

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia

Carlos Roberto de Almeida Júnior

**AS TRANS-SIALIDASES DE *TRYPANOSOMA CRUZI* COMO FATORES DE
VIRULÊNCIA E ALVOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE VACINAS PARA
DOENÇA DE CHAGAS**

Belo Horizonte

2023

Carlos Roberto de Almeida Júnior

**AS TRANS-SIALIDASES DE *TRYPANOSOMA CRUZI* COMO FATORES DE
VIRULÊNCIA E ALVOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE VACINAS PARA
DOENÇA DE CHAGAS**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Santuza Maria Ribeiro Teixeira

Coorientadora: Dr^a Nailma Silva Aprigio dos Santos

Belo Horizonte

2023

043

Almeida Júnior, Carlos Roberto de.

As trans-sialidases de *Trypanosoma cruzi* como fatores de virulência e alvos para o desenvolvimento de vacinas para doença de Chagas [manuscrito] / Carlos Roberto de Almeida Júnior. – 2023.

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Santuza Maria Ribeiro Teixeira. Coorientadora: Dr^a Nailma Silva Aprigio dos Santos.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Doença de Chagas. 3. *Trypanosoma cruzi*. 4. Neuraminidase. 5. Vacinas. I. Teixeira, Santuza Maria Ribeiro. II. Santos, Nailma Silva Aprigio dos. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE CARLOS ROBERTO DE ALMEIDA JÚNIOR. Aos seis dias do mês de junho de 2023 às 14:30 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "As trans-sialidases de *Trypanosoma cruzi* como fatores de virulência e alvos para o desenvolvimento de vacinas para doença de Chagas", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Bioquímica. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof^a. Santuza Maria Ribeiro Teixeira, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Nailma Silva Aprígio dos Santos - Coorientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Fabiana Simão Machado (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Walderez Ornelas Dutra (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado:

APROVADO
 REPROVADO


O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 06 de junho de 2023.


 Dra. Nailma Silva Aprígio dos Santos - Coorientadora (UFMG)


 Dra. Fabiana Simão Machado (UFMG)


 Dra. Walderez Ornelas Dutra (UFMG)


 Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira - Orientadora (UFMG)


 Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira
 Subcoordenadora do Programa de
 Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia

Agradecimentos

A Deus, por guiar meus passos e me dar força para seguir em frente.

À professora Santuza Teixeira, pela oportunidade dada de entrar em seu laboratório, pelos seus ensinamentos, confiança e apoio.

A minha coorientadora Nailma Aprigio, por sempre estar disposta a me ajudar, pelos seus ensinamentos, discussões e sua amizade.

À Dr^a Gabriela Burle e à mestranda Isabela Vieira, pela grande ajuda dada com a parte do RNA.

À Dr^a Jennifer Ottino, pela ajuda com as imunizações e desafio dos animais, e ao Dr Rodrigo Sanches, pela ajuda com os ELISAs.

À Dr^a Marta Figueiredo, pela ajuda com as análises histopatológicas.

À aluna de iniciação científica Jéssica Vitória, por toda ajuda oferecida nos experimentos.

À técnica Renata Peixoto, pelo seu suporte dado ao laboratório e sua amizade.

À equipe do CT-Vacinas, por sempre estarem dispostos a ajudar.

Ao Elimar, Jamil, Eneida, Jaque e a todos os técnicos do departamento que me ajudaram de alguma forma.

Aos colegas de laboratório, pelas conversas, amizade, pelos momentos de descontração e pelas ajudas oferecidas. Em especial à Nailma, Marina, Renata, Vivi, Gabi, Wanessa, Juan, Jéssica, Ana e Duda.

Aos meus pais, que sempre estiveram ao meu lado, me dando todo o apoio necessário, e por todo seu amor.

A minha família e amigos, que são os pilares da minha vida, por todo apoio nos momentos mais difíceis, pela confiança, amor e zelo.

Ao meu namorado Júlio Magalhães, pelo seu companheirismo, amor e por sempre estar ao meu lado me apoiando.

Aos professores que tive durante a minha trajetória acadêmica e a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a pessoa que sou hoje.

*“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens,
mas em ter novos olhos”.*

(Marcel Proust)

RESUMO

As trans-sialidases (TS) são proteínas presentes na superfície do *Trypanosoma cruzi*, codificadas por uma família multigênica e altamente variável. Somente um sub-grupo das TS possui atividade catalítica, responsável por transferir resíduos de ácido siálico de glicoconjugados do hospedeiro para mucinas na superfície do parasito, um mecanismo relacionado à capacidade de evasão do parasito ao sistema imune do hospedeiro. Algumas TS possuem um domínio na porção C-terminal da proteína contendo repetições de 12 aminoácidos denominadas SAPA (*shed acute parasite antigen*). Além de ser altamente imunogênico, o domínio SAPA aumenta a estabilidade da enzima na corrente sanguínea, sendo considerado um fator de virulência do parasito. No presente trabalho, a sequência de uma TS ativa contendo ou não repetições SAPA foi avaliada como candidata vacinal para duas estratégias de vacinas: com proteína recombinante e vacina de RNA. Três versões da proteína recombinante foram produzidas em *E. coli*: a proteína completa (TS completa), a proteína sem as repetições (TS sem SAPA) e a proteína contendo somente as repetições SAPA (TS-SAPA). Camundongos BALB/c foram imunizados com as proteínas e desafiados com uma cepa virulenta de *T. cruzi*. Análises da resposta imune celular mostraram que a imunização com a TS sem SAPA resultou em maiores níveis de IFN- γ e menores níveis de IL-10 produzidos pelos esplenócitos dos animais em comparação com esplenócitos dos animais imunizados com a TS completa, ou com a proteína contendo somente as repetições SAPA. Além disso, após o desafio, a imunização dos animais com a proteína contendo somente as repetições SAPA resultou em maior parasitemia e mortalidade, comparada à imunização com a TS sem SAPA. Importante ressaltar que os tecidos dos animais imunizados com a TS sem SAPA não exibiram infiltrado inflamatório nem níveis detectáveis de DNA do parasito no coração. Portanto, esses resultados indicam que a imunização com a TS sem repetições SAPA é a melhor opção para induzir o desenvolvimento de uma resposta Th1 protetora, essencial para o controle da infecção por patógenos intracelulares, e que a presença de repetições SAPA resulta em uma modulação negativa dessa resposta protetora. Visto que as vacinas de RNA apresentam diversas vantagens na imunização e a TS sem SAPA se apresentou como antígeno promissor para um modelo vacinal contra a doença de Chagas, o mRNA dessa proteína foi produzido e testado em uma formulação lipídica para imunizar animais em experimentos futuros.

Palavras-chave: Trans-sialidase (TS), repetições SAPA, *T.cruzi*.

ABSTRACT

Trans-sialidases (TS) are proteins present on the surface of *Trypanosoma cruzi*, encoded by a multigenic and highly variable family. Only a subgroup of TS has catalytic activity, responsible for transferring sialic acid residues from host glycoconjugates to mucins on the parasite surface, a mechanism that is related to the parasite capacity to evade the host immune system. Some TS have a C-terminal domain containing 12 amino acids repeats known as SAPA (shed acute parasite antigen). In addition to being highly immunogenic, the SAPA domain increases the stability of the enzyme in the bloodstream, which is considered a parasite virulence factor. In this study, sequences of an active TS containing or not SAPA repeats were evaluated as vaccine candidates for two vaccine strategies: immunization with recombinant protein and RNA vaccine. Three recombinant versions of the protein were produced in *E. coli*: the full-length protein (full-length TS), TS without repeats (TS without SAPA), and only SAPA repeats (TS-SAPA). BALB/c mice were immunized with each protein and subsequently challenged with a virulent strain of *T. cruzi*. Analyzes of the cellular immune response showed that immunization with TS without SAPA resulted in higher levels of IFN- γ and lower levels of IL-10 produced by splenocytes from animals, compared to splenocytes from animals immunized with full-length TS or protein containing only SAPA repeats. Furthermore, after challenge, mice immunized with protein containing only SAPA repeats resulted in higher parasitemia and mortality compared to immunization with TS without SAPA. It is important to emphasize that tissues of animals immunized with TS without SAPA did not show inflammatory infiltrate or detectable levels of parasite DNA in the heart. Taken together these results indicated that immunization with TS antigen without SAPA repeats is the best option to induce the development of a protective Th1 response, essential for intracellular pathogen infection control, and that the presence of SAPA repeats results in the negative modulation of this protective response. Since RNA vaccines have several advantages in immunization protocols and TS without SAPA is a promising antigen for a vaccine model against Chagas disease, the mRNA of this protein was produced and tested in a lipid formulation for immunization of animals in future experiments.

Keywords: Trans-sialidase (TS), SAPA repeats, *T. cruzi*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação do ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
Figura 2: Representação esquemática da resposta imunológica durante a infecção pelo <i>T. cruzi</i>	20
Figura 3: <i>Imunoscrening</i> de uma biblioteca de cDNA de formas amastigotas do <i>T. cruzi</i> após incubação com soro de pacientes com doença de Chagas....	21
Figura 4: Classificação das TS em oito grupos.....	23
Figura 5: Atividade da trans-sialidase em tripomastigotas do <i>T. cruzi</i>	24
Figura 6: Gerações de vacinas e diferentes estratégias de desenvolvimento utilizadas atualmente.	29
Figura 7: Representação esquemática das Trans-sialidasas contendo repetições SAPA.	44
Figura 8: Digestão do vetor pET-21a para confirmação da clonagem com a TS e suas versões truncadas.....	45
Figura 9: Expressão das proteínas recombinantes em <i>E. coli</i>	46
Figura 10: Teste de solubilidade das proteínas recombinantes.	47
Figura 11: Solubilização da fração insolúvel da TS sem SAPA.	48
Figura 12: Análise das proteínas recombinantes purificadas.....	49
Figura 13: Desenho experimental das imunizações e avaliação da resposta imune.....	50
Figura 14: Dosagem de anticorpos dos soros dos animais imunizados com as proteínas recombinantes.....	51
Figura 15: Análise dos soros dos animais imunizados contra a TS completa e suas versões truncadas e imunodominância das repetições SAPA.	52
Figura 16: Dosagem das citocinas produzidas pelos esplenócitos dos animais imunizados com as proteínas recombinantes.....	53
Figura 17: Desenho experimental das imunizações e desafio com cepa Y de <i>T. cruzi</i>	54
Figura 18: Parasitemia e taxas de sobrevivência dos animais imunizados após desafio com <i>T. cruzi</i>	55
Figura 19: Histopatologia e parasitismo tecidual dos corações dos animais imunizados após desafio com <i>T. cruzi</i>	56
Figura 20: Clonagem da TS sem SAPA no vetor de expressão em mamíferos e	

sua transcrição <i>in vitro</i> em mRNA.....	58
Figura 21: Análise da expressão da TS sem SAPA nas células transfectadas com seu mRNA.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

α -gal	Galactose-alpha-1,3-galactose
ACE2	Enzima conversora de angiotensina 2
Ad5	Adenovirus recombinante sorotipo 5
APC	Célula apresentadora de antígeno
ASP	<i>Amastigote Surface Protein</i>
cDNA	DNA complementar
CpG	Citosina-fosfato-Guanina
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
<i>g</i>	Força Gravitacional
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GIPL	Fosfolípido Glicoinositol
IFN- γ	Interferon-gamma
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IPTG	Isopropiltio- β -galactosídeo
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolissacarídeo
LNP	Nanopartícula lipídica
M	Molar
mA	Miliampère
MASP	Proteínas de superfície associadas à mucinas
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
mRNA	RNA mensageiro

MyD88	Fator de diferenciação mielóide 88
nm	Nanômetro
NK	<i>Natural killer</i>
OD	Densidade óptica
ODN	Oligodesoxinucleotídeo
PAMP	Padrão molecular associado a patógeno
pb	Par de bases
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PBS-T	<i>Phosphate-Buffered Saline tween</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
PRR	Receptor de reconhecimento de padrão
qPCR	PCR quantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
SAPA	<i>Shed acute parasite antigen</i>
SDS-PAGE	Duodecil sulfato de sódio
Th1	Resposta auxiliadora do tipo 1
Th2	Resposta auxiliadora do tipo 2
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
TS	Trans-sialidase
UTR	<i>Untranslated region</i>
V	Voltagem
v/v	volume/volume
VLP	Partículas semelhantes a Vírus
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar
μ m	Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 O <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas	16
1.2 Resposta imune na infecção pelo <i>T. cruzi</i>	19
1.3 As Trans-sialidases e outras proteínas do <i>T. cruzi</i> contendo repetições de aminoácidos	20
1.4 Estratégias para o desenvolvimento de vacinas contra doença de Chagas	25
2 OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo geral	31
2.2 Objetivos específicos	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 Análise <i>in silico</i> dos genes codificadores de TS contendo repetições SAPA no genoma do clone CL Brener	32
3.2 Clonagem e digestão dos plasmídeos contendo um gene codificador de Trans-sialidase e suas versões truncadas	32
3.3 Transformação bacteriana em <i>E. coli</i>	32
3.4 Indução da expressão das proteínas recombinantes	33
3.5 Teste de solubilidade das proteínas recombinantes	33
3.6 Purificação das proteínas recombinantes	34
3.7 Diálise, remoção de LPS e quantificação das proteínas recombinantes	35
3.8 Animais experimentais	35
3.9 Imunização com as proteínas recombinantes	36
3.10 Imunização com as proteínas recombinantes e desafio com uma cepa virulenta de <i>T. cruzi</i>	36
3.11 <i>Western blot</i> das proteínas recombinantes purificadas	37
3.12 Dosagem de anticorpos por ELISA	37
3.13 Cultura de esplenócitos e dosagem de citocinas	38
3.14 Análise histopatológica	39
3.15 Parasitismo tecidual	39
3.16 Clonagem da sequência da TS sem repetições SAPA no vetor de expressão em mamíferos	40
3.17 Transcrição <i>in vitro</i> e transfecção em células HEK293T e HeLa	40
3.18 Preparo dos extratos celulares e <i>western blot</i>	41

3.19 Análise estatística	42
4 RESULTADOS.....	43
4.1 Caracterização dos genes codificadores das trans-sialidases contendo repetições SAPA presentes no genoma do clone CL Brener de <i>T. cruzi</i>	43
4.2 Caracterização de clones contendo um gene codificador de trans-sialidase e suas versões truncadas.....	44
4.3 Indução da expressão das proteínas recombinantes em <i>E. coli</i>	46
4.4 Teste de solubilidade das proteínas recombinantes	47
4.5 Purificação das proteínas recombinantes	48
4.6 Imunização de animais com a TS e seus diferentes domínios e avaliação da resposta imune.....	49
4.6.1 Análise da reposta imune humoral	50
4.6.2 Análise da resposta imune celular.....	52
4.7 Imunização com as diferentes proteínas recombinantes e desafio com uma cepa virulenta do <i>T. cruzi</i>	54
4.7.1 Análise da parasitemia e sobrevivência dos animais desafiados	54
4.7.2 Histopatologia e parasitismo tecidual	55
4.8 Síntese de mRNA codificando TS sem repetições SAPA	57
4.9 Análise da expressão da TS sem repetições SAPA em células mamíferas transfectadas com mRNA.....	59
5 DISCUSSÃO	60
6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 O *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é uma doença considerada potencialmente fatal, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Atualmente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que há em torno de 8 milhões de pessoas infectadas no mundo pelo parasito, sendo a América Latina a principal área de ocorrência da doença. Porém, nos últimos anos, devido aos deslocamentos globais e migrações, a doença vem se espalhando para outros continentes (WHO, 2023).

A transmissão do protozoário acontece, principalmente, por triatomíneos infectados (popularmente conhecidos como barbeiros), por meio de suas fezes e urina. As espécies *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata*, se destacam na transmissão do parasito. Esses insetos costumam habitar rachaduras de casas mal construídas em áreas rurais e suburbanas, onde se escondem durante o dia e tornam-se ativos à noite, momento em que se alimentam de sangue humano. Ao sugar o sangue do hospedeiro vertebrado, picam em áreas expostas da pele e defecam próximo ao local da picada. Dessa maneira, no momento em que o indivíduo coça a região da picada, ele espalha os parasitos que podem penetrar pelo orifício gerado pela picada do inseto. Além dessa forma, o protozoário também pode ser transmitido por meio de transplantes de órgãos, verticalmente (mãe para filho), por alimentos contaminados e por acidentes de trabalho (JUNQUEIRA *et al.*, 2010; RASSI E MARIN-NETO, 2010).

O ciclo de vida do *T. cruzi* é tão complexo quanto de outros tripanosomatídeos, apresentando três estágios de desenvolvimento principais nos hospedeiros vertebrados e invertebrados: tripomastigotas, epimastigotas e amastigotas. Como mostrado na figura 1, o ciclo se inicia durante o repasto sanguíneo do triatomíneo infectado, por meio de sua urina e fezes contaminadas, contendo as formas tripomastigotas metacíclicas, que irão penetrar o hospedeiro vertebrado pelo local da picada ao coçar a pele, ou diretamente por meio de uma membrana mucosa, alcançando células subjacentes. Após invadirem as células no sítio de inoculação (por exemplo, fibroblastos, macrófagos e células epiteliais), as tripomastigotas metacíclicas são internalizadas num compartimento chamado vacúolo parasitóforo

onde, posteriormente, se diferenciam em amastigotas e escapam para o citosol. No citosol, as formas amastigotas se replicam por fissão binária e, após alguns ciclos, se diferenciam nas formas tripomastigotas que são liberadas na corrente sanguínea após o rompimento da célula. Essas tripomastigotas presentes na corrente sanguínea podem infectar outras células ou serem ingeridas pelo inseto triatomíneo. No estômago do inseto, as formas tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas, que são as formas replicativas no hospedeiro invertebrado. Essas formas migram para o intestino médio, onde se dividem por fissão binária e, logo após, na região posterior do intestino e no reto, essas epimastigotas se transformam em tripomastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes, sendo liberadas junto com a urina e fezes do inseto, reiniciando o ciclo de vida do *T. cruzi* (DE SOUZA, DE CARVALHO E BARRIAS, 2010; FERNANDES E ANDREWS, 2012).

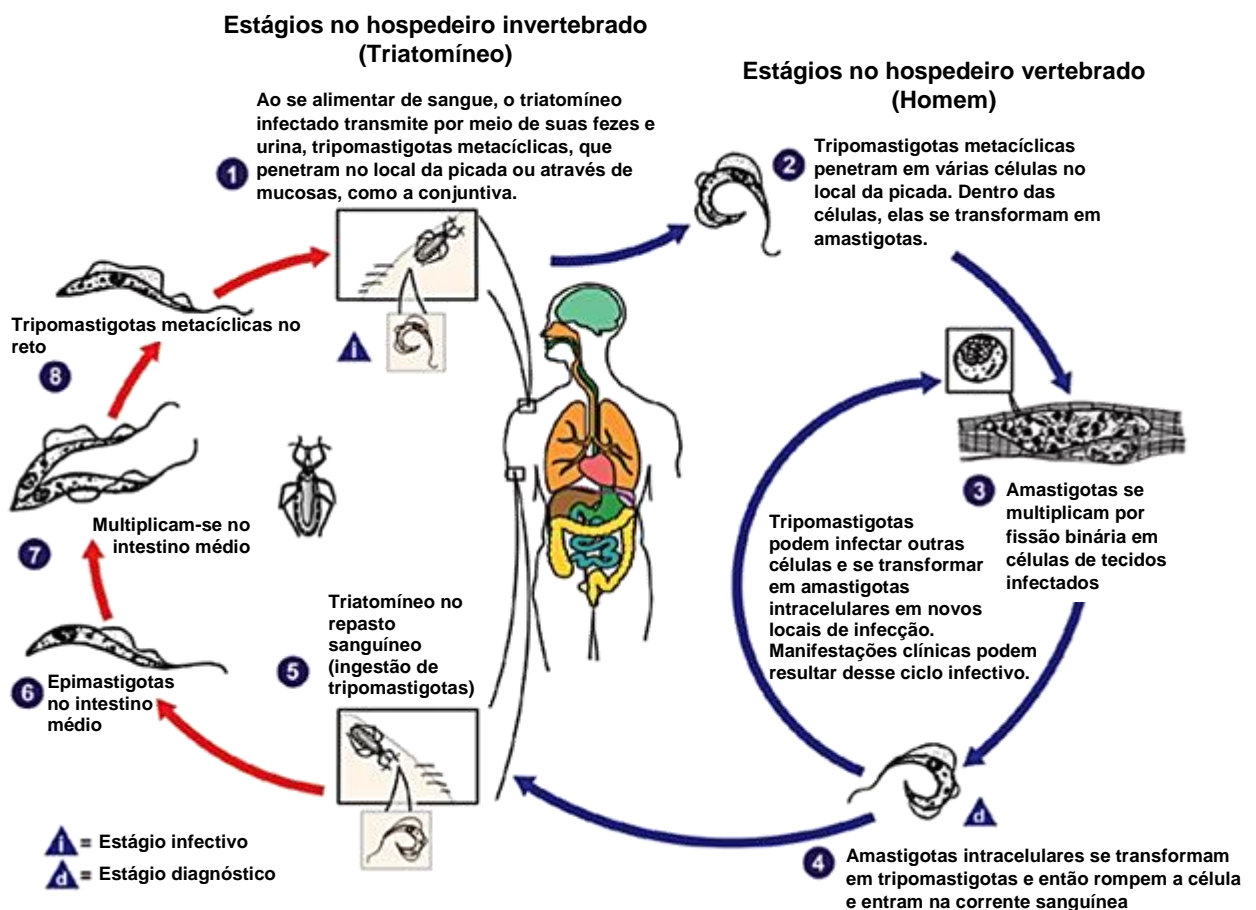


Figura 1: Representação do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Adaptado de Clayton (2010).

A doença de Chagas pode ser dividida em duas fases, aguda e crônica. Após um período de incubação em torno de 2 a 3 semanas, a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* é observada pela alta parasitemia e parasitismo tecidual, além de ser acompanhada por uma excessiva ativação do sistema imune. Essa fase também é caracterizada por ser, na maioria dos casos, assintomática, podendo haver sintomas leves em alguns indivíduos e, nos casos de transmissão oral, ocorre a presença de sintomas graves como cardiomiopatia. Na fase crônica, a parasitemia e o parasitismo tecidual são mantidos em baixos níveis, em decorrência da forte resposta imune gerada. Inicialmente, nessa fase, a infecção é assintomática na maior parte dos pacientes. Contudo, com o avanço da doença, alterações cardíacas ou gastrointestinais podem se manifestar (JUNQUEIRA *et al.*, 2010).

Na fase aguda, o diagnóstico pode ser realizado por meio da demonstração do parasito no sangue, devido à alta parasitemia nessa fase. Entretanto, na fase crônica, há uma queda da parasitemia e parasitismo tecidual, em que métodos sorológicos como, hemaglutinação indireta (HAI), imunofluorescência indireta (IFA), e ensaios de ELISA, são empregados no diagnóstico da doença, devido a presença de altos níveis de anticorpos contra o *T. cruzi* (CANÇADO, 1999). A ocorrência de reações cruzadas com outros protozoários, principalmente com *Leishmania* sp., podem acontecer nos exames sorológicos, tornando necessário a pesquisa de antígenos mais específicos, a fim de se obter um diagnóstico mais sensível e específico (JUNQUEIRA, 2008).

