} and TcY-L2^{-/-} proteomes. Table in Excel file format.

Supplementary Table 2 – Regulated proteins from TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} and TcY-L2^{-/-} regulated subproteomes containing all the analysis performed. Table in Excel file format.

Supplementary Table 3 – Gene Ontology Enrichment analysis for Biological Process terms and Metabolic Pathways analysis from the regulated proteins from TcY-WT, TcY-L1/2^{-/-} and TcY-L2^{-/-} subproteomes. Table in Excel file format.

ANEXO III – Lista de publicações em coautoria durante o período de doutorado

Publicação I – Ricci, M. F.; Bela, S. R.; Moraes M. M.; Bahia, M. T.; Mazzeti, A. L.; Oliveira, A. C. S.; Andrade, L. O.; Radí, R.; Piacenza, L.; Arantes, R. M. E. Neuronal parasitism, early myenteric neurons depopulation and continuous axonal networking damage as underlying mechanisms of the experimental intestinal Chagas' Disease. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 583899, 2020. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.583899>

Publicação II – Resende, B. R.; Oliveira, A. C. S.; Guañabens, A. C. P.; Repolês, B. M.; Santana, V.; Hiraiwa, P. M.; Pena, S. D. J.; Franco, G. R.; Macedo, A. M.; Tahara, E. B.; Fragoso, S. P.; Andrade, L. O.; Machado, C. R. The influence of recombinational processes to induce dormancy in *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 1, 2020. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00005>

Publicação III – Soares Cavalcante-Costa, V.; Costa-Reginaldo, M.; Queiroz-Oliveira, T.; Silva Oliveira, A. C.; Couto, N. F.; Dos Anjos, D. O.; Lima-Santos, J.; Andrade, L. O.; Horta, M. F.; Castro-Gomes, T. *Leishmania amazonensis* hijacks host cell lysosomes involved in plasma membrane repair to induce invasion in fibroblasts. **Journal of Cell Science**, v. 132, p. jcs.226183, 2019. <https://doi.org/10.1242/jcs.226183>

Publicação IV – Couto, N. F.; Pedersane, D.; Rezende, L.; Dias, P. P.; Corbani, T. L.; Bentini, L. C.; Oliveira, A. C. S.; Kelles, L. F.; Castro-Gomes, T.; Andrade, L. O. LAMP-2 absence interfere with plasma membrane repair and decreases *T. cruzi* host cell invasion. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, p. e0005657, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005657>