Uma vez que não existe vacina para a doença de Chagas, o controle dos insetos vetores ainda é o método mais eficaz para prevenir a disseminação na América Latina. Por esse motivo, a realização de exames diagnósticos em transfusões e transplantes também precisam ser reforçados. Além disso, surtos recentes por ingestão de alimentos contaminados são uma das principais formas de transmissão da doença de Chagas no Brasil, especialmente na região amazônica (SANGENIS *et al.*, 2016). Os medicamentos Benzonidazol e Nifurtimox são os únicos com eficácia comprovada para tratar a doença de Chagas. Essas drogas são eficazes tanto na fase aguda da doença quanto na fase crônica, porém produzem sérios efeitos colaterais (CANÇADO, 1999; WHO, 2023). Diante disso, é essencial entender os mecanismos utilizados pelo parasito para estabelecer a infecção e evadir a resposta imune do hospedeiro, sendo assim possível desenvolver estratégias vacinais para a doença de Chagas.

1.2 Resposta imune na infecção pelo *T. cruzi*

No início da infecção pelo *T. cruzi*, a imunidade inata desempenha um papel crucial no controle da replicação do parasito, no qual suas células, tais como macrófagos, células dendríticas e células *natural killer* (NK), irão produzir citocinas como IL-12, TNF- α , IFN- γ e moléculas efetoras, que são elementos importantes no controle da infecção. Além disso, as células dendríticas atuam na ligação entre a imunidade inata e a adquirida por meio da produção de IL-12, que é essencial para a diferenciação e expansão clonal das células T *helper* 1 (Th1) CD4⁺ e CD8⁺, e também de células B (JUNQUEIRA *et al.*, 2010).

Os receptores *Toll-like* (TLR) são mediadores da imunidade inata, que são capazes de reconhecer e responder à padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), permitindo o recrutamento de fagócitos para o tecido infectado, tendo como objetivo o controle e até mesmo a eliminação desses microrganismos (HEMMI *et al.*, 2000). No caso do *T. cruzi*, esses receptores exercem o papel de mediadores centrais da ativação do sistema imune inato, acionando vias dependentes de MyD88 e TRIF como proteínas adaptadoras transdutoras dos sinais recebidos pelos TLRs. Proteínas tipo mucinas ancoradas por Glicosilfosfatidilinositol (GPI) e Fosfolípido Glicoinositol (GIPL) contendo ceramida em sua composição, por exemplo, são agonistas para o heterodímero TLR2-TLR6 e TLR-4, respectivamente, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos. O DNA genômico do parasito também desempenha um papel na resposta pró-inflamatória durante a infecção, ativando macrófagos e células dendríticas por meio de DNA não metilado contendo domínios CpG, reconhecidos por TLR-9 (JUNQUEIRA *et al.*, 2010).

Segundo diferentes estudos, a resposta Th1 é crucial no controle da infecção pelo *T. cruzi* por meio da ativação de células T CD8⁺. Essa proteção é devida principalmente pela produção de IFN- γ por essas células, que ativa mecanismos microbicidas dos macrófagos, causando a destruição de parasitos fagocitados, e da sua atividade citotóxica, causando a destruição de células contendo as formas intracelulares do parasito. Por outro lado, os anticorpos produzidos pelas células B são direcionados para a lise dos parasitos extracelulares e favorecem a fagocitose de parasitos opsonizados (JUNQUEIRA *et al.*, 2010). A relação do papel das células T CD8⁺ na imunidade do *T. cruzi* foi corroborada por resultados de estudos, no qual demonstraram que a depleção dessas células em camundongos e a deficiência de β -

2 microglobulina, que é um componente do MHC classe I e importante para apresentação de antígenos para células T CD8⁺, aumentam a susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi* (TARLETON, 1990; TARLETON *et al.*, 1992). Um esquema da resposta imune na infecção pelo *T. cruzi* é mostrado na figura 2.

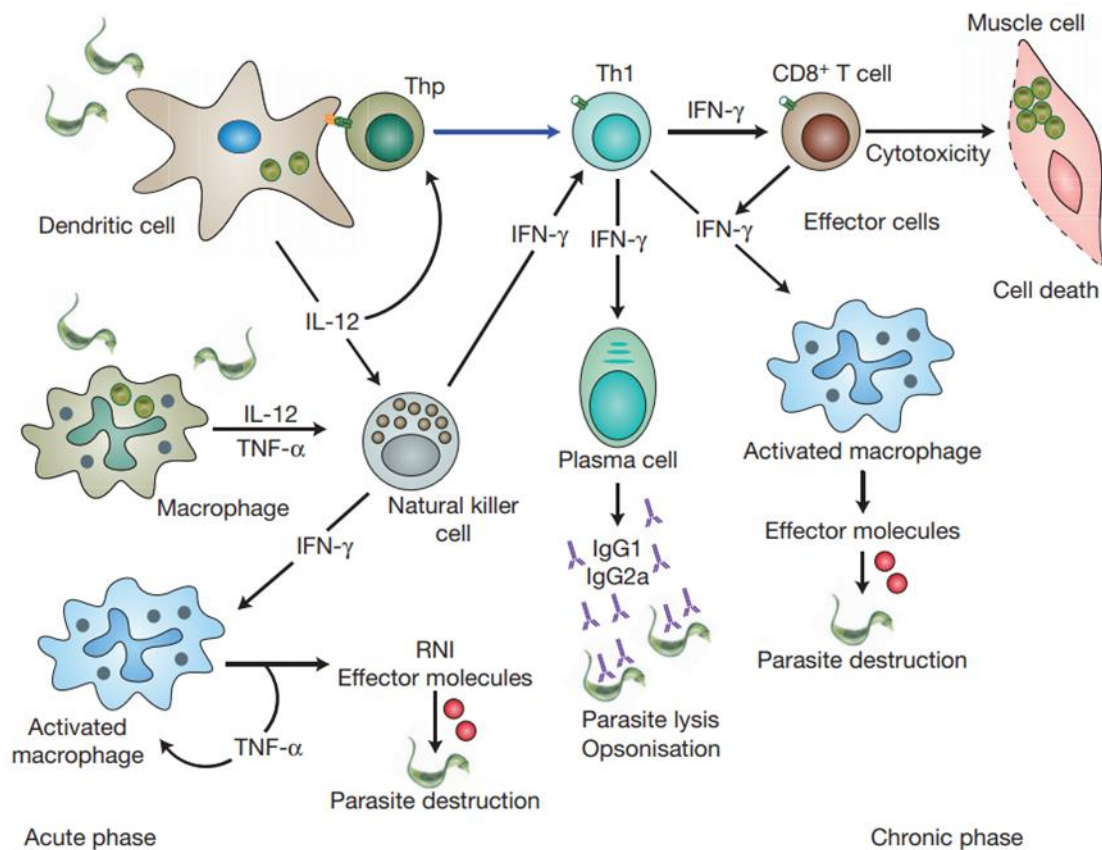


Figura 2: Representação esquemática da resposta imunológica durante a infecção pelo *T. cruzi*. Citocinas e células envolvidas na resposta imune ao protozoário *T. cruzi*. Fonte: Junqueira *et al.* (2010).

1.3 As Trans-sialidasas e outras proteínas do *T. cruzi* contendo repetições de aminoácidos

Sequências codificadoras de proteínas contendo regiões conservadas de repetições de aminoácidos estão presentes de maneira abundante no genoma dos agentes causadores da malária, leishmaniose e tripanossomíase (BUSCAGLIA *et al.*, 1999). Estudos compararam proporções de repetições no proteoma de parasitos extracelulares, intracelulares e protozoários de vida livre, e foi observado uma maior proporção destas repetições nos parasitos intracelulares. Isso indica que essas repetições teriam como função a modulação do sistema imune, favorecendo a

infecção pelo parasito e evasão do mesmo ao sistema imune do hospedeiro (MENDES *et al.*, 2013).

O nosso grupo realizou um *imunoscreeening*, a partir de uma biblioteca de cDNA de formas amastigostas do *T. cruzi*, utilizando soro de pacientes com doença de Chagas, a fim de identificar proteínas do parasito alvos da reposta imune. Dentre essas proteínas, as ribossômicas foram as mais detectadas, e verificou-se que 70% das proteínas reconhecidas pelo soro de pacientes com doença de Chagas continham repetições de aminoácidos, como pode ser observado na figura 3 (DAROCHA *et al.*, 2002). Estudos com uma das proteínas contendo repetições identificadas nesse *imunoscreeening*, a TcL7a, indicaram que o motivo repetitivo modula negativamente a resposta imune, visto que causou uma exacerbação da parasitemia e morte dos animais desafiados com uma cepa virulenta de *T. cruzi*, após a imunização com a porção repetitiva. Além disso, a imunização com o antígeno contendo somente esse motivo causou uma redução na resposta humoral contra antígenos do *T. cruzi* e inibiu a proliferação de células B estimuladas por ativadores policlonais (PAIS *et al.*, 2008; TORO *et al.*, 2017).

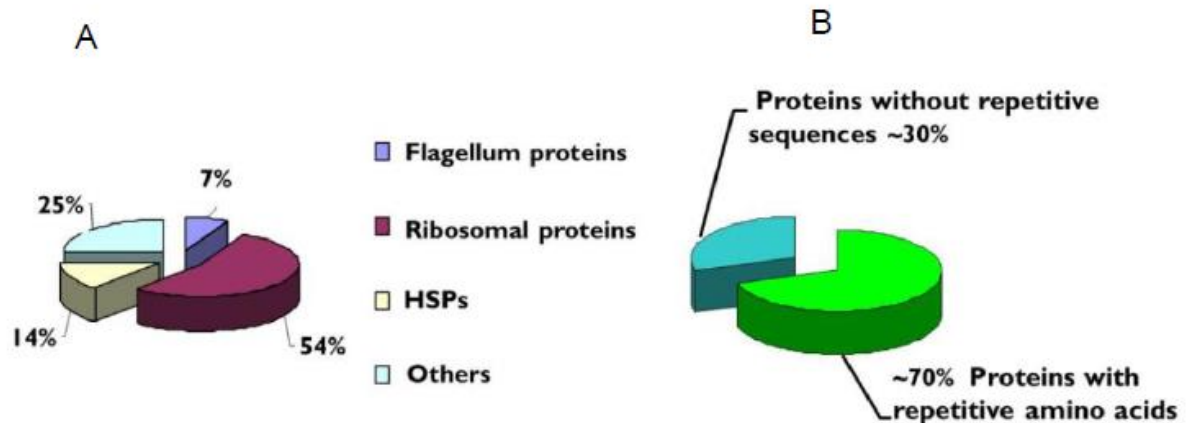


Figura 3: Imunoscreening de uma biblioteca de cDNA de formas amastigotas do *T. cruzi* após incubação com soro de pacientes com doença de Chagas. 50 clones reagiram e foram caracterizados, determinando parcialmente sua sequência: (A) 54% destes clones pertencem a proteínas ribossômicas e (B) 70% são compostos de repetições de aminoácidos. Fonte: Darocha *et al.* (2002).

Dentre as proteínas que contém sequências repetitivas de aminoácidos do *T. cruzi*, que desempenha um papel de grande importância biológica para o parasito, destacam-se as trans-sialidases (TS) (BUSCAGLIA *et al.*, 2006). As trans-sialidases são proteínas expressas na superfície desse parasito e são codificadas por uma família multigênica do *T. cruzi*, havendo mais de 1400 cópias de genes de TS no genoma do clone CL Brener (EL SAYED *et al.*, 2005). Em 2011, Freitas e colaboradores classificaram as trans-sialidases em 8 grupos, como mostrado na figura 4. O motivo VTVxNVxLYNR é conservado em todos os membros dos grupos, o que o torna uma assinatura das trans-sialidases. Além disso, a grande maioria dos membros possuem sequência de peptídeo sinal e sinal de adição de âncora GPI. No grupo I, encontram-se as TS ativas, que possuem atividade catalítica, enquanto que a grande maioria dos genes de TS codificam proteínas sem atividade enzimática (TS inativas). A principal característica de uma TS ativa é a presença do aminoácido tirosina na posição 342, enquanto que as TS inativas possuem uma mutação que gera a troca para uma histidina na mesma posição.

A respeito dos outros grupos de TS, o grupo II compreende as glicoproteínas de superfície GP85, como ASP-1, ASP-2, TSA-1 e GP82, que são expressas em tripomastigotas e estão relacionadas aos processos de adesão e invasão. O grupo III é capaz de inibir o sistema complemento, protegendo o *T. cruzi* da lise, e tem como membro o gene FL160. O grupo IV tem como representante a sequência TsTc13 e não apresenta ainda função conhecida. Os grupos V a VIII possuem a sequência gênica identificada no genoma, porém sua função ainda permanece desconhecida (FREITAS *et al.*, 2011; CALLEJAS-HERNANDEZ *et al.*, 2018; HERREROS-CABELLO *et al.*, 2020).

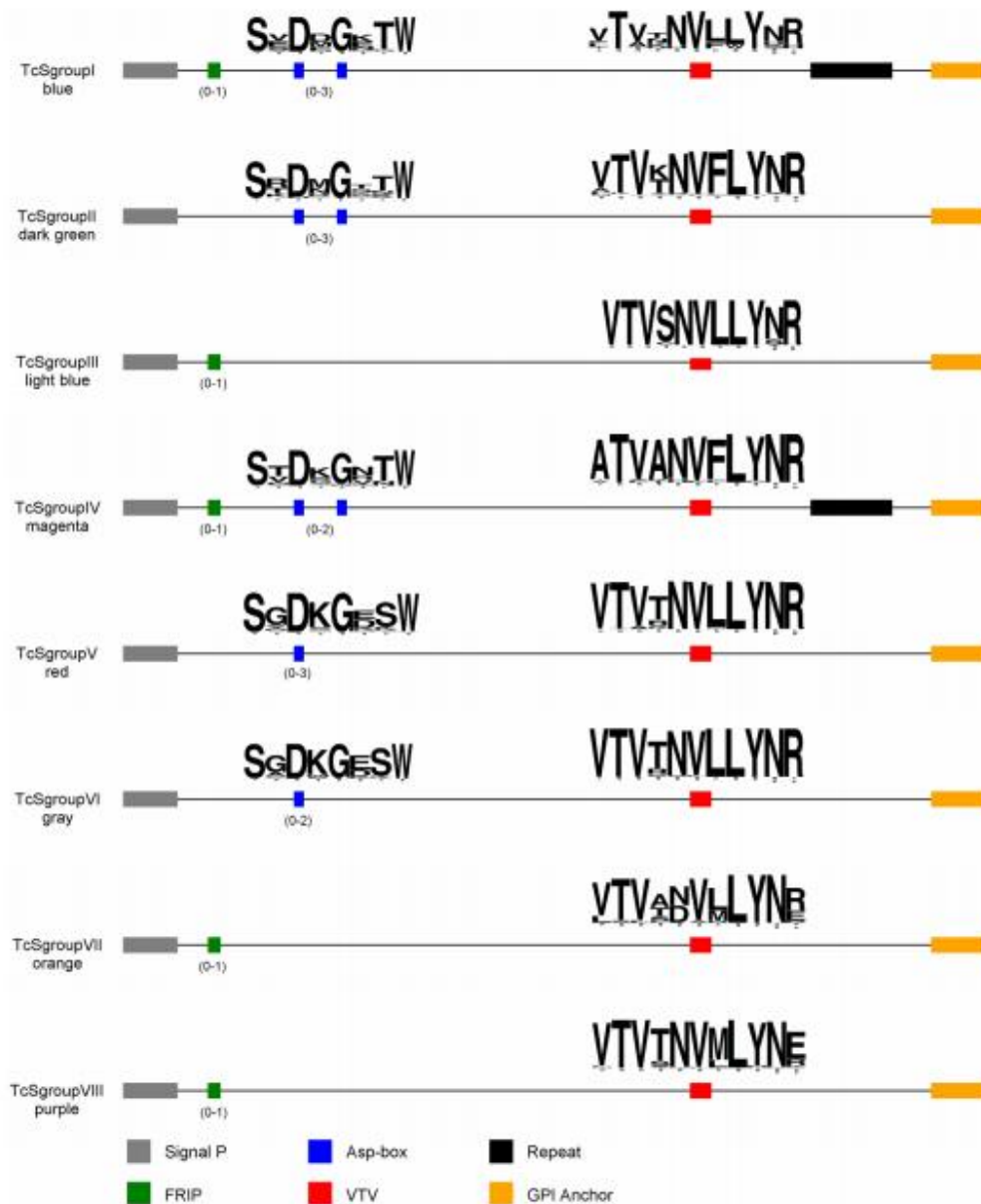


Figura 4: Classificação das TS em oito grupos. A figura mostra os diferentes motivos que podem ser encontrados na maioria dos membros de cada grupo: peptídeo sinal (cinza), motivo Asp-box (azul), sequências repetitivas de aminoácidos (preto), motivo FRIP (verde), motivo característico das TS VTVxNVxLYNR (vermelho) e sinal para adição da âncora GPI (amarelo). Fonte: Freitas *et al.* (2011).

As TS ativas têm como função transferir resíduos de ácido siálico de glicoconjugados do hospedeiro para mucinas na superfície do parasito. Uma vez que esse parasito é incapaz de sintetizar ácido siálico, a atividade de TS foi relacionada à capacidade de evasão do parasito ao sistema imune do hospedeiro (figura 5) (DC-RUBIN E SCHENKMAN, 2012). Essa sialilação proporcionada pelas TS ativas, estaria ligada a processos como a resistência do parasito ao sistema complemento e à proteção das formas tripomastigotas à lise por anticorpos anti- α -gal, que são induzidos

pelo epítipo imunodominante α -gal das mucinas, permitindo a lise do parasito (TOMLINSON *et al.*, 1994; PEREIRA-CHIOCCOLA *et al.*, 2000). Além disso, como foi visto por Freire-de-Lima e colaboradores (2010), a TS prejudica a resposta imune por meio da re-sialilação de células T CD8+, que são células fundamentais no controle da infecção pelo parasito. Contudo, o nosso grupo observou por meio da obtenção de parasitos nocautes para TS ativas utilizando CRISPR/Cas9, que a ausência de ácido siálico na superfície desses mutantes, não afetou a sua resistência ao sistema complemento, bem como não houve alteração dos epítipos α -gal. Os dados do nosso grupo também indicam que as TS ativas não estariam envolvidas na etapa de invasão da célula hospedeira, como havia sido apontado na literatura, mas sim nas etapas finais do desenvolvimento intracelular do parasito, como a diferenciação de amastigotas em tripomastigotas e a saída do parasito da célula hospedeira (BURLE-CALDAS *et al.*, 2022). Portanto, essa enzima é caracterizada por ser um importante fator de virulência do *T. cruzi*.

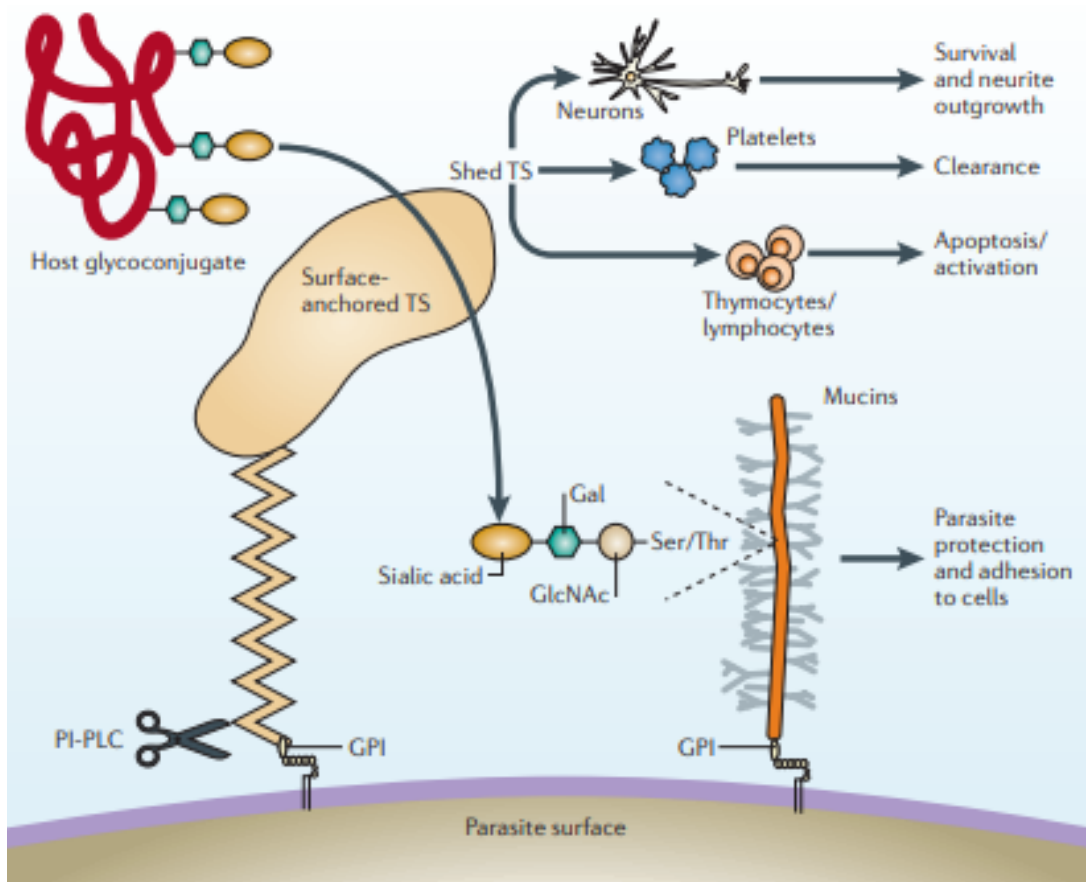


Figura 5: Atividade da trans-sialidase em tripomastigotas do *T. cruzi*. TS transfere resíduos de ácido siálico de glicoproteínas do hospedeiro para mucinas na superfície do parasito. Fonte: Buscaglia *et al.* (2006).

A estrutura das trans-sialidases ativas consiste de um domínio catalítico N-terminal, e algumas delas possuem repetições em *tandem* de 12 aminoácidos na porção C-terminal. Essas repetições são denominadas SAPA (*shed acute parasite antigen*) e são compostas pelos aminoácidos DSSAH(S/G)TPSTP(A/V), que se repetem em número variável de vezes, porém não é requerido para atividade catalítica das TS ativas (PARODI *et al.*, 1992). As formas epimastigotas expressam a enzima TS, porém não possuem repetições SAPA, nem são ancoradas por âncora GPI, ao contrário do que ocorre nas formas tripomastigotas (FRASCH, 2000; DC-RUBIN E SCHENKMAN, 2012). Além de ser altamente imunogênico, o domínio SAPA aumenta a estabilidade da enzima na corrente sanguínea, sugerindo que o domínio de repetição pode contribuir para a virulência do parasito (BUSCAGLIA *et al.*, 1999). Segundo Frasch (2000), hipotetiza-se que uma forte resposta imune contra essas porções repetitivas, desvie a resposta imune de alvos mais importantes do parasito, no caso a porção catalítica da TS ativa, impedindo que haja a neutralização da enzima e assim inibindo a infecção pelo parasito. Proteínas recombinantes contendo múltiplos epítomos imunodominantes foram avaliadas com alta especificidade para o diagnóstico de doença de Chagas (DUTHIE *et al.*, 2016). Além disso, como já foi visto, o *T. cruzi* possui um repertório notável de antígenos contendo repetições de aminoácidos, no qual muitas dessas repetições funcionam como alvo do sistema imune, podendo ser utilizadas como potenciais indicadores da infecção pelo parasito em testes diagnósticos (PAIS *et al.*, 2008). Desse modo, estudos que esclareçam o papel dessas repetições durante a infecção pelo *T. cruzi* e sua atuação sobre o sistema imune do hospedeiro ainda são essenciais.

1.4 Estratégias para o desenvolvimento de vacinas contra doença de Chagas

Ao longo dos anos, uma grande variedade de formulações vacinais foram elaboradas para a prevenção da doença de Chagas. Dado o conhecimento discutido sobre a resposta imune contra o *T. cruzi*, uma vacina bem-sucedida é vislumbrada para provocar uma resposta com anticorpos líticos, de perfil Th1 e com a ação de linfócitos T citotóxicos (RIOS *et al.*, 2019). Dentre as estratégias utilizadas, apresentam-se as formulações com parasitos inteiros mortos ou atenuados, proteínas purificadas ou recombinantes, vetores virais e vacinas de DNA (QUIJANO-HERNANDEZ E DUMONTEIL, 2011).

As primeiras tentativas para a produção de uma vacina profilática, foi utilizando parasitos inteiros mortos por métodos químicos, físicos ou de irradiação, ou frações subcelulares (flagelar, solúvel ou frações da membrana do parasito) em vários modelos de animais. Embora o *T. cruzi* tratado quimicamente não conferiu proteção contra infecção letal, outros tratamentos geraram um grau de resistência ao *T. cruzi* e uma alta porcentagem dos animais imunizados sobreviveram à infecção aguda (revisado por BHATIA *et al.*, 2009; VAZQUEZ-CHAGOYAN *et al.*, 2011; RODRIGUEZ-MORALES *et al.*, 2015).

As vacinas de parasitos vivos atenuados gerados por meio do tratamento com agentes farmacológicos ou por passagem em série em culturas, também foram testados em relação à sua potência em experimentos animais (SANCHEZ-VALDEZ *et al.*, 2015). Atualmente, com o avanço da técnica de CRISPR e outras tecnologias de edição gênica, recentes estudos focaram na utilização de nocautes geneticamente modificados do *T. cruzi* em um ou mais genes de virulência como vacinas vivas (QUIJANO-HERNANDEZ E DUMONTEIL, 2011). Por exemplo, o nosso grupo demonstrou que animais BALB/c imunizados com parasitos nocautes para o gene das TS ativas gerados por CRISPR-Cas9, foram totalmente protegidos após o desafio com uma cepa virulenta do *T. cruzi*, além de exibirem uma resposta com o perfil Th1 (BURLE-CALDAS *et al.*, 2022). Em geral, essas formulações vacinais com parasitos vivos foram extensamente eficazes no controle da infecção do desafio, em que os animais vacinados exibiram baixa parasitemia e altas taxas de sobrevivência em comparação com os animais não imunizados (QUIJANO-HERNANDEZ E DUMONTEIL, 2011). Contudo, essa estratégia utilizando parasitos vivos atenuados para a formulação de uma vacina tem como obstáculo questões de segurança importantes. Além de poder ocorrer, em raríssimos casos, a reversão para o tipo virulento, essas vacinas podem desencadear uma infecção completa e doença em indivíduos imunocomprometidos (SANCHEZ-VALDEZ *et al.*, 2015).

Vários trabalhos utilizaram uma abordagem de imunização usando subunidades proteicas para testar o potencial vacinal dos antígenos do *T. cruzi* (WIZEL *et al.*, 1997; LOW *et al.*, 1998; SERNA *et al.*, 2014). Os antígenos mais promissores testados incluem a cruzipaína, principal protease de cisteína lisossômica; Tc52, uma glutational S-transferase altamente conservada; proteínas paraflagelares; Tc24, proteína de ligação ao cálcio flagelar; glicoproteínas como GP82, GP90 e GP72; e várias proteínas da superfamília das trans-sialidasas, como TSA-1, TS, ASP-1 e

ASP-2. Todos esses antígenos conferiram uma proteção significativa em uma variedade de modelos de animais quando administrados com oligodesoxinucleotídeos CpG (CpG ODN) como adjuvantes (QUIJANO-HERNANDEZ E DUMONTEIL, 2011).

Dentre os antígenos citados, se destaca o promissor potencial das formulações contendo proteínas da família das trans-sialidasas. Hoft e colaboradores (2007) demonstraram que a vacinação intranasal de uma TS recombinante mais CpG foi capaz de induzir ambas células T CD4⁺ Th1 e T CD8⁺, aumentando a produção de IFN- γ pelos animais imunizados, além de conferir total proteção dos animais imunizados e posteriormente desafiados. Outro estudo com uma cepa atenuada de *Leishmania major* expressando TS recombinante, induziu a células T específicas para TS e respostas de anticorpos, conferindo uma maior sobrevivência aos animais imunizados após um subsequente desafio com uma dose letal de cepa virulenta do *T. cruzi*. Essa cepa atenuada de *L. major* expressando antígenos de *T. cruzi*, poderia desempenhar um papel como vacina dupla contra ambos parasitos, uma vez que são duas doenças infecciosas de importância global com notável sobreposição geográfica (CAI *et al.*, 2022). Fontanella e colaboradores (2008) também desenvolveram um candidato vacinal utilizando um mutante de TS, que era deficiente para atividade enzimática e sem repetições SAPA. Esse mutante apresentou uma ótima proteção aos animais imunizados e desafiados com a cepa Tulahuen de *T. cruzi*, conferindo 100% de sobrevivência e preveniu o desenvolvimento de dano tecidual, principalmente no miocárdio. Apesar disso, os animais imunizados e desafiados com essa TS recombinante exibiram inflamação tecidual no músculo esquelético e cardíaco, moderada esplenomegalia e alterações no hematócrito.

As vacinas de DNA e vetores virais recombinantes também têm sido formuladas amplamente utilizando vários desses antígenos do *T. cruzi*, já que essas formulações podem ser mais eficazes do que com as proteínas recombinantes na indução de uma resposta imune do tipo Th1 com células T CD8⁺ citotóxicas. Essas vacinas levaram a uma grande proteção contra infecção pelo *T. cruzi*, conforme demonstrado por uma queda na parasitemia e um aumento na sobrevivência dos animais (QUIJANO-HERNANDEZ E DUMONTEIL, 2011). Dentre os vetores virais mais utilizados estão o adenovírus e o vírus vaccinia, possuindo a vantagem de atuar como adjuvante natural pela presença de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) que recrutam e ativam APCs por meio da estimulação de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) (BIVONA *et al.*, 2020). Os genes

das TS induzem principalmente células do tipo Th1, mas também induzem células do tipo Th2 (PEREIRA-CHIOCCOLA *et al.*, 1999; RODRIGUES *et al.*, 1999), sendo possível a coexistência desses dois perfis conforme verificado em modelos de vacina de DNA com outros genes (MOR *et al.*, 1995; CHOW *et al.*, 1998). Em 2013, Barbosa e colaboradores usaram o adenovírus recombinante sorotipo 5 (Ad5) codificando a proteína de superfície de amastigota, ASP-2, e avaliaram a sua proteção imunizando camundongos C57BL/6 e C3H/HeJ. O protocolo de imunização provocou uma resposta robusta de células T CD8⁺ efetoras produzindo TNF- α , IFN- γ e uma alta mobilização do marcador de superfície CD107a, que indica atividade citolítica, e promoveu uma alta proteção contra o desafio com a cepa Y de *T. cruzi*.

As vacinas terapêuticas têm como princípio modular ou potencializar os múltiplos mecanismos efetores contra o *T. cruzi*, a fim de eliminar a persistência do parasito no hospedeiro infectado. As vacinas de DNA Tc52, TSA-1 e Tc24, quando aplicadas em camundongos após a infecção ou dentro de duas semanas após infecção, foram capazes de diminuir a parasitemia e a mortalidade da infecção (SANCHEZ-BURGOS *et al.*, 2007; DUMONTEIL *et al.*, 2004), o que foi relacionado a um rápido aumento induzido por vacina das células T CD4⁺ e CD8⁺ (ZAPATA-ESTRELLA *et al.*, 2006). As vacinas terapêuticas com ASP-2 e TS (individualmente ou em combinação como vacina de DNA) não limitaram a parasitemia e nem melhoraram a taxa de sobrevivência em camundongos infectados (SANCHEZ-BURGOS *et al.*, 2007; DUMONTEIL, 2007), apesar do fato de que esses antígenos exibiram excelente eficácia como vacina profilática.

Atualmente, com a pandemia causada pelo vírus SARS-CoV-2, que provoca a doença infecciosa COVID-19, várias vacinas foram produzidas contra esse vírus, conseguindo reduzir o número de pessoas infectadas e mortes, e espera-se que em breve essa doença pandêmica possa ser controlada. Duas dessas vacinas foram formuladas com base no RNA mensageiro (mRNA) da proteína Spike S (S) da superfície do vírus, que se liga ao receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), sendo o mesmo utilizado pelo vírus para entrar e infectar células do hospedeiro. Essas duas vacinas foram desenvolvidas, fabricadas e vendidas pela Moderna (Cambridge, MA, EUA) e Pfizer (Berlim, Alemanha) e provou ser uma das vacinas mais eficazes contra o vírus para prevenir novas infecções e morte de pacientes infectados. Ademais, estudos com formulações de mRNA contra protozoários, como *Leishmania donovani* e *Plasmodium berghei*, demonstraram

proteção ao desafio e indução de uma resposta imune eficaz (DUTHIE *et al.*, 2018; MALLORY *et al.*, 2021). As vacinas baseadas em RNA mensageiro apresentam várias vantagens, pois são mais rápidas e baratas de produzir, e mais seguras tanto para as pessoas que as produzem quanto para o paciente por não utilizarem os vírus altamente infecciosos. Além disso, vacinas de mRNA não possuem potencial oncogênico via integração no DNA do hospedeiro, elas apenas precisam chegar ao citoplasma para serem traduzidas pelo ribossomo e, adicionalmente, o mRNA é mais imunogênico que o DNA (KRAMMER, 2020). O mRNA será entregue às células imunes ou não imunes, sendo traduzido no antígeno alvo e possibilitando a montagem de uma resposta adaptativa de células B e T. A figura 6 mostra as tecnologias vacinais que foram desenvolvidas nas últimas décadas.

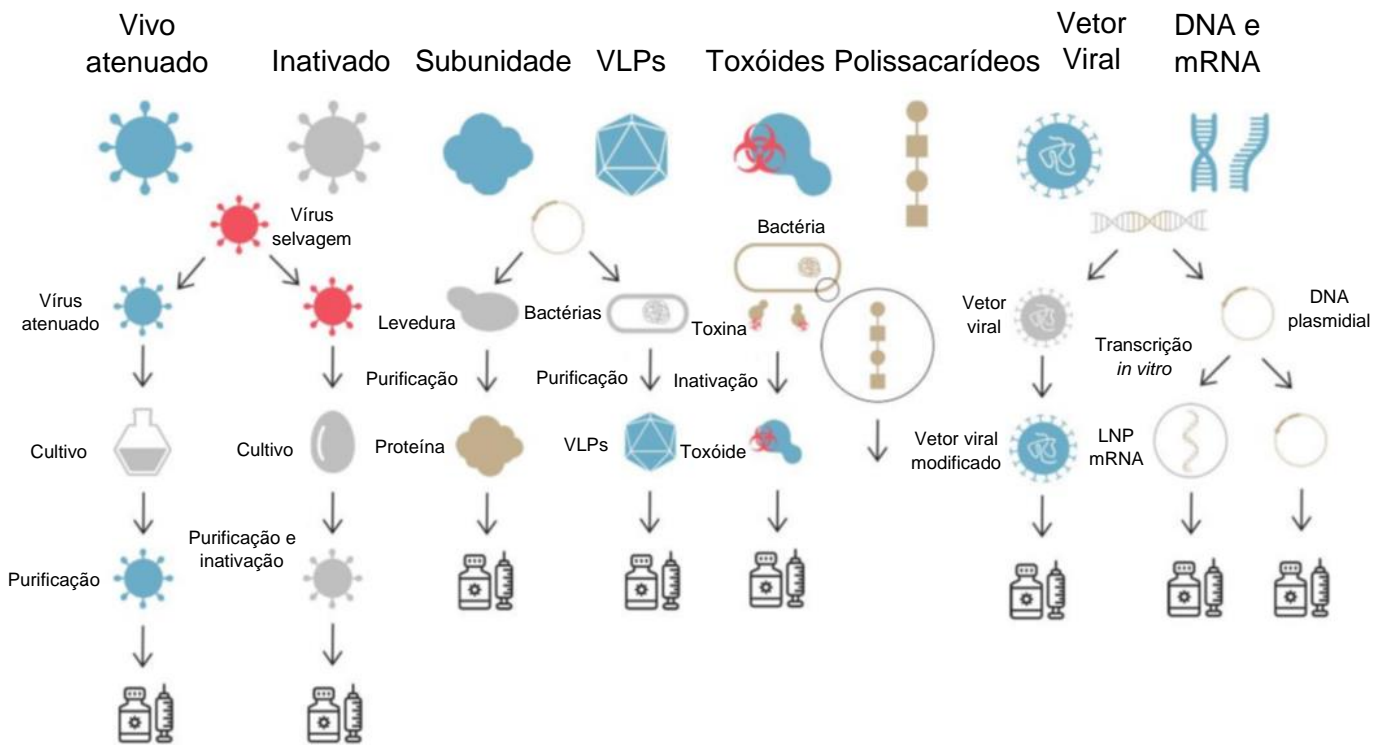


Figura 6: Gerações de vacinas e diferentes estratégias de desenvolvimento utilizadas atualmente. VLP (Partículas semelhantes a Vírus); LNP (Nanopartícula). Adaptado de Vuitika *et al.* (2022).

Os dados do nosso grupo bem como de outras pesquisas descritas na literatura indicam que a TS é um antígeno promissor para a elaboração de um modelo vacinal. Ademais, em nenhum dos estudos descritos envolvendo o uso das TS, foi investigado se a presença das repetições SAPA teria um papel protetor ou associado à virulência

quando a TS é utilizada como imunógeno. Sendo assim, o presente trabalho testou diferentes versões de uma Trans-sialidase de *T. cruzi* como antígenos protetores na infecção para a formulação de um modelo vacinal para doença de Chagas. Além disso, tendo em vista as vantagens das vacinas de mRNA citadas acima, a versão de TS que conferiu maior proteção em nossos experimentos de imunização com proteínas, foi utilizada como estratégia para o desenvolvimento de uma vacina baseada em mRNA contra *T. cruzi* para controlar essa doença infecciosa.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Testar diferentes estratégias vacinais e diferentes versões da Trans-sialidase de *T. cruzi* como antígenos protetores para a doença de Chagas.

2.2 Objetivos específicos

- Produção em *E. coli* de uma Trans-sialidase do grupo I recombinante e suas versões truncadas, com ausência das repetições e com somente as repetições SAPA;
- Imunização de camundongos com as proteínas recombinantes purificadas e avaliação da resposta imune humoral e celular induzida por elas;
- Imunização de camundongos com as proteínas recombinantes e avaliação da parasitemia, sobrevivência, histopatologia e parasitismo tecidual após o desafio com uma cepa virulenta do *T. cruzi*;
- Síntese de mRNA codificando TS sem repetições SAPA por transcrição *in vitro* de seu RNA e análise de sua expressão por meio da transfecção em células HEK293T e HeLa.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Análise *in silico* dos genes codificadores de TS contendo repetições SAPA no genoma do clone CL Brener

Seis sequências de TS contendo repetições SAPA (5 classificadas como TS ativas e 1 como TS inativa) foram alinhadas usando o *software* MUSCLE e analisadas quanto à presença de domínios essenciais para a atividade enzimática dessa família, como a região FRIP, domínio Asp-box, motivo VTV, além da tirosina na posição 342. A predição dos motivos presentes nas sequências de aminoácidos da TS foi realizada usando a ferramenta MEME suite.

3.2 Clonagem e digestão dos plasmídeos contendo um gene codificador de Trans-sialidase e suas versões truncadas

Sequências de DNA de um gene codificador de Trans-sialidase (ID: Tc00.1047053509495.30) correspondentes à proteína completa (TS completa), sem o domínio de repetições (TS sem SAPA) e apenas com a porção repetitiva (TS-SAPA), foram amplificadas e clonadas no vetor de expressão pET-21a (Novagen). Esses plasmídeos, que contêm os insertos das três versões da proteína, foram cedidos gentilmente pela Dra. Nailma Silva Aprigio dos Santos. Para a confirmação da clonagem, foi realizada a digestão dos vetores com as enzimas de restrição XbaI e XhoI (Promega) e analisada em gel de agarose 0,8%.

3.3 Transformação bacteriana em *E. coli*

Bactérias BL21 *Star* (DE3) e SHuffle® T7, quimiocompetentes, foram transformadas com os plasmídeos contendo os diferentes insertos para TS. Para a transformação, aproximadamente 10 ng de plasmídeo foram incubados com as bactérias, durante 30 minutos em gelo e, em seguida, foi dado o choque térmico a 42 °C por 55 segundos. Após esse tempo, as bactérias foram mantidas no gelo por 2 minutos e posteriormente foram adicionados 400 µL de meio de cultura 2XYT (0,4 g triptona; 0,25 g extrato de levedura; 0,125 g NaCl) sem antibiótico e incubado a 37 °C por 1 hora sob agitação (180 rpm - C25 Incubator). Logo após, 200 µL do

transformado foram plaqueados em meio de cultura 2XYT contendo 1,5% de ágar e antibiótico de seleção ampicilina (100 µg/mL). As placas foram então incubadas a 37 °C *overnight* para o crescimento das bactérias que incorporaram o plasmídeo e adquiriram resistência ao antibiótico.

3.4 Indução da expressão das proteínas recombinantes

Para o procedimento de indução, foi utilizada uma colônia isolada de cada transformação ou clone congelado com os respectivos plasmídeos como pré-inóculo em 10 mL de meio 2XYT com ampicilina (100 µg/mL), ficando sob agitação de 180 rpm a 37 °C *overnight* ou até atingir a densidade óptica (OD) entre 0,4 - 0,6. Para o inóculo, foi realizada uma diluição de 1:100 do pré-inóculo, ou seja, foram adicionados 4 mL do pré-inóculo em 400 mL de meio 2XYT com ampicilina. O inóculo foi mantido a 37 °C sob agitação de 180 rpm até atingir a OD entre 0,4 - 0,6, sendo coletada uma alíquota de 1 mL antes da adição do IPTG para análise da fração não induzida. Posteriormente, foi adicionado 0,5 mM de IPTG à cultura, e a mesma foi mantida sob agitação de 180 rpm a 37 °C durante 4 horas ou *overnight* a 20 °C. Após o período de indução, foi realizada novamente a leitura da OD da cultura e uma alíquota proporcional à fração não induzida foi coletada para análise posterior em SDS-PAGE da fração induzida. As alíquotas coletadas para eletroforese em SDS-PAGE foram centrifugadas a 16.100 x *g* por 1 minuto, o sobrenadante foi descartado e os *pellets* ressuspendidos em 75 µL de água e 25 µL de tampão de amostra para proteína (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8; Glicerol 10%; SDS 2%; β-Mercaptoetanol 5%; Azul de bromofenol 0,00125%). Essas amostras foram aquecidas por 5 minutos a 95 °C e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. O restante da cultura foi centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* guardado em freezer -80 °C.

3.5 Teste de solubilidade das proteínas recombinantes

Após a confirmação da indução das proteínas recombinantes por SDS-PAGE, os *pellets* congelados, correspondentes à indução da TS completa, TS sem SAPA e TS-SAPA, foram ressuspendidos em tampão de ligação Histrap (20 mM de tampão fosfato, 500 mM de NaCl, 40 mM de Imidazol pH 7,5), contendo 1 mM de PMSF,

5 mM de DTT e 5 mM de Benzamidina. Esses foram lisados em homogeneizador EmulsiFlex-C3 (Avestin) de acordo com as instruções do fabricante. O produto da lise foi centrifugado a 40.000 x g a 4 °C durante 30 minutos até a clarificação do lisado, obtendo-se as frações solúvel (sobrenadante) e insolúvel (*pellet*). Para a eletroforese em SDS-PAGE, alíquotas das frações solúvel e insolúvel foram coletadas e adicionado tampão de amostra de proteína. O material foi aquecido a 95 °C por 5 minutos e aplicado em gel de poliacrilamida 10%. No caso da TS sem SAPA, cuja maior parte estava presente na fração insolúvel, a Dra Nailma Aprigio havia feito um teste com diferentes concentrações de ureia (2 M, 4 M e 8 M) dissolvida em tampão de ligação Histrap (20 mM de tampão fosfato, 500 mM de NaCl, 40 mM de Imidazol pH 7,5). Para isso, o *pellet* correspondente à fração insolúvel, obtido após a lise, foi ressuspenso nos tampões contendo as diferentes concentrações de ureia, partindo da menor para a maior concentração, verificando-se que a concentração de 8 M foi a melhor para solubilizar a proteína. Sendo assim, primeiramente foram feitas três lavagens do *pellet* utilizando o tampão de lavagem de corpos de inclusão (Ureia 4 M; Triton X-100 2%; Tris 10 mM; EDTA 1,6 mM; Glicerol 10%; pH 7,0), centrifugando à 40.000 x g por 10 minutos à 4 °C. Após isso, foi utilizada ureia a 8 M dissolvida em tampão de ligação para ressuspende o *pellet*. Este foi homogeneizado com pipeta e vórtex e posteriormente centrifugado a 40.000 x g por 30 minutos a 4 °C, até o sobrenadante ficar o mais solúvel possível para a purificação. Uma alíquota referente a fração insolúvel solubilizada com ureia foi coletada, tratada com tampão de amostra de proteína e submetida a eletroforese em SDS-PAGE.

3.6 Purificação das proteínas recombinantes

A purificação das proteínas recombinantes foi realizada por cromatografia de afinidade, utilizando coluna de níquel (Histrap, GE HealthCare). Para isso, após a lise, o sobrenadante ou o *pellet* ressuspenso em tampão de ligação contendo 8 M de ureia foram previamente filtrados em filtro 0,22 µm e purificados em colunas de níquel de 5 mL, sendo importante ressaltar que colunas novas e diferentes foram utilizadas para cada proteína. O aparelho utilizado foi o ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare) e o programa utilizado para a purificação foi configurado manualmente. Os tampões utilizados para a purificação foram o tampão de ligação Histrap (20 mM de tampão fosfato, 500 mM de NaCl, 40 mM de Imidazol pH 7,5) usado como tampão de lavagem,

e a eluição foi realizada utilizando o mesmo tampão com elevada concentração de imidazol (20 mM de tampão fosfato, 500 mM de NaCl, 500 mM de Imidazol, pH 7,5). No caso específico da proteína TS sem SAPA que se apresentou na fração insolúvel, 8 M de ureia foi adicionado aos tampões. Após purificação, alíquotas de 9 µL referentes às frações do pico de absorvância 280 nm de todas as purificações foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE.

3.7 Diálise, remoção de LPS e quantificação das proteínas recombinantes

As frações de cada proteína consideradas com um alto teor de pureza foram reunidas e dialisadas utilizando Amicon® Pro Purification System 10kDa (Millipore), a fim de remover o excesso de imidazol e, no caso da TS sem SAPA, remover o excesso de ureia. Sucessivas centrifugações foram feitas utilizando o tampão de ligação Histrap sem imidazol e, para a diálise da TS sem SAPA, adicionou-se 10% de glicerol e 10 mM de NaOH à solução, visto que o pH alcalino estabiliza a solubilidade dos corpos de inclusão, evitando sua precipitação durante o processo (CHURA-CHAMBI *et al.*, 2019). A remoção de LPS (Lipopolissacarídeo) foi feita utilizando o ToxinEraser™ Endotoxin Removal Kit (GenScript), segundo as recomendações do fabricante. A dosagem de LPS para confirmar a remoção foi feita utilizando o ToxinSensor™ Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit (GenScript), segundo as recomendações do fabricante. Após isso, as proteínas foram quantificadas usando o aparelho Qubit™ 4 Fluorometer (Invitrogen).

3.8 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas com 6 a 8 semanas de vida obtidos no Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO). Todos os experimentos foram conduzidos seguindo os princípios de conduta do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os protocolos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA: 247/2021).

3.9 Imunização com as proteínas recombinantes

Os animais foram divididos em quatro grupos e imunizados com a formulação contendo 10 µg das proteínas recombinantes (TS completa, TS sem SAPA ou TS-SAPA) juntamente com 18 µg do adjuvante CpG B344 (DNA Alpha) e alúmen 30% (v/v) em 100 µL de solução salina, por via subcutânea (JUNQUEIRA *et al.*, 2012). O grupo controle recebeu a formulação contendo apenas os adjuvantes. O CpG ODN utilizado, denominado CpG B344, é derivado do genoma do *T. cruzi* e possui a sequência nucleotídica TCGACGTTTGGATCGGT. O Alúmen possui hidróxido de alumínio em sua composição e foi adquirido comercialmente (Rehydrigel L.V. Solution – Reheis, Berkeley Heights, NJ). No total, foram administradas três doses (um *primer* e dois *boosts*) em um intervalo de 21 dias entre cada uma. Após 28 dias da última imunização, foi feita a coleta de sangue dos animais de cada grupo por punção cardíaca e, em seguida, esses mesmos foram eutanasiados por sobredosagem para a retirada dos baços. O sangue foi centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos para obtenção dos soros que foram armazenados a -20 °C e os baços foram utilizados para fazer a cultura de esplenócitos.

3.10 Imunização com as proteínas recombinantes e desafio com uma cepa virulenta de *T. cruzi*

Outro grupo de animais foram imunizados seguindo o mesmo protocolo apresentado na seção anterior, porém, 30 dias após a última imunização, foram desafiados intraperitonealmente com 10.000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi* e três dias após o desafio foi dado início a parasitemia. Para isso, 5 µL de sangue foram coletados da cauda de cada animal e colocados entre lâmina e lamínula 20 x 20 mm para contagem de 50 campos em objetiva de 40X em microscópio óptico (BRENER, 1969). A partir do número de parasitos observados em 5 µL foi calculada a parasitemia, dada em número de parasitos/mL utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Parasitemia (parasitos/mL)} = n^{\circ} \text{ de parasitos contados} \times \text{fator de correção do microscópio} \times 200$$

Após infecção, a sobrevivência foi analisada durante 60 dias e posteriormente os animais que sobreviveram foram eutanasiados para coleta dos corações para avaliação histopatológica e realização de qPCR para análise do parasitismo tecidual.

3.11 Western blot das proteínas recombinantes purificadas

Após purificação, as proteínas recombinantes foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e posteriormente transferidas para membranas de nitrocelulose (GE HealthCare) a 100 V por 2 horas. Após a transferência, foi realizado o bloqueio das membranas com PBS-T (PBS 1X + 0,01% Tween 20) contendo 5% de leite desnatado por 1 hora. Logo após, as membranas foram incubadas com anticorpo primário anti-histidina (Invitrogen) na diluição de 1:3.000 em PBS-T 0,01% contendo 5% de leite, e com os anticorpos gerados nas imunizações: anti-TS completa na diluição de 1:800, anti-TS sem SAPA na diluição de 1:200 e anti-TS-SAPA na diluição de 1:700 em PBS-T 0,01% contendo 5% de leite, todas *overnight*. Após o período de incubação, as membranas foram lavadas três vezes por 15 minutos com PBS-T 0,05% e depois foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG *mouse* conjugado com peroxidase (Sigma Aldrich) na diluição de 1:5.000 em PBS-T 0,01% contendo 5% de leite durante 1 hora. Após o período de incubação, foi realizada a lavagem das membranas três vezes por 15 minutos com PBS-T 0,05% e reveladas com o reagente Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad).

3.12 Dosagem de anticorpos por ELISA

A dosagem de anticorpos foi realizada por meio do ensaio de imunoabsorção enzimática (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Placas de 96 poços (Nunc Immunoplates) foram sensibilizadas com 100 ng das proteínas recombinantes TS completa, TS sem SAPA e TS-SAPA, diluídas em 100 µL de solução de sensibilização (Na₂CO₃ 15 mM; NaHCO₃ 85 mM; pH 9,5) e incubadas *overnight* a 4 °C. Após esse período, o conteúdo foi descartado e adicionou-se 200 µL de solução bloqueio (Sacarose 10% p/v; NaCl 150 mM; Albumina bovina 1% p/v; pH 7,4) por 2 horas a 37 °C. Em seguida, o bloqueio foi descartado e, após secagem das placas, os soros dos animais imunizados foram diluídos no diluente de amostra (Na₂HPO₄ 100 mM; KH₂PO₄ 17 mM; NaCl 150 mM; KCl 28 mM; Albumina bovina 1%; Sacarose 2%;

D-manitol 1%; Proclin 0,1% v/v; Tween 80 0,05% v/v) na proporção de 1:200. As amostras foram homogeneizadas e foi adicionado 100 µL em cada poço, incubando-se durante 1 hora a 37 °C. Após esse período, o conteúdo foi descartado e as placas foram lavadas cinco vezes com o tampão de lavagem (Na₂HPO₄ 100 mM; KH₂PO₄ 18 mM; NaCl 1500 mM; KCl 28 mM; Proclin 0,1% v/v; Tween 20 1% v/v; pH 7,4). Após secagem foi realizada a incubação com 100 µL dos anticorpos secundários anti-IgG total, IgG1 e IgG2a, conjugados com peroxidase, diluídos 1:40.000 no diluente de amostra por 1 hora a 37 °C. Após isso, as placas foram lavadas novamente cinco vezes com tampão de lavagem e, após secagem, as mesmas foram incubadas com 100 µL da solução substrato (3,3',5,5 – tetrametilbenzidina [TMB] e peróxido de hidrogênio [H₂O₂]) por 15 minutos à temperatura ambiente e protegidas da luz. Após o tempo, foi adicionado 100 µL da solução de parada da reação (H₂SO₄ - 0,5 M) e as amostras foram avaliadas em duplicata. A leitura da absorbância da reação colorimétrica foi obtida por leitor de ELISA utilizando o comprimento de onda de 450 nm.

3.13 Cultura de esplenócitos e dosagem de citocinas

Os baços dos animais imunizados foram coletados em falcons de 50 mL contendo 10 mL de solução salina estéril (NaCl 0,9%). Os baços foram macerados com o auxílio de redes de metal estéreis e pinças, em placas de Petri e, posteriormente, esses macerados foram coletados em falcons de 50 mL, completando seu volume para 30 mL com solução salina. Os falcons foram centrifugados a 1.200 rpm por 10 min a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em 1 mL de ACK (NH₄Cl 0,15 M; KHCO₃ 0,1 M; Na₂-EDTA 0,1 M). Estes ficaram incubados no gelo por 5 minutos e, após o tempo, foi adicionado solução salina completando o volume para 30 mL a fim de interromper a reação de lise dos eritrócitos. Os falcons foram centrifugados novamente a 1.200 rpm por 10 min a 4 °C, o sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi ressuscitado em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado (meio RPMI completo) com 10% de FBS (Fetal Bovine Serum - Gibco), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco). Os grumos foram removidos utilizando filtro de 40 µm (Corning® cell strainer). Para avaliar a viabilidade dos esplenócitos, foi feita a diluição 1:200 desses em azul de Tripán e a contagem das células foi feita em câmara de Neubauer. Após a contagem, foi plaqueado 1 x 10⁶

esplenócitos por poço que foram reestimulados com meio RPMI completo, com 1 µg de concanavalina A e com 5 µg das respectivas proteínas recombinantes. Após a incubação por 72 horas a 37°C e 5% de CO₂, o sobrenadante foi coletado e as citocinas IFN-γ, IL-10 e TNF-α foram dosadas, em triplicata, pelo ensaio de ELISA utilizando o R&D Systems ELISA Kits de acordo com as instruções do fabricante.

3.14 Análise histopatológica

Os corações coletados dos animais desafiados foram fixados em solução de paraformaldeído 10% e posteriormente embebidos em parafina, cortados em micrótomo em seções de 3 µm e corados com hematoxilina e eosina (H&E). As lâminas foram escaneadas no microscópio digital utilizando o *Scanner* de Lâminas 3DHISTECH Ltd e a avaliação semiquantitativa foi realizada, sem o conhecimento prévio da identificação de cada amostra pelo patologista. O *score* histopatológico do infiltrado inflamatório foi construído com base em uma escala de 4 níveis: ausente (*score* 0); discreto com até 25% de comprometimento da amostra (*score* 1); moderado, quando aproximadamente 50% da amostra apresentava a alteração (*score* 2); intenso, onde de 50 a 100% da amostra apresentava a alteração (*score* 3) e associado a esse *score*, foi observado se o infiltrado inflamatório estava presente em focos ou distribuído de maneira difusa.

3.15 Parasitismo tecidual

Para determinar a carga parasitária dos tecidos dos animais infectados por qPCR, o DNA dos corações foram extraídos utilizando o NucleoSpin tissue Kit (Macherey-Nagel). Após a quantificação do DNA utilizando Qubit™ 4 Fluorometer (Invitrogen), a qPCR foi realizada usando o Power SYBR™ Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) e *primers* direcionados para a sequência satélite de *T. cruzi* (*primer* 1- 5'-AST CGG CTG ATC GTT TTC GA-3' [S = G ou C] e *primer* 2- 5'-AAT TCC TCC AAG CAG CGG ATA-3'), gerando um produto de 166 pb (SCHIJMAN *et al.*, 2011). Como controle interno as amostras também foram amplificadas com *primers* anelando no gene de camundongo que codifica TNF (*Forward primer* 5' CCCTCACACTCAGATCATCTTCT 3' e *reverse primer* 5' GCTACGACGTGGGCTACAG 3'). As reações foram realizadas em um volume final

de 15 µL contendo 100 ng de DNA molde, SYBR Green Master Mix e 10 µM de cada *primer*. As curvas padrão foram geradas usando diluições seriadas do DNA alvo, a partir de 1.000 pg até 0,1 pg e a carga parasitária foi estimada como o número de parasitos correspondendo ao produto de PCR de 100 ng de DNA.

3.16 Clonagem da sequência da TS sem repetições SAPA no vetor de expressão em mamíferos

A sequência que codifica a TS sem repetições SAPA foi amplificada a partir do gene codificador de Trans-sialidase (ID: Tc00.1047053509495.30), clonado no vetor pROCK (BELEW *et al.*, 2007). Para isso, foram desenhados os *primers forward* 5' – TGA TCA ATG CTC TGC CCC AGC GAG CCC GCG CA – 3' e *reverse* 5' – GAA TTC TCA CAT GTG TGC TTC CGT GCC AAT CAG GT – 3', contendo sítios de clivagem para as enzimas de restrição BclI e EcoRI, respectivamente, gerando um produto de 1.944 pb. Após PCR, os produtos foram analisados em gel de agarose 0,8% e clonados no vetor pCR™2.1-TOPO™ (Invitrogen), utilizando bactérias deficientes de metiltransferase (NEB) visto que a enzima BclI é sensível à metilação de adenina. Após isso, a sequência da TS sem SAPA foi clivada do vetor pCR™2.1-TOPO™ utilizando as enzimas de restrição BclI e EcoRI, e ligada, por meio da T4 DNA ligase (Promega), no vetor de expressão em células de mamíferos pcDNA™3.1(+) (GenScript) previamente digerido com as enzimas BamHI e EcoRI.

3.17 Transcrição *in vitro* e transfecção em células HEK293T e HeLa

O vetor pcDNA™3.1(+) contendo a sequência que codifica a TS sem SAPA foi linearizado utilizando a enzima de restrição XhoI e purificado usando o PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel) para ser utilizado na transcrição *in vitro*. Esse vetor foi sintetizado com as regiões 5' UTR (*untranslated region*) e 3' UTR da α -1-globulina humana para dar estabilidade na tradução, e também com uma cauda Poli-A já inserida na porção *downstream*. A transcrição *in vitro* foi realizada utilizando o kit RiboMAX™ Large Scale RNA Production Systems T7 (Promega), conforme as instruções do fabricante. O análogo de Cap 5' utilizado foi o CleanCap® (TriLink BioTechnologies) que previne a degradação do mRNA no citoplasma e promove o recrutamento dos ribossomos e a tradução da proteína. Além disso, a N1-Metilpseudouridina-5'-Trifosfato (TriLink

BioTechnologies) foi utilizada a fim de reduzir a imunogenicidade do mRNA resultante. O mRNA produzido foi analisado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e quantificado com o Qubit™ 4 Fluorometer (Invitrogen). As células HEK293T e HeLa foram cultivadas em meio RPMI completo, plaqueando-se 7×10^5 células por poço, em placas de 6 poços e posteriormente foram transfectadas após atingirem a confluência de $\geq 80\%$. O mRNA da TS sem SAPA foi transfectado usando o TransIT®-mRNA Transfection Kit (Mirus Bio), seguindo as instruções do fabricante. Como controle positivo, foram transfectados o pcDNA™3.1(+) contendo a sequência da TS sem SAPA e o pcDNA3.0 (Genscript) contendo a sequência de RFP (*Red Fluorescent Protein*), ambos usando o Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante.

3.18 Preparo dos extratos celulares e *western blot*

Após 48 horas, as células transfectadas com a sequência de RFP foram analisadas em microscópio de fluorescência para confirmação da transfecção. Em seguida, o meio de cultura das placas foi retirado e essas foram lavadas com 1 mL de PBS 1X (gelado) para desgrudar as células. Após isso, as células foram centrifugadas a 1.200 rpm por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* contendo as células foi ressuscitado em 40 µL de tampão RIPA (TrisHCl 5 mM, pH 8,0; NaCl 15 mM; NP-40 0,1%; Deoxicolato de sódio 0,05%; SDS 0,01%), vortexado por 1 min e deixado no gelo por 10 min. Após a lise das células, as amostras foram novamente centrifugadas a 12.000 x g por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi recolhido e adicionou-se 12 µL de tampão de amostra de proteína. Essas amostras (15 µL de cada) foram então submetidas à eletroforese em SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 7,5% e posteriormente foram transferidas *overnight* para membranas de nitrocelulose (GE HealthCare) a 60 mA. Após a transferência, foi realizado o bloqueio das membranas com PBS-T (PBS 1X + 0,01% Tween 20) contendo 5% de leite desnatado por 1 hora. Logo após, as membranas foram incubadas com anticorpo primário anti-TS sem SAPA (gerado através da imunização de camundongos BALB/c com a proteína recombinante TS sem SAPA + alúmen e CpG) na diluição de 1:500 em PBS-T 0,01% contendo 5% de leite por 3 horas. Após o período de incubação, as membranas foram lavadas três vezes por 15 minutos com PBS-T 0,05% e depois foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG *mouse* conjugado com

peroxidase (Sigma Aldrich) na diluição de 1:5.000 em PBS-T 0,01% contendo 5% de leite durante 1 hora. Após o período de incubação, foi realizada a lavagem das membranas três vezes por 15 minutos com PBS-T 0,05% e, em seguida, reveladas com o reagente Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad).

3.19 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o *software* GraphPad Prism versão 8 e a estatística foi realizada pelo método Two-way ANOVA com pós-teste em Tukey e Ordinary one-way ANOVA com pós-teste em Sidak. A significância estatística foi estabelecida em $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização dos genes codificadores das trans-sialidases contendo repetições SAPA presentes no genoma do clone CL Brener de *T. cruzi*

Dados da literatura indicam que os membros da família das trans-sialidases são possíveis alvos da resposta imune protetora na doença de Chagas e desempenham múltiplos papéis durante a infecção pelo *T. cruzi*. Como foi investigado por Freitas e colaboradores (2011), os membros pertencentes ao grupo I dessa família possuem atividade catalítica e têm sido intensamente estudados por serem considerados fatores de virulência do parasito. Anteriormente, foram identificadas 11 sequências pertencentes ao grupo I das TS que codificam TS ativas no genoma da cepa do clone CL Brener, disponíveis no banco de dados *TriTrypDB* (FREITAS *et al.*, 2011). No entanto, por se tratar de uma cepa híbrida com alto teor de repetição, a existência de imprecisões é bem frequente na montagem do genoma de CL Brener e na estimativa do número de cópias de genes.

A fim de estimar o repertório completo de genes de TS ativas em CL Brener, foram usados dados de sequenciamento gerados com a plataforma *PacBio*, realizados pelo grupo da Dra. Daniella Bartholomeu (BURLE-CALDAS *et al.*, 2022). Sequências longas permitem a montagem de regiões que possuem muitos padrões de repetições, enquanto que a alta cobertura obtida com a plataforma *Illumina*, permite a correção de erros de sequenciamento. Foram identificadas um total de 16 sequências que potencialmente codificam TS ativa no genoma do clone CL Brener. Cinco sequências, que codificam TS ativa, contêm repetições SAPA na porção C-terminal, com o teor de repetições variando de 4 a 29 repetições. Além dessas cinco sequências, apenas mais uma sequência que codifica TS inativa, também possui domínio SAPA em seu C-terminal. Utilizando o *software* MUSCLE e a ferramenta MEME suite, o diagrama de motivo resultante combinado com a estrutura conhecida para a região FRIP, domínio Asp-box, motivo VTV e repetições SAPA foram então usados como base para a construção da figura 7.

Trans-sialidases Ativas

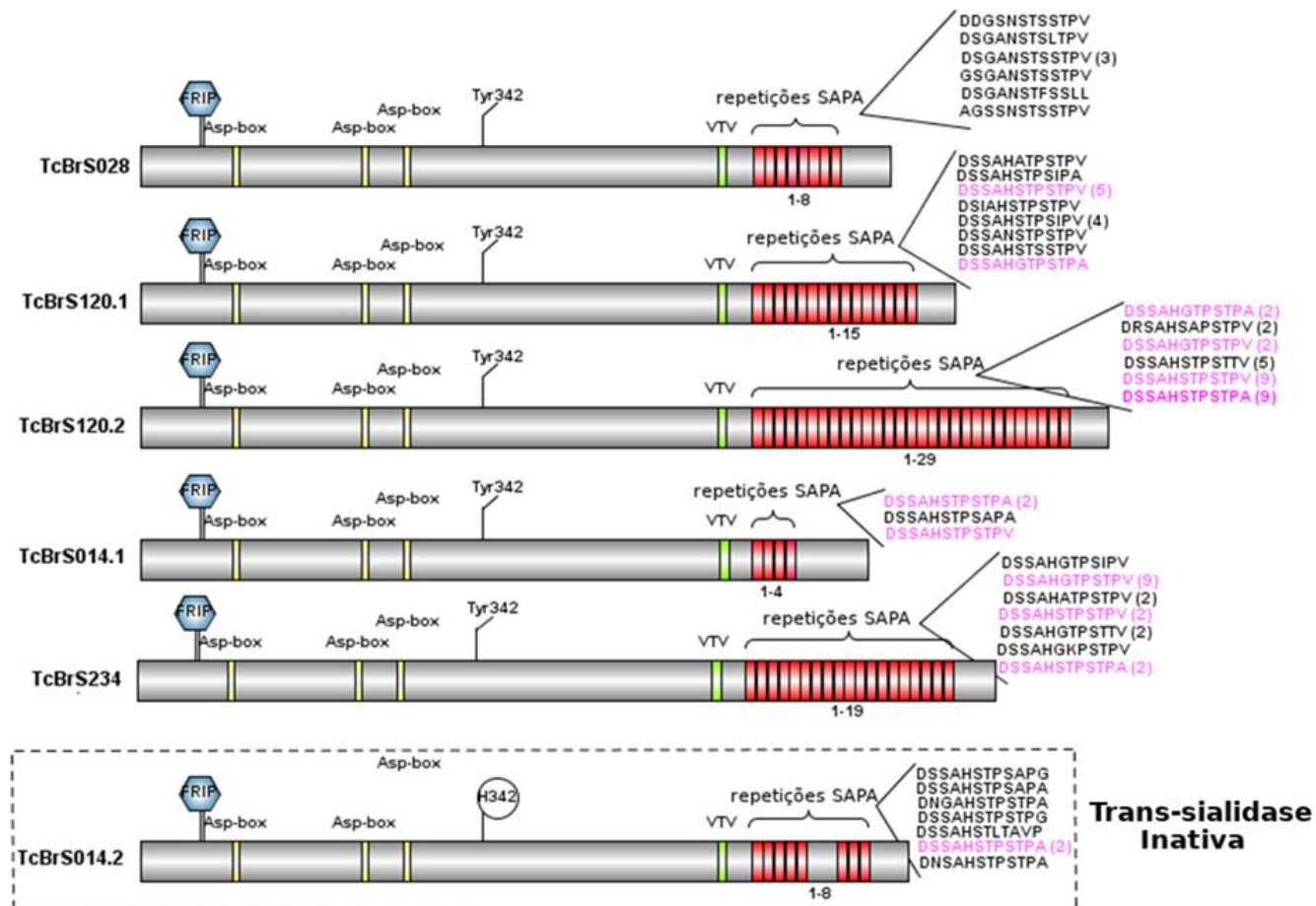


Figura 7: Representação esquemática das Trans-sialidases contendo repetições SAPA. Cada barra cinza representa uma sequência de aminoácidos de TS, na qual estão representados a região FRIP (hexágono azul; posição 66-69), domínios Asp-box (bandas amarelas), motivo VTU (banda verde; VTUxNVxLYNR) e as repetições SAPA (faixas vermelhas), variando de 4 a 29 (o número de repetições é destacado abaixo de cada região que as contém). TS ativas contendo Tyr342 são mostradas na parte superior da figura e uma única sequência inativa de TS com substituição deste aminoácido por H342 (circulado) é mostrada na parte inferior. As unidades repetidas estão listadas à direita de cada barra, bem como o número de vezes que elas se repetem (entre parênteses). As unidades repetidas em rosa representam aquelas que seguem o padrão esperado para repetições SAPA (DSSAHS/GTPSTPV/A). Em preto estão aqueles que desviam em 1 ou mais aminoácidos desse padrão.

4.2 Caracterização de clones contendo um gene codificador de trans-sialidase e suas versões truncadas

Como já visto anteriormente, a trans-sialidase se apresenta como antígeno promissor em estudos voltados para o desenvolvimento vacinal para doença de Chagas. Com a finalidade de entender melhor o papel das repetições SAPA presentes nas trans-sialidases, e se apresentam alguma atuação protetora ou relacionada à virulência do parasito, foram geradas versões recombinantes da proteína: a proteína completa (TS completa), apenas com a porção catalítica (TS sem SAPA) e somente com as repetições SAPA (TS-SAPA) (figura 8A). Como descrito em materiais e métodos, os vetores de expressão pET-21a (figura 8B) (Novagen) contendo os

insetos de um gene codificador de uma TS ativa e suas versões truncadas, foram previamente gerados pela Dra. Nailma Aprigio. Esses plasmídeos foram digeridos com as enzimas de restrição XbaI e XhoI e analisados por eletroforese em gel de agarose. Como mostra a figura 8C, ocorreu a liberação dos fragmentos de DNA com o número de pares de bases esperados: 2.673 pb para a TS completa, 1.941 pb correspondente à porção catalítica e 747 pb correspondente às repetições SAPA.

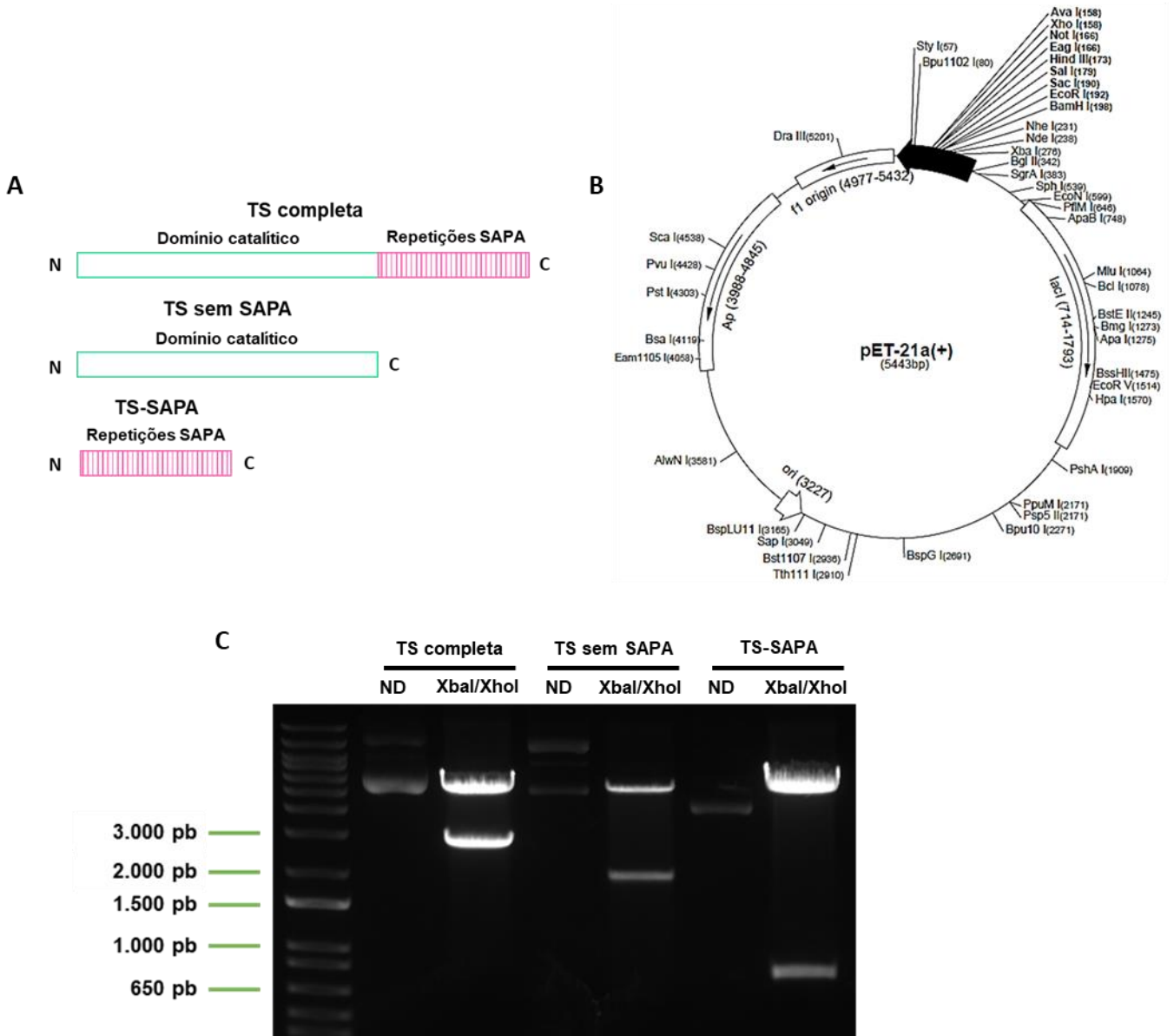


Figura 8: Digestão do vetor pET-21a para confirmação da clonagem com a TS e suas versões truncadas. Esquema da construção das três versões recombinantes da TS (A) e vetor de expressão pET-21a utilizado (B). Análise por eletroforese em gel de agarose 0,8% dos vetores pET-21a contendo a TS completa, a TS sem SAPA e a TS-SAPA, não digerido (ND) e após digestão com as enzimas XbaI e XhoI (C).

4.3 Indução da expressão das proteínas recombinantes em *E. coli*

De posse dos plasmídeos contendo o gene da TS e suas versões truncadas, após a confirmação da clonagem, os mesmos foram utilizados para transformar bactérias BL21 *Star* (DE3) e SHuffle® T7, quimiocompetentes, e a expressão das proteínas recombinantes foi avaliada. Após as 4 horas de indução das culturas com IPTG, foram preparados extratos proteicos com as alíquotas coletadas do não induzido (antes da adição do IPTG) e induzido (depois da adição do IPTG) para serem analisados em gel de poliacrilamida 10%. A figura 9 mostra a banda correspondente ao tamanho esperado para a TS completa com 98 kDa (A) e para a TS sem SAPA com 72 kD (B), nos extratos proteicos do induzido. No caso da TS-SAPA foi observado em SDS-PAGE uma banda correspondente a uma proteína de aproximadamente o dobro da massa molecular esperada, com aproximadamente 50 kDa, sendo a massa predita para essa proteína de 25 kDa (figura 9C). Espectrometria de massas foi realizada pela Dra Nailma Aprigio com esta proteína purificada, no qual foi verificado que se tratava de uma proteína que estava migrando como dímero no gel de poliacrilamida.

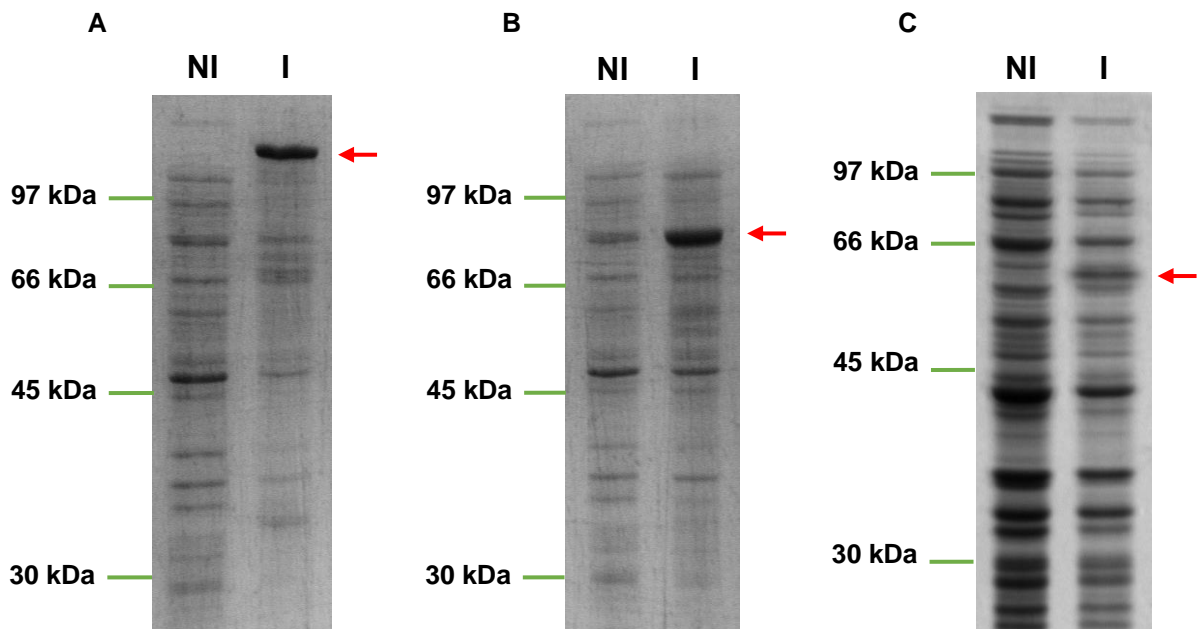


Figura 9: Expressão das proteínas recombinantes em *E. coli*. Análise por SDS-PAGE de extratos proteicos totais das culturas de bactérias referentes à TS completa (A) e à TS sem SAPA (B) em SHuffle® T7, e à TS-SAPA em BL21 *Star* (C) do não induzido (NI) e induzido (I) após a adição de 0,5 mM de IPTG. As bandas correspondentes ao tamanho esperado das proteínas estão apontadas com setas.

4.4 Teste de solubilidade das proteínas recombinantes

Após a confirmação da expressão das proteínas, as culturas de bactérias foram lisadas, e foi realizado um teste de solubilidade com os seus sobrenadantes (fração solúvel) e os *pellets* (fração insolúvel) que foram ressuspensos com o tampão de ligação Histrap (consultar seção 3.4). Como observado na figura 10, a TS completa (A) estava presente tanto na fração solúvel quanto na insolúvel e a TS-SAPA (C) encontrava-se na fração solúvel, portanto, a purificação dessas proteínas foi feita a partir do sobrenadante. No entanto, a TS sem SAPA apresentou-se majoritariamente na fração insolúvel (figura 10B), o que tornou necessário o tratamento dessa fração com tampão de ligação Histrap contendo 8 M de ureia para solubilização e obtenção da proteína presente no *pellet*, como é mostrado na figura 11.

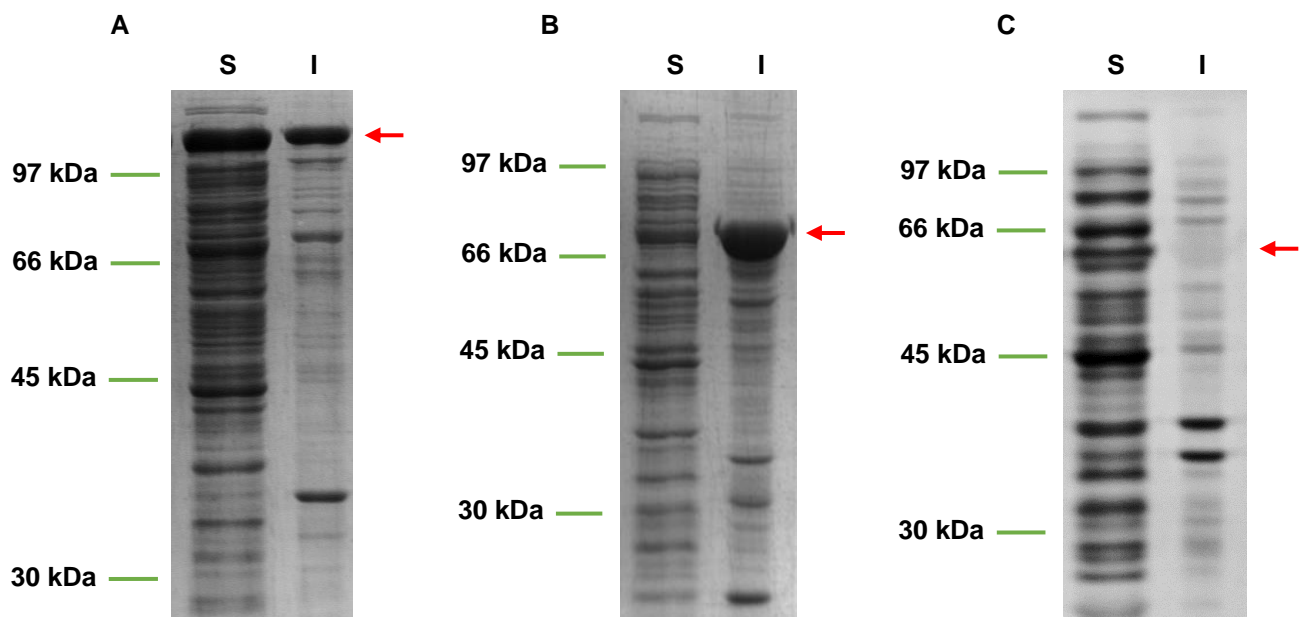


Figura 10: Teste de solubilidade das proteínas recombinantes. SDS-PAGE mostrando as frações solúvel (S) e insolúvel (I) da TS completa (A), TS sem SAPA (B) e TS-SAPA (C) após lise das culturas de bactérias. As bandas correspondentes ao tamanho esperado das proteínas estão apontadas com setas.

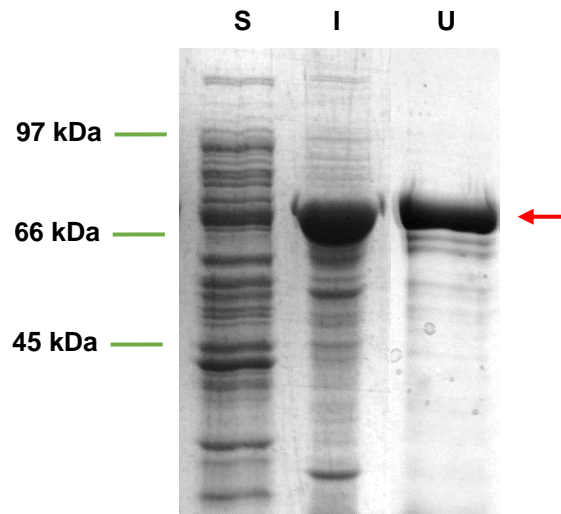


Figura 11: Solubilização da fração insolúvel da TS sem SAPA. SDS-PAGE mostrando a fração solúvel (S), insolúvel (I) e a insolúvel solubilizada com tampão contendo 8 M de ureia (U) da TS sem SAPA, após lise das culturas de bactérias. As bandas correspondentes ao tamanho esperado da proteína estão apontadas com a seta.

4.5 Purificação das proteínas recombinantes

Como mostrado na seção anterior, a TS completa apresentou-se tanto na fração solúvel quanto na insolúvel e a TS-SAPA na fração solúvel, podendo realizar a purificação dessas proteínas a partir do sobrenadante. No caso da TS sem SAPA, uma segunda etapa foi necessária para a obtenção da proteína na fração insolúvel, por meio da solubilização do *pellet* utilizando tampão de ligação com 8 M de ureia. A purificação das proteínas foi feita por cromatografia de afinidade utilizando coluna de níquel. Após reunir as amostras com maior grau de pureza, o produto final da purificação de cada proteína recombinante foi analisado em gel corado com *Comassie* (figura 12A). O *western blot* com o anticorpo anti-histidina (GE HealthCare) foi realizado para identificação das proteínas recombinantes, uma vez que as mesmas apresentam uma cauda de seis histidinas fusionada pelo vetor pET-21a (figura 12B). Como observado, todas proteínas purificadas foram identificadas correspondendo ao tamanho esperado pelo anti-his.

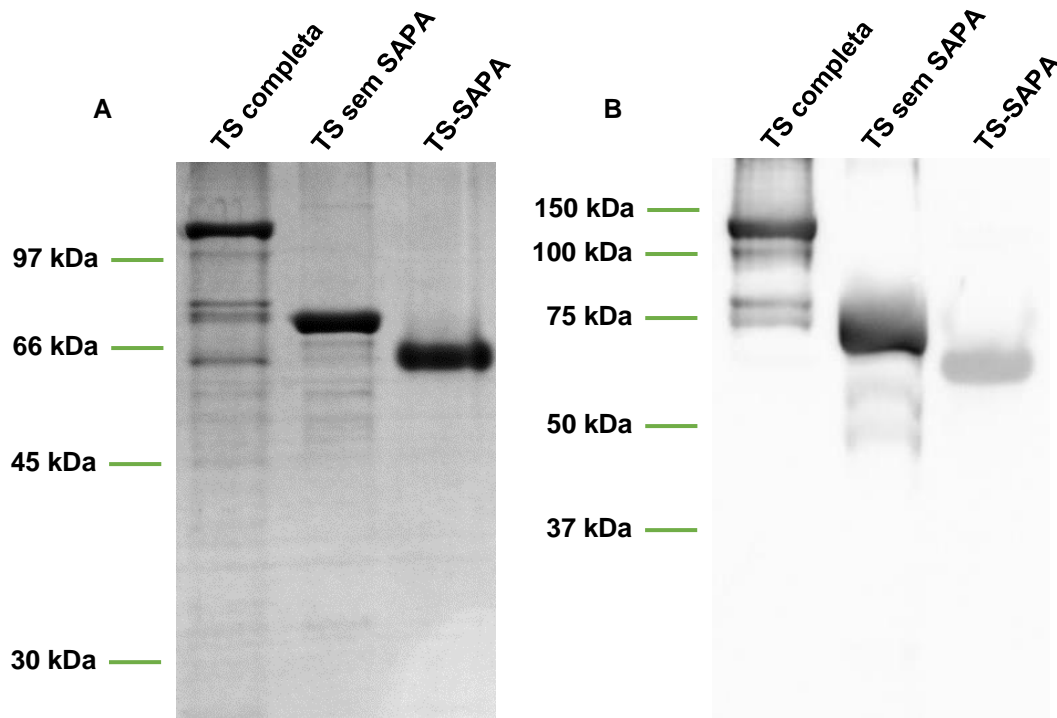


Figura 12: Análise das proteínas recombinantes purificadas. SDS-PAGE das proteínas recombinantes (A) TS completa, TS sem SAPA e TS-SAPA, com massas moleculares de 98 kDa, 72 kDa e 25 kDa, respectivamente. No caso da TS-SAPA, trata-se de um dímero, apresentando-se no gel com massa molecular de 50 kDa. *Western blot* das proteínas recombinantes (B). Após separação em SDS-PAGE, cerca de 1 µg das proteínas recombinantes purificadas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e incubada com o anticorpo primário anti-histidina na diluição de 1:3.000 e secundário anti-IgG conjugado com peroxidase, na diluição de 1:5.000.

4.6 Imunização de animais com a TS e seus diferentes domínios e avaliação da resposta imune

Após purificação, diálise e remoção do LPS das proteínas recombinantes, camundongos BALB/c foram imunizados com as mesmas, juntamente com os adjuvantes CpG B344 (JUNQUEIRA *et al.*, 2012) e alúmen ou apenas com os adjuvantes. Três doses dessas formulações foram administradas nos animais e, após 28 dias da última imunização, o sangue e os baços dos animais (n = 4 animais/grupo) foram coletados para análise da resposta imune humoral e celular, respectivamente. O esquema do experimento é mostrado na figura 13.

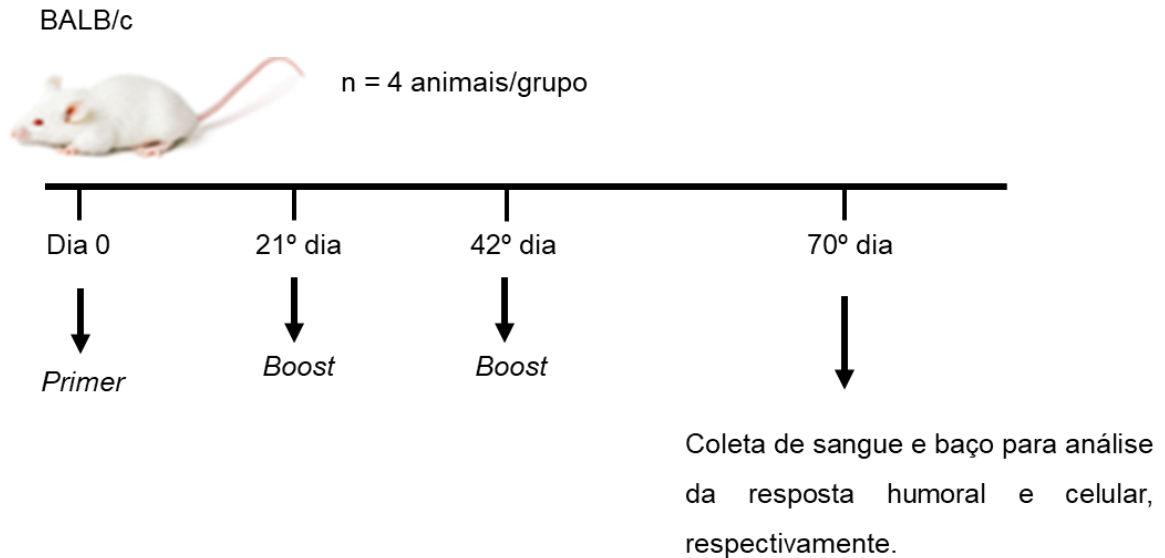


Figura 13: Desenho experimental das imunizações e avaliação da resposta imune.

4.6.1 Análise da resposta imune humoral

Os soros dos animais imunizados com as proteínas recombinantes foram utilizados por meio de ELISA para quantificar a produção de anticorpos IgG totais e as suas subclasses IgG1 e IgG2a, visto a importância dos anticorpos IgG para a neutralização das formas extracelulares do parasito (JUNQUEIRA *et al.*, 2010). Como observado na figura 14, a imunização com todas as proteínas recombinantes foi capaz de induzir a produção de IgG total contra elas mesmas. Em relação as suas subclasses, todas as proteínas foram capazes de induzir a produção de anticorpos IgG1, destacando-se uma maior produção desse anticorpo pelos animais imunizados com a TS completa. Contudo, não houve produção de níveis significativos de anticorpos IgG2a em animais imunizados com nenhuma das proteínas recombinantes.

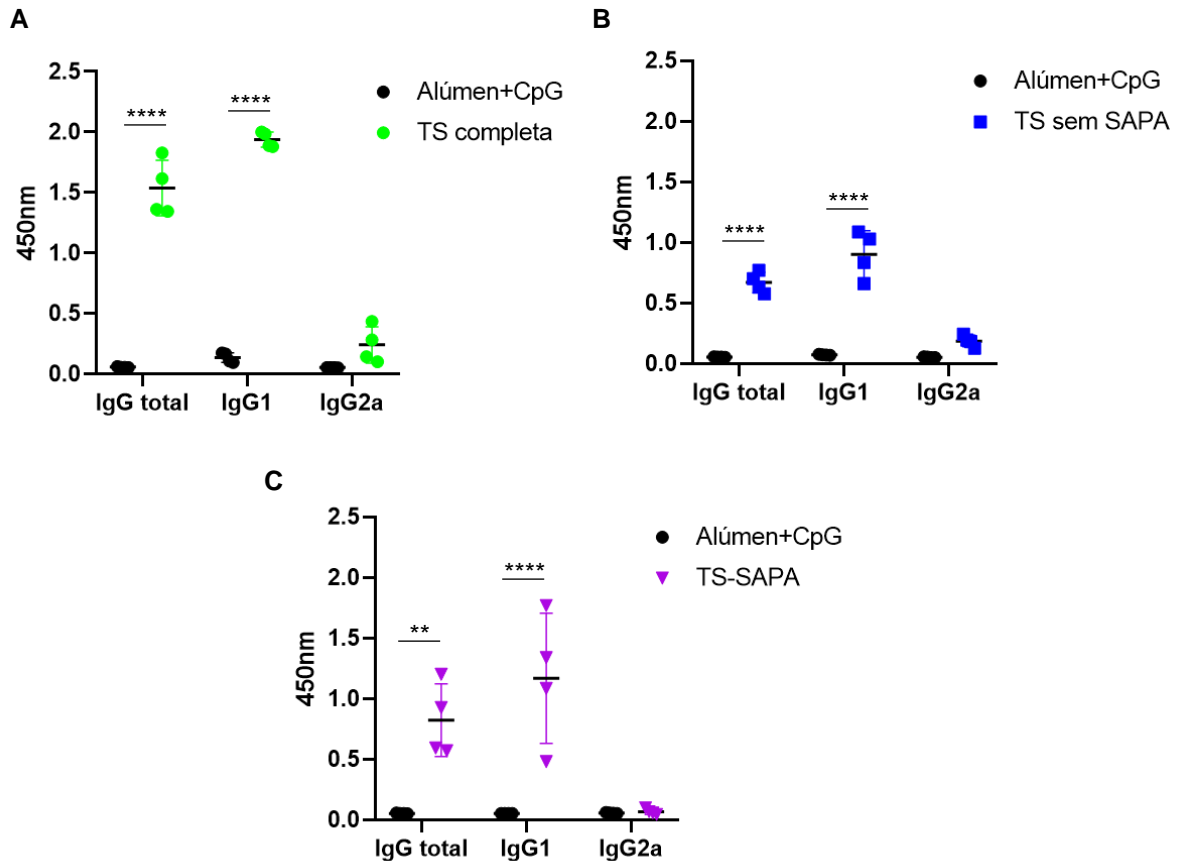


Figura 14: Dosagem de anticorpos dos soros dos animais imunizados com as proteínas recombinantes. Placas foram sensibilizadas com 100 ng da TS completa (A), TS sem SAPA (B) e TS-SAPA (C) e testadas contra seus respectivos soros imunizados ou contra o soro dos animais controle (Alúmen+ CpG) diluídos 1:200 para determinar os níveis de IgG total, IgG1 e IgG2a. A análise estatística foi realizada com o método two-way ANOVA com pós-teste em Sidak (****, $P < 0,0001$; **, $P < 0,01$).

Os soros dos animais imunizados com as proteínas recombinantes também foram testados por meio de *western blot* contra cada uma das proteínas: TS completa, TS sem SAPA e TS-SAPA (figura 15). Como esperado, o soro dos animais imunizados com a proteína TS completa é capaz de reconhecer ela mesma e também a TS-SAPA que corresponde ao domínio repetitivo da proteína TS completa (figura 15A). Entretanto, a TS sem SAPA que corresponde à porção catalítica da TS completa, apresentou um reconhecimento muito fraco em relação às outras proteínas. Esse dado foi corroborado pelo ELISA dos soros dos animais imunizados com a TS completa contra os diferentes domínios, onde foi observado uma alta produção de anticorpos IgG direcionados para a porção repetitiva (TS-SAPA), demonstrando o caráter imunodominante das repetições SAPA em relação à porção catalítica (figura 15B). O soro dos animais imunizados com a TS sem SAPA foi capaz de reconhecer a própria proteína e a TS completa, visto que a TS completa contém a porção catalítica

e, como esperado, não houve reconhecimento da TS-SAPA por esse soro, já que as repetições SAPA estão ausentes na proteína TS sem SAPA (figura 15C). Por último, o soro dos animais imunizados com a TS-SAPA foi capaz de reconhecer tanto a própria proteína quanto a TS completa, que contém o domínio repetitivo e, como esperado, não foi capaz de reconhecer a TS sem SAPA que não possui repetições SAPA (figura 15D).

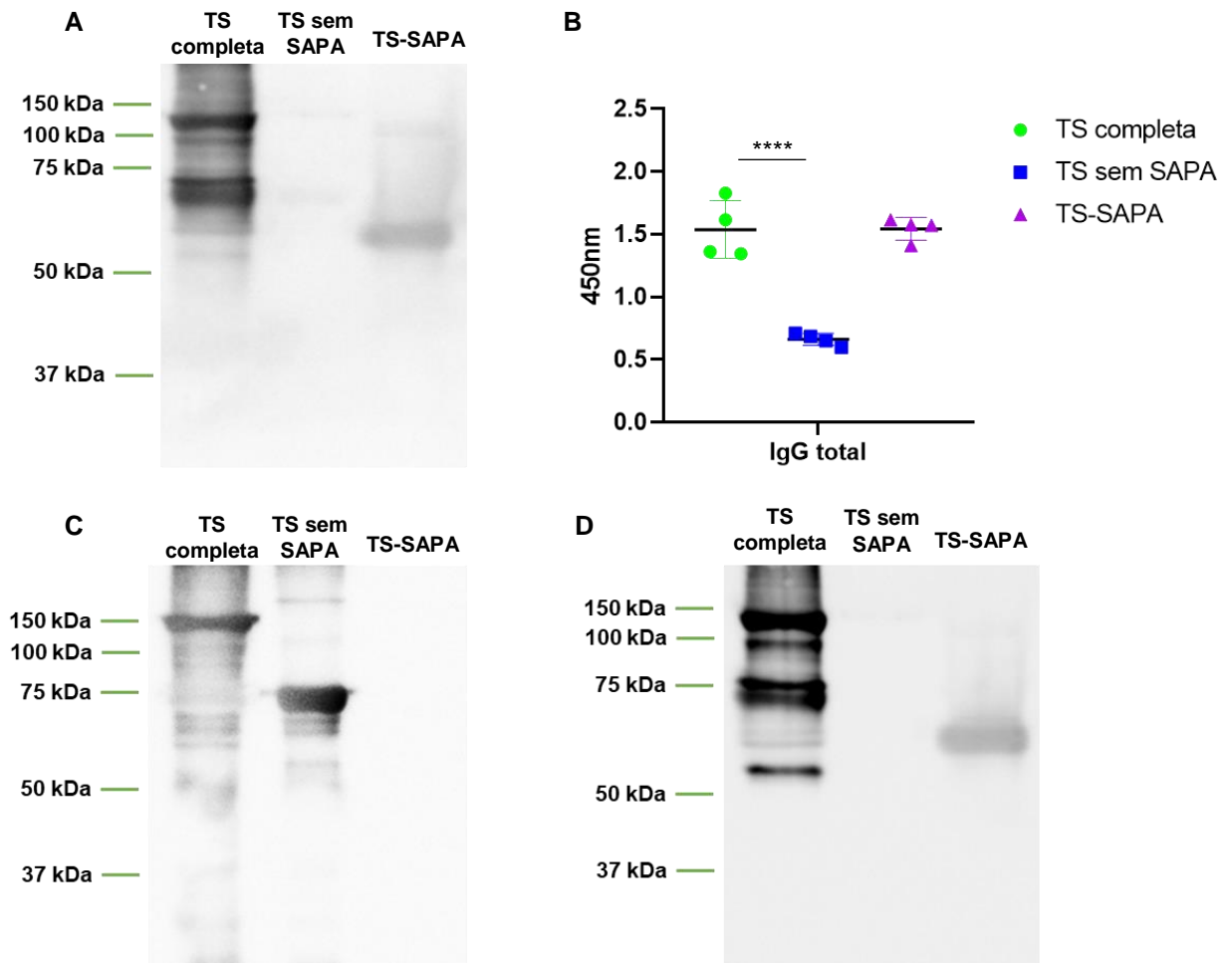


Figura 15: Análise dos soros dos animais imunizados contra a TS completa e suas versões truncadas e imunodominância das repetições SAPA. As proteínas recombinantes foram transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com o soro dos animais imunizados com a TS completa 1:800 (A), TS sem SAPA 1:200 (C) e TS-SAPA 1:700 (D). Anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase foi utilizado em todos os casos, na diluição de 1:5.000. Determinação de IgG total do soro de camundongos BALB/c imunizados com a TS completa contra as proteínas recombinantes (B). A análise estatística foi realizada com o método Ordinary one-way ANOVA com pós-teste em Tukey (****, $P < 0,0001$).

4.6.2 Análise da resposta imune celular

A partir dos baços coletados dos animais imunizados com as proteínas recombinantes, foi realizada a cultura de esplenócitos e, estes, foram reestimulados

com as próprias proteínas recombinantes: TS completa, TS sem SAPA e TS-SAPA. A Concanavalina A (Con A) foi utilizada como controle positivo por ser um ativador policlonal e induzir a produção de citocinas. As citocinas dosadas por ELISA foram o IFN- γ , que tem um perfil de resposta pró-inflamatória (Th1) e é crucial para o controle da infecção pelo *T. cruzi* (JUNQUEIRA *et al.*, 2010), e a citocina IL-10 que exibe uma resposta anti-inflamatória (Th2). Como observado na figura 16, a análise da resposta imune celular mostrou maiores níveis de IFN- γ produzidos pelos esplenócitos dos animais imunizados com a TS sem SAPA, quando comparados com os esplenócitos dos animais imunizados com a TS completa e níveis ainda muito maiores quando comparados aos de esplenócitos de animais imunizados com TS-SAPA (figura 16A). Em contrapartida, esplenócitos dos animais imunizados com a TS completa, contendo repetições SAPA, produziram níveis mais altos de IL-10 em comparação com os esplenócitos dos animais imunizados com a TS sem SAPA e TS-SAPA (figura 16B). Em relação à citocina TNF- α , ambos esplenócitos dos animais imunizados com a TS completa e TS sem SAPA produziram níveis similares e um pouco maiores do que os esplenócitos dos animais imunizados com o domínio repetitivo TS-SAPA (figura 16C).

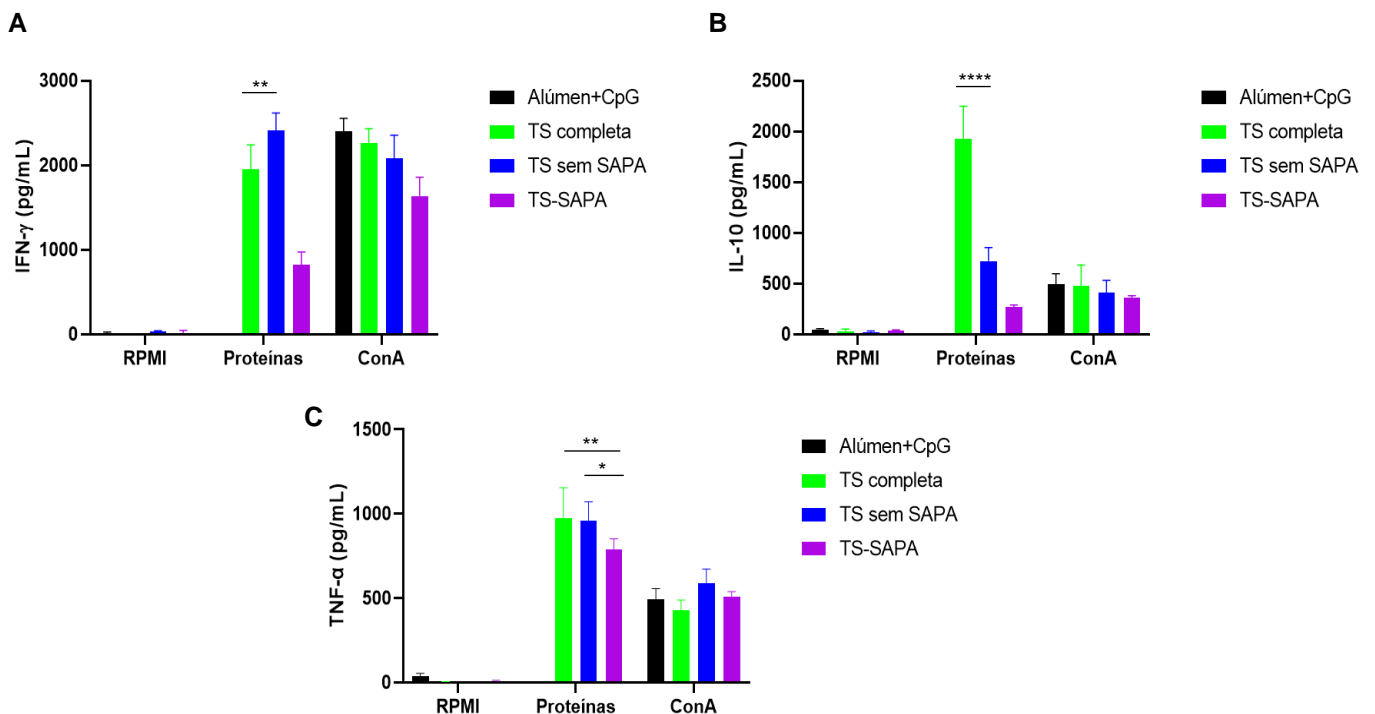


Figura 16: Dosagem das citocinas produzidas pelos esplenócitos dos animais imunizados com as proteínas recombinantes. Após 28 dias da última imunização, os baços dos camundongos foram removidos e IFN- γ (A), IL-10 (B) e TNF- α (C) foram dosados no sobrenadante de culturas de esplenócitos estimulados durante 72 horas com 5 μ g de suas respectivas proteínas ou com 1 μ g de Concanavalina A. Análise estatística foi realizada pelo método two-way ANOVA com pós-teste em Tukey (****, $P < 0,0001$; **, $P < 0,01$; *, $P < 0,05$).

4.7 Imunização com as diferentes proteínas recombinantes e desafio com uma cepa virulenta do *T. cruzi*

O outro grupo de animais imunizados com as proteínas recombinantes (n = 5 animais/grupo), após 30 dias da última imunização, foram desafiados com a cepa Y de *T. cruzi* e a proteção conferida pela TS e seus diferentes domínios foi avaliada analisando a parasitemia, a sobrevivência dos animais, a histopatologia e carga parasitária no coração. O esquema do experimento é mostrado na figura 17.

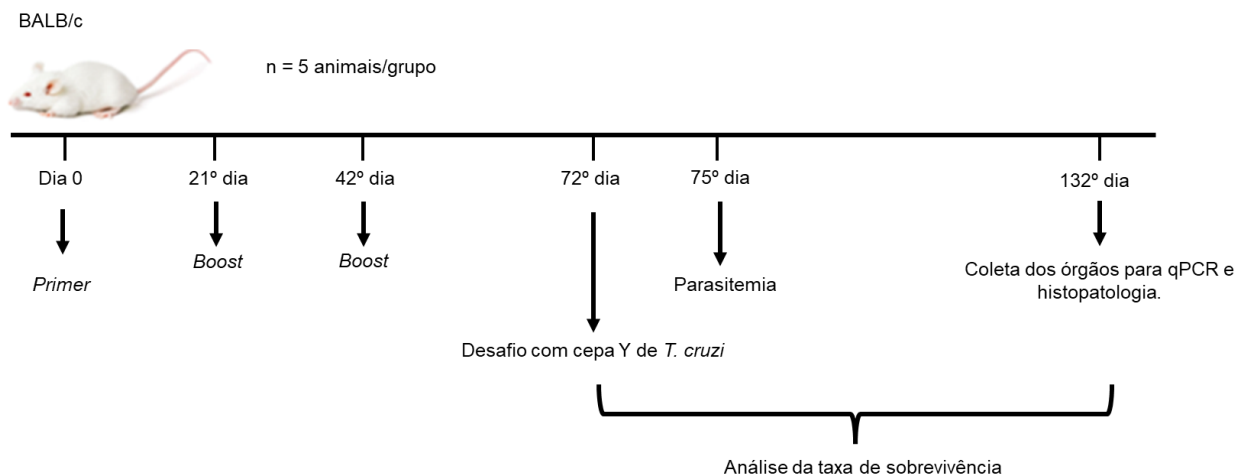


Figura 17: Desenho experimental das imunizações e desafio com cepa Y de *T. cruzi*.

4.7.1 Análise da parasitemia e sobrevivência dos animais desafiados

Após três dias do desafio dos animais, a curva da parasitemia passou a ser avaliada durante 20 dias. Como mostrado na figura 18A, a imunização com a TS completa, bem como com suas versões truncadas TS sem SAPA e TS-SAPA, foram capazes de reduzir o pico de parasitemia, quando comparadas à imunização com apenas os adjuvantes (Alúmen+CpG) no nono dia pós-infecção. Os animais imunizados com a TS completa e a TS sem SAPA apresentaram uma redução de 90% da parasitemia em relação ao grupo controle, enquanto os animais imunizados com a TS-SAPA tiveram uma redução de apenas 50% da parasitemia quando comparada ao pico do grupo controle. Além disso, em uma das repetições do experimento, os animais imunizados com a TS-SAPA apresentaram uma exacerbação da infecção em 100% em relação ao grupo controle (dados não mostrados). Em relação à sobrevivência dos animais, após 60 dias da infecção, todos os grupos, exceto o grupo dos animais imunizados com o domínio repetitivo (TS-SAPA), apresentaram 100% de

sobrevivência (figura 18B). Apesar de não ser observada uma diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, o grupo imunizado com a TS-SAPA levou a uma mortalidade maior (80% de sobrevivência) nas duas repetições do experimento (dados não mostrados).

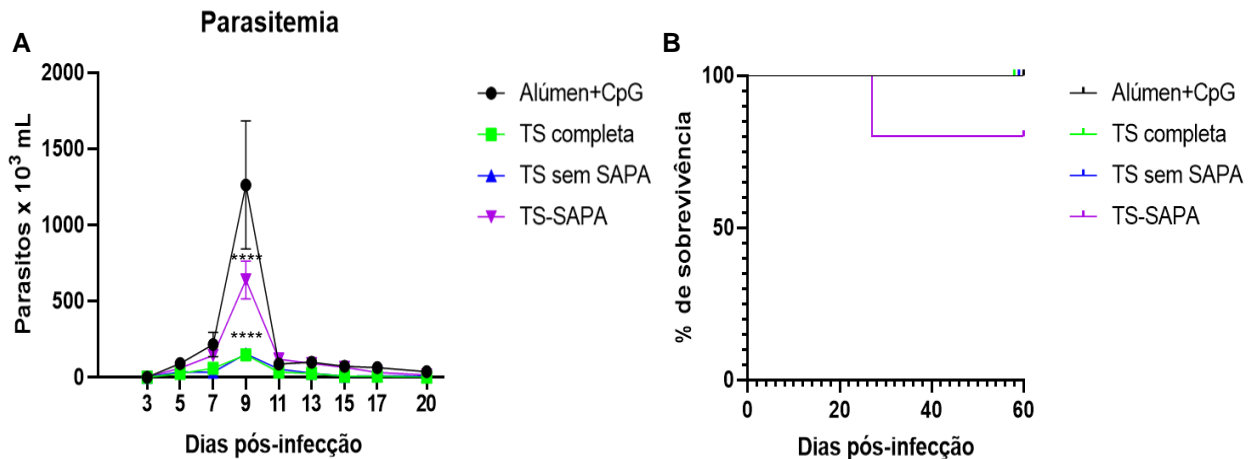


Figura 18: Parasitemia e taxas de sobrevivência dos animais imunizados após desafio com *T. cruzi*. Parasitemia de camundongos BALB/c imunizados com as proteínas recombinantes mais os adjuvantes ou apenas com os adjuvantes (Alúmen+CpG) e posteriormente desafiados com 10.000 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* (A). A análise estatística foi realizada com o método two-way ANOVA com pós-teste em Tukey (****, $P < 0,0001$ em relação ao grupo alúmen+CpG). As taxas de sobrevivência foram acompanhadas por 60 dias (B).

4.7.2 Histopatologia e parasitismo tecidual

Os corações dos animais imunizados e que sobreviveram ao desafio com a cepa Y de *T. cruzi*, foram coletados e preparados em lâminas para verificar a presença de infiltrado inflamatório, sendo que um score do nível de comprometimento foi gerado. Como observado na figura 19A, apenas o grupo dos animais imunizados com a TS sem SAPA não apresentou infiltrado inflamatório, enquanto que nos demais grupos observamos a presença de infiltrado inflamatório em níveis semelhantes ao do grupo controle (Alúmen + CpG). Tanto os animais imunizados com a TS completa quanto os animais imunizados com TS-SAPA exibiram altos scores indicando uma reação inflamatória bastante deletéria no tecido desses animais (figura 19B). O parasitismo tecidual nos corações também foi avaliado por meio da quantificação do DNA do parasito por qPCR. Assim como na histopatologia, apenas os animais imunizados com a TS sem SAPA não apresentaram níveis detectáveis de DNA, ou seja, com carga parasitária em níveis não detectáveis. Por outro lado, todos os outros grupos apresentaram níveis significativos de DNA de *T. cruzi* no tecido cardíaco, sendo que maiores níveis parecem ser observados no grupo dos animais imunizados

com a TS-SAPA, apesar de, por causa da alta variabilidade entre os animais desse grupo, não haver diferença estatística entre eles (figura 19C).

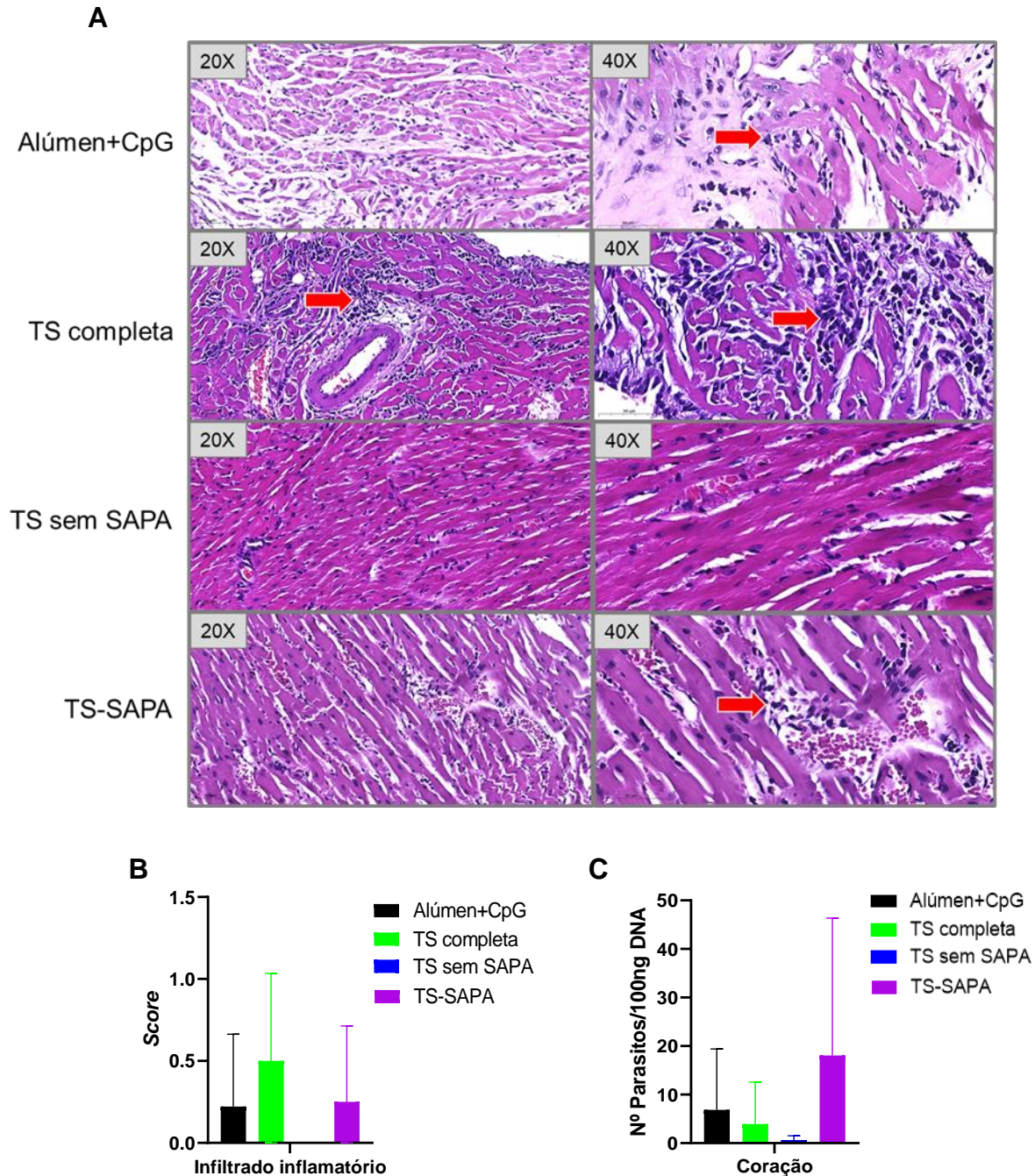


Figura 19: Histopatologia e parasitismo tecidual dos corações dos animais imunizados após desafio com *T. cruzi*. Sessenta dias após o desafio, os camundongos foram eutanasiados e os corações dos animais foram removidos para análise histopatológica e parasitismo tecidual. Microscopia óptica da biópsia dos corações corados com H&E nos aumentos de 20X e 40X (A). As setas vermelhas indicam infiltrado inflamatório focal e discreto nas amostras representativas. Score do infiltrado inflamatório (B). O DNA dos corações foi extraído e a quantidade relativa de DNA do parasito foi determinada por qPCR (C). A análise estatística foi realizada com o método two-way ANOVA com pós-teste em Tukey (*, $P < 0,05$).

4.8 Síntese de mRNA codificando TS sem repetições SAPA

As vacinas de mRNA surgiram há mais de três décadas, com o intuito de gerar vacinas seguras, versáteis e fáceis de produzir. Além disso, como vantagens, as vacinas de mRNA podem ser fabricadas de maneira livre de células, permitindo uma produção rápida, escalável e econômica (CHAUDHARY, WEISSMAN & WHITEHEAD, 2021). No nosso estudo, a imunização com a proteína recombinante TS sem repetições SAPA demonstrou ser o melhor antígeno para formulação de um modelo vacinal em comparação com os outros dois antígenos (TS completa e TS-SAPA). Sendo assim, decidimos sintetizar mRNA codificando a TS sem SAPA associado à nanopartícula lipídica para ser testado como vacina de RNA para doença de Chagas. Para isso, foi feita a clonagem da sequência codificadora da TS sem SAPA no vetor de expressão em células de mamíferos, pcDNA™3.1(+), cedido gentilmente pela Dra Gabriela Burle, contendo as sequências 5' UTR e 3' UTR do gene da α -1-globulina humana e a cauda Poli-A, a fim de ajudar no reconhecimento do ribossomo durante a tradução e dar estabilidade à molécula de mRNA, respectivamente (figura 20A). A clonagem foi confirmada pela digestão desse plasmídeo com as enzimas de restrição NdeI e XbaI e analisada por eletroforese em gel de agarose. Como mostra a figura 20B, ocorreu a liberação dos fragmentos com o número de pares de bases esperados de 4.924 e 2.634. Após isso, o vetor foi linearizado com a enzima de restrição XhoI (figura 20B) para a produção do mRNA da TS sem SAPA por transcrição *in vitro*. A transcrição foi confirmada por eletroforese em gel de agarose, gerando o fragmento de mRNA com o número de bases esperado de 2.249 (figura 20C).

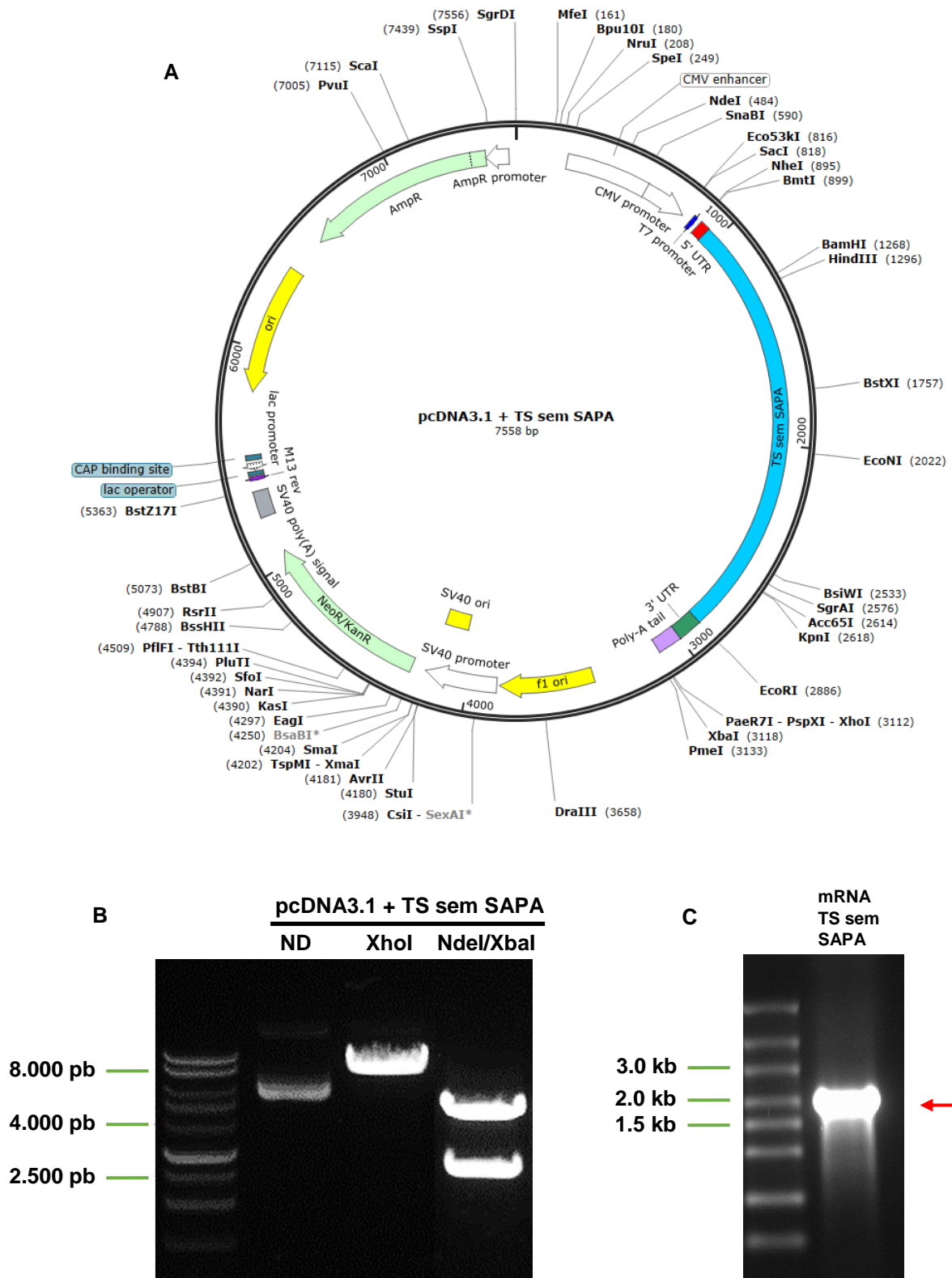


Figura 20: Clonagem da TS sem SAPA no vetor de expressão em mamíferos e sua transcrição *in vitro* em mRNA. Desenho esquemático do vetor de expressão em células de mamíferos utilizado. Vetor pcDNA™3.1(+), contendo a sequência da TS sem SAPA clonada e as regiões 5' UTR e 3' UTR da α -1-globulina humana, além da cauda Poli-A (A). Análise da clonagem da sequência da TS sem SAPA no pcDNA 3.1 (B), não digerido (ND) e após digestão com XhoI, gerando um fragmento de 7.758 pb, e com NdeI e XbaI, gerando os fragmentos de 4.924 pb e 2.634 pb em gel de agarose 0,8%. Fragmento de 2.249 bases do mRNA (seta vermelha) sintetizado da transcrição *in vitro* da sequência da TS sem SAPA no pcDNA 3.1 usando a T7 RNA polimerase em gel de agarose corado com brometo de etídio (C).

4.9 Análise da expressão da TS sem repetições SAPA em células mamíferas transfectadas com mRNA

O mRNA da TS sem SAPA sintetizado na transcrição *in vitro* foi utilizado para transfectar células HEK293T e HeLa, a fim de avaliar a sua funcionalidade. Os reagentes usados nas transfecções oferecem nanopartículas lipídicas com alta eficiência de entrega e viabilidade celular aprimorada para a mais ampla gama de células comuns e difíceis de transfectar. Após 48 horas, a transfecção foi confirmada pela visualização das células transfectadas com RFP no microscópio de fluorescência e os extratos celulares foram preparados para análise da expressão em *western blot* utilizando o anticorpo policlonal anti-TS sem SAPA. A figura 21 mostra a alta expressão da TS sem SAPA em ambas as células transfectadas com o mRNA da mesma, bem como nas células transfectadas com o pcDNA 3.1 contendo a sequência da TS sem SAPA (controle positivo).

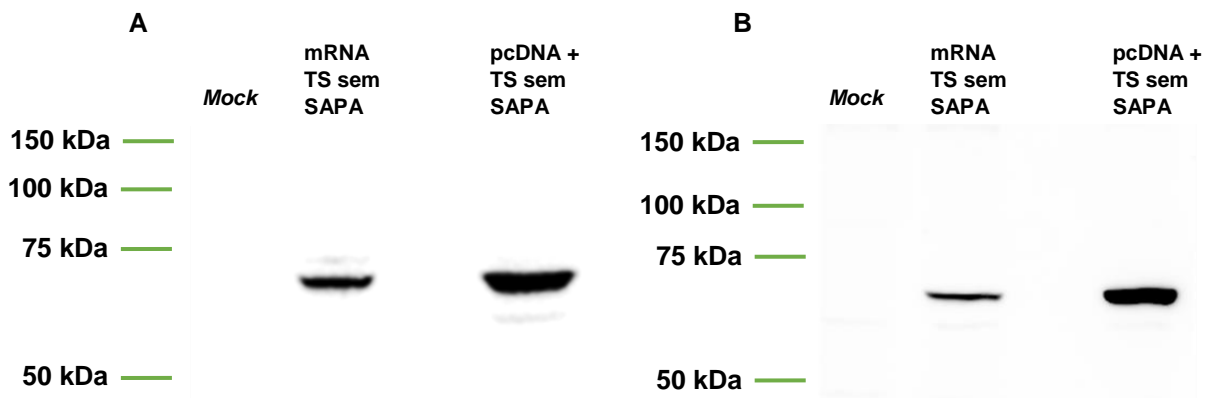


Figura 21: Análise da expressão da TS sem SAPA nas células transfectadas com seu mRNA. Após 48 horas, as células HEK293T (A) e HeLa (B) transfectadas com mRNA da TS sem SAPA e pcDNA 3.1 + TS sem SAPA foram lisadas e a preparação de extratos celulares para *western blot* foi realizada. Como controle negativo foi feita a transfecção apenas com os reagentes (*Mock*). Os extratos foram transferidos para membrana de nitrocelulose e incubados com anticorpo anti-TS sem SAPA diluído 1:500 e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase diluído 1:5.000.

5 DISCUSSÃO

A família das TS tem sido amplamente explorada nos estudos envolvendo formulações vacinais, uma vez que se apresenta como fator de virulência e possível antígeno alvo da resposta imune do hospedeiro. Como demonstrado por Giddings *et al.* (2010), a vacinação intranasal com o domínio catalítico de uma TS combinado com CpG, induziu uma forte resposta Th1 e protegeu contra o desafio sistêmico e conjuntival. A proteína ASP-2, que faz parte da família das trans-sialidases, também foi testada em diversos trabalhos de imunização e induziu uma resposta Th1 protetiva contra o *T. cruzi* (ARAÚJO *et al.*, 2005). Além disso, Pereira *et al.* (2015) usaram o adenovírus Ad5 recombinante codificando as sequências de TS e ASP-2 e testaram sua eficácia profilática e terapêutica em camundongos C57BL/6 infectados agudamente ou cronicamente com a cepa Colombiana de *T. cruzi*. Os camundongos que receberam vacina profilática, apresentaram um aumento nas células T CD8⁺ e na produção de IFN- γ , seguido por uma diminuição nas alterações elétricas cardíacas e na carga parasitária do tecido cardíaco. O tratamento terapêutico de camundongos crônicos com Ad5-TS/ASP-2 aumentou a sobrevivência, reduziu as anormalidades do eletrocardiograma, manteve as concentrações de IFN- γ e diminuiu a produção de células T CD107a⁺CD8⁺ e óxido nítrico (NO) no plasma. Portanto, as TS são apontadas como potenciais candidatas para o desenvolvimento de uma vacina para a doença de Chagas.

As trans-sialidases são importantes proteínas de superfície, que são expressas por uma família multigênica do *T. cruzi*. Dados da literatura, demonstraram que essas proteínas exercem papel como fatores de virulência e antígenos alvos do sistema imune do hospedeiro. Entretanto, estudos ainda são necessários para a melhor elucidar os mecanismos de atuação dessa família de proteínas durante a infecção pelo *T. cruzi*. A capacidade da TS ativa de transferir ácido siálico do hospedeiro para mucinas na superfície do parasito está diretamente relacionada com outros mecanismos de evasão ao sistema imune do hospedeiro. Como descrito por Burle-Caldas e colaboradores (2022), a falta de atividade da TS não afeta a invasão das células pelo parasito, bem como o escape do parasito do vacúolo parasitóforo para o citoplasma da célula hospedeira. No entanto, a ausência de atividade afeta negativamente a diferenciação das formas amastigotas em tripomastigotas e a liberação de tripomastigotas na corrente sanguínea das células infectadas.

Análises recentes do nosso grupo baseado em dados do genoma completo da cepa de referência CL Brener, revelaram a presença de 16 sequências de TS ativas, ou seja, que possuem atividade catalítica, correspondendo à uma fração de apenas 1% do repertório de genes de TS, sendo que cinco dessas sequências foram encontradas repetições SAPA e também em uma sequência de TS inativa (figura7) (BURLE-CALDAS *et al.*, 2022). Como foi demonstrado, a maioria das TS são inativas, ou seja, não possuem atividade enzimática, sendo seu papel ainda pouco explorado. Pascuale e colaboradores (2017) por meio da expressão do gene recombinante de TS inativa em parasitos com baixa virulência e ausentes para o mesmo gene (BURGOS *et al.*, 2013), observaram que a TS inativa melhorou a invasão do parasito nas células hospedeiras e aumentou a virulência *in vivo*, uma vez que os animais infectados com os parasitos expressando TS inativa apresentaram um pior *score* em relação ao grupo controle, como mostrado nas análises histopatológicas do coração e músculo esquelético. Além disso, a capacidade da TS inativa de se ligar à substratos, influenciando o processo de invasão, já foi descrito, como revisado por DC-RUBIN E SCHENKMAN (2012).

Algumas das TS possuem na sua porção C-terminal, repetições de aminoácidos denominadas “SAPA”. Apesar de não serem importantes para a função catalítica, essas repetições devem apresentar um papel importante na resposta imune do hospedeiro que ainda não está totalmente claro. Como visto na literatura, acredita-se que as repetições de aminoácidos dos antígenos possam funcionar como fatores de virulência e participar de mecanismos que colaborem no escape do parasito ao sistema imunológico do hospedeiro, conhecido como “*smokescreen*”, ou cortina de fumaça. Por exemplo, as repetições SAPA são imunodominantes e parecem impedir a produção de anticorpos contra o domínio catalítico da trans-sialidase, prevenindo a inibição da atividade da enzima e favorecendo a infecção pelo *T. cruzi* (SOTO *et al.*, 1995; KEMP *et al.*, 1987). Uma outra possível função dessas repetições, seria a de aumentar a meia vida das TS que são liberadas na corrente sanguínea pelas formas tripomastigotas, favorecendo sua exposição ao sistema imune e proporcionando a capacidade de atuar sobre as células do hospedeiro por um período maior (BUSCAGLIA *et al.*, 1999).

Buscando testar diferentes versões de uma TS como alvos para a formulação de um modelo vacinal, e partindo da hipótese das repetições SAPA atuarem como fatores de virulência, foram produzidas três versões recombinantes de uma TS: a TS

completa, correspondente à proteína completa; a TS sem SAPA, contendo apenas a porção catalítica; e a TS-SAPA correspondente ao domínio de repetição. Essas foram utilizadas para imunizar camundongos BALB/c juntamente com os adjuvantes alumínio e CpG, sendo administradas três doses com um intervalo de 21 dias entre cada uma. Os ODN CpG são reconhecidos pelo receptor TLR9, presente em células do sistema inato e leva à polarização de linfócitos T CD4⁺ para o perfil Th1, enquanto o alumínio, além de ser um bom adsorvente, estimula a resposta do tipo Th2 e a ativação de linfócitos B (BARTHOLOMEU *et al.*, 2008; GRUN E MAURER, 1989). Após 28 dias da última imunização, o soro dos animais imunizados com as diferentes proteínas foi coletado para avaliar a resposta imune humoral induzida por elas. Os dados mostraram que todas as proteínas foram capazes de induzir a produção de IgG total e predominantemente a subclasse IgG1, enquanto nenhuma delas induziu a produção de IgG2a nos animais imunizados. Embora a subclasse IgG2a (perfil Th1) seja importante para a resposta protetora contra o *T. cruzi*, Pereira-Chiocola e colaboradores (1999) observaram que as vacinas com TS recombinante produzem predominantemente uma resposta Th2 com ativação das células T CD4⁺, protegendo os camundongos imunizados. Além disso, foi observado tanto no ELISA quanto no *western blot* das proteínas incubadas contra o soro dos animais imunizados com a TS completa, a imunodominância das repetições SAPA em relação à porção catalítica da proteína, visto que o soro da TS completa reconheceu fracamente a TS sem SAPA.

Conforme já abordado, a resposta imune celular desempenha um papel de grande importância no controle da infecção pelo *T. cruzi*, com a resposta Th1 e por meio da ativação das células T CD8⁺, que irão produzir IFN- γ e, assim, ativar mecanismos microbicidas dos macrófagos, bem como sua atividade citotóxica (JUNQUEIRA *et al.*, 2010). Geralmente, a imunização com subunidades de proteína não estimula linfócitos T citotóxicos CD8⁺, uma vez que os antígenos exógenos são absorvidos por endocitose pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), gerando epítopos que são processados e apresentados exclusivamente via MHC classe II, reconhecidos apenas por células T CD4⁺. No entanto, algumas APCs são capazes de executar um processo alternativo de apresentação cruzada de antígenos exógenos via MHC classe I, apresentando aos linfócitos T CD8⁺ em um processo conhecido como “*cross-priming*” (ROCK E SHEN, 2005). Dominguez *et al.* (2011) sugeriram que em infecções parasitárias, como a doença de Chagas, a indução de uma resposta T CD8⁺ seria proveniente de peptídeos imunodominantes que podem

ser favorecidos no *cross-priming* em relação aos peptídeos subdominantes. Isso explicaria por que as células T CD8⁺ respondem apenas a um conjunto reduzido de peptídeos de TS.

A resposta imune celular foi analisada, coletando-se os baços dos animais imunizados com as diferentes versões de TS para o preparo da cultura de esplenócitos, no qual os mesmos foram reestimulados com as respectivas proteínas para a dosagem de citocinas. Houve uma maior produção de IFN- γ pelos esplenócitos dos animais que foram imunizados com a TS sem as repetições SAPA, em comparação com os esplenócitos dos animais imunizados com os outros dois antígenos. Além disso, foi observado uma maior produção de IL-10 pelos esplenócitos dos animais imunizados com a versão completa de TS, contendo as repetições SAPA, em relação aos esplenócitos dos animais imunizados com as outras duas versões da proteína. Como essas duas citocinas possuem caráter antagônico na infecção pelo *T. cruzi*, sendo IFN- γ uma citocina pró-inflamatória e essencial para a resolução da infecção, enquanto que IL-10 é uma citocina anti-inflamatória e está associada a um agravamento da mesma, os nossos dados sugerem que as repetições SAPA estariam relacionadas a uma piora no quadro de infecção. Abrahamsohn e Coffman (1996) investigaram os papéis de IL-10, TNF, IFN- γ e IL-12 no controle do parasitismo pela imunidade inata e específica. Camundongos nocautes para IL-10 foram infectados com a cepa Y de *T. cruzi*, onde foi observado um número menor de parasitos no sangue e nos tecidos, e uma maior produção de IFN- γ e NO pelos esplenócitos em comparação com os camundongos selvagens. Eles também demonstraram que o tratamento de camundongos com anti-IFN- γ , anti-TNF e anti-IL-12 aumentaram os níveis de parasitemia, sendo que os camundongos tratados com anti-IL-12 diminuíram a produção de IFN- γ e NO, sugerindo que a síntese inicial de IFN- γ é mais dependente da estimulação de IL-12. Além disso, Cardillo *et al.* (1996) observaram em esplenócitos depletados de NK, uma redução drástica de IFN- γ e um aumento da secreção de IL-10 em resposta a tripomastigotas vivos de *T. cruzi*, sugerindo que as células NK são a principal fonte de IFN- γ e que poderiam estar envolvidas na limitação da replicação do *T. cruzi* em macrófagos do hospedeiro durante a fase aguda inicial da infecção. Por outro lado, como revisado por Magalhães *et al.* (2022), na fase crônica, os indivíduos podem desenvolver uma resposta anti-inflamatória eficiente que controla a ativação celular e inflamação, levando à forma clínica indeterminada da doença de Chagas, enquanto que 30% dos indivíduos desenvolvem principalmente

um ambiente inflamatório, causando a destruição tecidual, patologia e a forma cardíaca da doença. Contudo, outros estudos com pacientes de diferentes regiões geográficas, mostraram que a forma indeterminada está associada a uma potente resposta celular, com alta expressão de IFN- γ , ao contrário da forma cardíaca que está associada a uma fraca resposta, devido à morte de células efectoras (MAGALHÃES *et al.*, 2022).

Os nossos dados mostraram também um aumento na produção de TNF- α pelos esplenócitos dos animais imunizados com a TS completa e TS sem SAPA em comparação com os esplenócitos imunizados com a TS-SAPA. Essa maior produção pode estar associada à maior redução da parasitemia pelos animais imunizados com essas proteínas e desafiados, em relação àqueles imunizados com o domínio repetitivo (figura 18). Como visto por Silva *et al.* (1995), essa citocina é produzida por macrófagos ativados por IFN- γ após a infecção por *T. cruzi* e foi demonstrado que ela pode desempenhar um papel protetor por meio da amplificação na produção de NO e consequente morte do parasito. Em conjunto, nossos resultados mostraram que os animais imunizados com a TS sem repetições SAPA desenvolveram um perfil de resposta Th1 mais forte, que é essencial para o controle da infecção pelo *T. cruzi*.

Após o desafio dos animais imunizados, avaliamos a capacidade protetora das proteínas, verificando-se uma redução quase total da parasitemia pelos animais imunizados com a TS completa e TS sem SAPA em relação ao grupo controle, enquanto os animais imunizados com a TS-SAPA reduziram apenas metade da parasitemia. Vale ressaltar que em uma das repetições do experimento, houve uma exacerbação da parasitemia em 100% pelos animais imunizados com a proteína TS-SAPA. Os dados de sobrevivência, sugerem uma maior severidade da infecção nos animais imunizados com TS-SAPA. Os nossos resultados são similares daqueles obtidos por Toro *et al.* (2017), que também avaliaram a imunização de um domínio repetitivo da proteína denominada TcL7a. Toro e colaboradores observaram que os animais imunizados com o domínio repetitivo exibiram uma parasitemia exacerbada comparada aos outros grupos e 100% de mortalidade após a infecção com *T. cruzi*. Além disso, nossas análises histopatológicas das lâminas dos corações dos animais, revelaram a presença de infiltrado inflamatório em todos os grupos dos animais imunizados, exceto no grupo que foi imunizado com a TS sem as repetições SAPA, assim como nesse mesmo grupo não foi identificado nível de carga parasitária em relação aos corações dos demais grupos. A detecção de material genético (por qPCR)

e antígenos (por imuno-histoquímica) do *T. cruzi* em associação com infiltrados inflamatórios sugere a participação direta do parasito na formação e perpetuação das lesões teciduais e perda de funcionalidade dos órgãos na doença de Chagas (LANNES-VIEIRA, 2017). De modo geral, os nossos resultados demonstraram o papel imunomodulador das repetições SAPA em favor do *T. cruzi* no sistema imune do hospedeiro e a imunização com esse domínio repetitivo provocou um pior quadro de infecção. Assim, os nossos dados sugerem que a TS-SAPA poderia de alguma forma não estar sendo apresentada de forma cruzada via MHC de classe I, devido à geração de peptídeos com pouca avidéz e capacidade de interação com essas moléculas, provocando uma multiplicação policlonal de linfócitos B e direcionando a reposta imune para o perfil Th2. Experimentos futuros de citometria de fluxo podem esclarecer quais vias as repetições SAPA estariam desencadeando durante a reposta imune no hospedeiro. Apesar dos dados obtidos até o momento não terem permitido elucidar de forma clara os mecanismos pelos quais a presença do domínio SAPA nas TS provocaria um direcionamento para o perfil Th2, não protetor, da resposta imune à infecção, esses dados sugerem fortemente que um antígeno vacinal contendo somente sequências do domínio catalítico das TS, não incluindo o domínio SAPA, pode resultar em um efeito protetor mais significativo.

As vacinas de mRNA, hoje largamente usada na população mundial, representam uma alternativa importante para proteção contra infecções por estimularem uma resposta imune celular especialmente eficiente. Somado a isso, elas oferecem uma plataforma versátil para otimização e refinamento de sequências através de um processo de reengenharia das sequências. Ainda, uma única vacina de mRNA pode codificar múltiplos antígenos, fortalecendo a resposta imune contra patógenos resilientes e permitindo o direcionamento de múltiplos micróbios ou variantes virais com uma única formulação (CHAUDHARY, WEISSMAN & WHITEHEAD, 2021). Entretanto, além das vacinas para COVID-19, são ainda poucos os exemplos de sucesso descritos, mesmo em testes pré-clínicos para doenças infecciosas. Em 2018, Duthie *et al.* descreveram um esquema de imunização heteróloga *prime-boost* utilizando o RNA expressando a proteína LEISH-F2 e a subunidade proteica, o qual foi capaz de proteger contra o desafio com *Leishmania donovani* e induziu uma reposta potente de células T CD4⁺ e CD8⁺ específicas de antígenos para proteção contra patógenos intracelulares. Interessantemente, Mallory *et al.* (2021) verificaram que a imunização com o mRNA expressando a proteína

PfCSP associado à LNP, exibiu proteção estéril contra a infecção com duas cepas transgênicas de *Plasmodium berghei*, indicando ser um candidato à vacina contra malária com vários fatores que afetam a eficácia protetora.

Um dos grandes desafios para desenvolver uma vacina, seja recombinante, seja vacina de RNA ou em outra plataforma vacinal, contra a doença de Chagas é devido à grande diversidade genética das cepas do *T. cruzi*, bem como fatores individuais do hospedeiro. Tanto fatores genéticos quanto a modulação de diferentes ambientes imunológicos levam à progressão da doença. Essa heterogeneidade do parasito e alta variabilidade antigênica é também uma característica de outras infecções parasitárias, como leishmaniose, malária e doença do sono, motivo pelo qual, apesar de muitos esforços, nenhuma vacina eficaz ainda foi desenvolvida (MAGALHÃES *et al.*, 2022). Além disso, o longo período de desenvolvimento das formas sintomáticas da doença de Chagas, após a resolução da fase aguda, dificulta a avaliação da eficácia de uma vacina profilática para o desenvolvimento da doença crônica. O uso de novas ferramentas como proteômica e análise de célula única certamente ajudarão a esclarecer esses pontos-chaves. Para ter uma vacina universal para a doença de Chagas, seria necessário identificar antígenos conservados nas múltiplas linhagens do parasito (CAMARGO *et al.*, 2022). As formulações utilizando mRNA são bastante promissoras, uma vez que ao contrário da imunização com proteínas, induzem uma forte resposta de células T CD8⁺, provavelmente devido à apresentação mais eficiente de antígenos produzidos endogenamente na célula pelas moléculas MHC de classe I, além de uma potente resposta de células T CD4⁺. Adicionalmente, vacinas de mRNA mostraram a capacidade de gerar potentes respostas de anticorpos neutralizantes em animais com apenas uma ou duas imunizações de baixa dose (PARDI *et al.*, 2018).

Como a TS sem as repetições SAPA foi o antígeno que desempenhou melhor proteção, analisando o conjunto dos nossos resultados, decidimos realizar a síntese de seu mRNA associado a uma nanopartícula lipídica para ser testado como modelo vacinal para doença de Chagas. Por meio da transfecção do mRNA da TS sem SAPA em células mamíferas, foi verificada uma alta expressão da proteína, devido às regiões 5' UTR e 3' UTR do gene da α -1-globulina humana presentes no mRNA, que auxiliam na identificação do ribossomo durante a tradução. O próximo passo é a formulação da nanopartícula lipídica (LNP) que tem como função a proteção do mRNA contra a degradação, imunoestimulação e entrega intracelular eficiente. LNPs

normalmente incluem quatro componentes: um lipídio ionizável, colesterol, um fosfolipídio auxiliar e um lipídio peguado, que juntos, encapsulam e protegem o frágil núcleo de mRNA (CHAUDHARY, WEISSMAN & WHITEHEAD, 2021). Essa etapa do processo de desenvolvimento de vacinas de RNA é uma das mais desafiadoras e grande parte do sucesso da vacina depende dela. Assim, pretendemos prosseguir com essas etapas a fim de avaliar a imunogenicidade em animais que serão imunizados com diferentes formulações lipídicas contendo o mRNA da TS sem SAPA e também avaliar sua proteção quando desafiados com uma cepa virulenta de *T. cruzi*. Nossos resultados mostraram a TS sem repetições SAPA como um antígeno promissor para o desenvolvimento de uma vacina contra a doença de Chagas, apresentando uma resposta imune celular do tipo Th1 que é crucial para o controle da infecção pelo *T. cruzi*, enquanto que a imunização com o domínio repetitivo, contendo apenas as repetições SAPA, mostrou um pior prognóstico da infecção, apontando seu papel como fator de virulência.

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

As Trans-sialidases são importantes fatores de virulência do *T. cruzi* e se destacam como antígenos promissores para formulações vacinais, sendo que algumas delas possuem repetições de aminoácidos denominadas SAPA. Estudos indicam que essas repetições teriam como função a modulação do sistema imune, favorecendo a infecção pelo parasito e evasão do mesmo ao sistema imune do hospedeiro. No presente trabalho, a imunização com TS recombinante e suas versões truncadas, sem repetições SAPA e apenas com o domínio repetitivo, induziu a produção predominante de IgG1, indicando que a resposta humoral não é protetora, com evidente imunodominância das repetições SAPA. Em relação à resposta imune celular, os animais imunizados com a TS sem SAPA produziram maiores níveis de IFN- γ e menores de IL-10 em comparação com os animais imunizados com a TS completa, indicando que as repetições SAPA atuam como um fator que prejudica o desenvolvimento de uma resposta Th1 mais potente. A capacidade protetora da imunização com as proteínas foi avaliada após o desafio com uma cepa virulenta do *T. cruzi*, no qual os animais imunizados com a TS-SAPA mostraram uma menor redução da parasitemia, maior mortalidade e um maior nível de carga parasitária no coração em relação aos animais imunizados com os outros dois antígenos. Interessantemente, os animais imunizados com a TS sem SAPA não apresentaram infiltrado inflamatório e nem níveis detectáveis de carga parasitária no coração, demonstrando que as repetições SAPA levam à um pior cenário de infecção. Considerando nossos resultados, como a TS sem SAPA foi a versão que conferiu maior proteção nas imunizações, foi realizada a síntese de seu mRNA por transcrição *in vitro*, em que altos níveis de expressão do antígeno foram verificados por meio da transfecção em células HEK293T e HeLa. Experimentos futuros serão realizados utilizando a formulação contendo o mRNA da TS sem SAPA associado à nanopartícula lipídica para imunizar animais, a fim de avaliar a imunogenicidade e a proteção após desafio com uma cepa virulenta de *T. cruzi*. Portanto, nossos dados sugerem que a TS sem SAPA é um antígeno candidato para ser usado em estratégias vacinais contra a doença de Chagas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMSOHN, I.A., COFFMAN, R.L., 1996. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. **Exp Parasitol** 84, 231–244. <https://doi.org/10.1006/expr.1996.0109>
- ARAÚJO, A.F.S., DE ALENCAR, B.C.G., VASCONCELOS, J.R.C. *et al.*, 2005. CD8+ T-cell-dependent control of *Trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible mouse strain after immunization with recombinant proteins based on amastigote surface protein 2. **Infect Immun** 73, 6017-6025. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.9.6017-6025.2005>
- BARBOSA, R.P.A., FILHO, B.G., DOS SANTOS, L.I. *et al.*, 2013. Vaccination using recombinants influenza and adenoviruses encoding amastigote surface protein-2 are highly effective on protection against *Trypanosoma cruzi* infection. **PLoS One** 8, e61795. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061795>
- BARTHOLOMEU, D.C., ROPERT, C., MELO, M.B., PARROCHE, P. *et al.*, 2008. Recruitment and endo-lysosomal activation of TLR9 in dendritic cells infected with *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol** 181, 1333–1344. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.2.1333>
- BHATIA V, WEN J, ZACKS M, GARG N, 2009 American trypanosomiasis and perspectives on vaccine development In: Stanberry LR, Barrett AD (Eds.), Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases. **Academic Press**, New 1407–1434.
- BELEW, A.T., JUNQUEIRA, C., RODRIGUES-LUIZ, G.F., VALENTE, B.M. *et al.*, 2017. Comparative transcriptome profiling of virulent and non-virulent *Trypanosoma cruzi* underlines the role of surface proteins during infection. **PLoS Pathog** 13, e1006767. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006767>
- BIVONA, A.E., ALBERTI, A.S., CERNY, N., TRINITARIO, S.N., MALCHIODI, E.L., 2020. Chagas disease vaccine design: the search for an efficient *Trypanosoma cruzi* immune-mediated control. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis** 1866, 165658. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.165658>
- BURGOS, J.M., RISSO, M.G., BRENIÈRE, S.F., BARNABÉ, C., CAMPETELLA, O., LEGUIZAMÓN, M.S., 2013. Differential distribution of genes encoding the virulence factor trans-sialidase along *Trypanosoma cruzi* Discrete typing units. **PLoS One** 8, e58967. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058967>
- BURLE-CALDAS, G. DE A., DOS SANTOS, N.S.A., DE CASTRO, J.T. *et al.*, 2022. Disruption of Active Trans-Sialidase Genes Impairs Egress from Mammalian Host Cells and Generates Highly Attenuated *Trypanosoma cruzi* Parasites. **mBio** 13, e03478-21. <https://doi.org/10.1128/mbio.03478-21>

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

BUSCAGLIA, C.A., CAMPO, V.A., FRASCH, A.C.C., DI NOIA, J.M., 2006. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. **Nat Rev Microbiol** 4, 229–236. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1351>

CAI, C.W., O'SHEA, A., EICKHOFF, C.S. *et al.*, 2022. Use of *Leishmania major* parasites expressing a recombinant *Trypanosoma cruzi* antigen as live vaccines against Chagas disease. **Front Microbiol** 13, 1059115. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1059115>

CALLEJAS-HERNÁNDEZ, F., RASTROJO, A., POVEDA, C. *et al.*, 2018. Genomic assemblies of newly sequenced *Trypanosoma cruzi* strains reveal new genomic expansion and greater complexity. **Sci Rep** 8, 14631. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32877-2>

CAMARGO, E.P., GAZZINELLI, R.T., MOREL, C.M., PRECIOSO, A.R., 2022. Why do we still have not a vaccine against Chagas disease?. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 117, e200314. <https://doi.org/10.1590/0074-02760200314>

CANÇADO, J.R., 1999. Criteria of Chagas disease cure. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 94 Suppl 1, 331–335. <https://doi.org/10.1590/s0074-02761999000700064>

CARDILLO, F., VOLTARELLI, J.C., REED, S.G., SILVA, J.S., 1996. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. **Infect Immun** 64, 128–134. <https://doi.org/10.1128/iai.64.1.128-134.1996>

CHAUDHARY, N., WEISSMAN, D., WHITEHEAD, K.A., 2021. mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation. **Nat Rev Drug Discov** 20, 817–838. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00283-5>

CHOW, Y.H., CHIANG, B.L., LEE, Y.L. *et al.*, 1998. Development of Th1 and Th2 populations and the nature of immune responses to hepatitis B virus DNA vaccines can be modulated by codelivery of various cytokine genes. **J Immunol** 160, 1320–1329.

CHURA-CHAMBI, R.M., DA SILVA, C.M.R., PEREIRA, L.R., *et al.*, 2019. Protein refolding based on high hydrostatic pressure and alkaline pH: Application on a recombinant dengue virus NS1 protein. **PLoS One** 14, e0211162. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211162>

CLAYTON, J., 2010. Chagas disease 101. **Nature** 465, S4-5. <https://doi.org/10.1038/nature09220>

DAROCHA, W.D., BARTHOLOMEU, D.C., MACÊDO, C.D.S., HORTA, M.F. *et al.*, 2002. Characterization of cDNA clones encoding ribonucleoprotein antigens expressed in *Trypanosoma cruzi* amastigotes. **Parasitol Res** 88, 292–300. <https://doi.org/10.1007/s00436-001-0540-0>

DC-RUBIN, S.S.C., SCHENKMAN, S., 2012. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase as a multifunctional enzyme in Chagas' disease. **Cell Microbiol** 14, 1522–1530. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01831.x>

DE SOUZA, W., DE CARVALHO, T.M.U., BARRIAS, E.S., 2010. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. **Int J Cell Biol** 2010, 295394. <https://doi.org/10.1155/2010/295394>

DOMINGUEZ, M.R., SILVEIRA, E.L.V., DE VASCONCELOS, J.R.C. *et al.*, 2011. Subdominant/cryptic CD8 T cell epitopes contribute to resistance against experimental infection with a human protozoan parasite. **PLoS One** 6, e22011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022011>

DUMONTEIL, E., 2007. DNA Vaccines against Protozoan Parasites: Advances and Challenges. **J Biomed Biotechnol** 2007, 90520. <https://doi.org/10.1155/2007/90520>

DUMONTEIL, E., ESCOBEDO-ORTEGON, J., REYES-RODRIGUEZ, N. *et al.*, 2004. Immunotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection with DNA vaccines in mice. **Infect Immun** 72, 46–53. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.1.46-53.2004>

DUTHIE, M.S., GUDERIAN, J.A., VALLUR, A.C., MISQUITH, A. *et al.*, 2016. Multi-epitope proteins for improved serological detection of *Trypanosoma cruzi* infection and Chagas Disease. **Diagn Microbiol Infect Dis** 84, 191–196. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.11.006>

DUTHIE, M.S., VAN HOEVEN, N., MACMILLEN, Z., PICONE, A. *et al.*, 2018. Heterologous Immunization With Defined RNA and Subunit Vaccines Enhances T Cell Responses That Protect Against *Leishmania donovani*. **Front Immunol** 9, 2420. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02420>

EL-SAYED, N.M., MYLER, P.J., BARTHOLOMEU, D.C. *et al.*, 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science** 309, 409–415. <https://doi.org/10.1126/science.1112631>

FERNANDES, M.C., ANDREWS, N.W., 2012. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. **FEMS Microbiol Rev** 36, 734–747. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00333.x>

FONTANELLA, G.H., DE VUSSER, K., LAROY, W., DAURELIO, L. *et al.*, 2008. Immunization with an engineered mutant trans-sialidase highly protects mice from experimental *Trypanosoma cruzi* infection: a vaccine candidate. **Vaccine** 26, 2322–2334. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.02.060>

FRASCH, A.C., 2000. Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol Today** 16, 282–286. [https://doi.org/10.1016/s0169-4758\(00\)01698-7](https://doi.org/10.1016/s0169-4758(00)01698-7)

FREITAS, L.M., DOS SANTOS, S.L., RODRIGUES-LUIZ, G.F. *et al.*, 2011. Genomic analyses, gene expression and antigenic profile of the trans-sialidase superfamily of *Trypanosoma cruzi* reveal an undetected level of complexity. **PLoS One** 6, e25914. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025914>

GIDDINGS, O.K., EICKHOFF, C.S., SULLIVAN, N.L., HOFT, D.F., 2010. Intranasal vaccinations with the trans-sialidase antigen plus CpG Adjuvant induce mucosal immunity protective against conjunctival *Trypanosoma cruzi* challenges. **Infect Immun** 78, 1333–1338. <https://doi.org/10.1128/IAI.00278-09>

GRUN, J.L., MAURER, P.H., 1989. Different T helper cell subsets elicited in mice utilizing two different adjuvant vehicles: the role of endogenous interleukin 1 in proliferative responses. **Cell Immunol** 121, 134–145. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(89\)90011-7](https://doi.org/10.1016/0008-8749(89)90011-7)

HEMMI, H., TAKEUCHI, O., KAWAI, T. *et al.*, 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. **Nature** 408, 740–745. <https://doi.org/10.1038/35047123>

HERREROS-CABELLO, A., CALLEJAS-HERNÁNDEZ, F., GIRONÈS, N., FRESNO, M., 2020. *Trypanosoma cruzi* Genome: Organization, Multi-Gene Families, Transcription, and Biological Implications. **Genes (Basel)** 11, 1196. <https://doi.org/10.3390/genes11101196>

HOFT, D.F., EICKHOFF, C.S., GIDDINGS, O.K. *et al.*, 2007. Trans-sialidase recombinant protein mixed with CpG motif-containing oligodeoxynucleotide induces protective mucosal and systemic *Trypanosoma cruzi* immunity involving CD8+ CTL and B cell-mediated cross-priming. **J Immunol** 179, 6889–6900. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.10.6889>

JOSELI LANNES-VIEIRA. **Patogenia – Portal da Doença de Chagas**. Disponível em: < <http://chagas.fiocruz.br/doenca/patogenia/> > Acesso em: 29 mar. 2023.

JUNQUEIRA, C., CAETANO, B., BARTHOLOMEU, D.C. *et al.*, 2010. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert Rev Mol Med** 12, e29. <https://doi.org/10.1017/S1462399410001560>

- JUNQUEIRA, C., GUERRERO, A.T., GALVÃO-FILHO, B. *et al.*, 2012. *Trypanosoma cruzi* adjuvants potentiate T cell-mediated immunity induced by a NY-ESO-1 based antitumor vaccine. **PLoS One** 7, e36245. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036245>
- KALITA, M.K., RAMASAMY, G., DURAISAMY, S. *et al.*, 2006. ProtRepeatsDB: a database of amino acid repeats in genomes. **BMC Bioinformatics** 7, 336. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-336>
- KEMP, D.J., COPPEL, R.L., ANDERS, R.F., 1987. Repetitive proteins and genes of malaria. **Annu Rev Microbiol** 41, 181–208. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.41.100187.001145>
- KRAMMER, F., 2020. SARS-CoV-2 vaccines in development. **Nature** 586, 516–527. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2798-3>
- LOW, H.P., SANTOS, M.A., WIZEL, B., TARLETON, R.L., 1998. Amastigote surface proteins of *Trypanosoma cruzi* are targets for CD8+ CTL. **J Immunol** 160, 1817–1823.
- MAGALHÃES, L.M.D, GOLLOB, K.J., ZINGALES, B., DUTRA, W.O., 2022. Pathogen diversity, immunity, and the fate of infections: lessons learned from *Trypanosoma cruzi* human–host interactions. **Lancet Microbe** 3, 711-722. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00265-2](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00265-2)
- MALLORY, K.L., TAYLOR, J.A., ZOU, X., WAGHELA, I.N. *et al.*, 2021. Messenger RNA expressing PfCSP induces functional, protective immune responses against malaria in mice. **NPJ Vaccines** 6, 84. <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00345-0>
- MÉDECINS SANS FRONTIÈRES. Campaign for Access to Essential Medicines, 2008. International meeting: new diagnostic tests are urgently needed to treat patients with Chagas disease. **Rev Soc Bras Med Trop** 41, 315–319. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822008000300020>
- MENDES, T. A. O., LOBO, F.P., RODRIGUES, T.S. *et al.*, 2013. Repeat-enriched proteins are related to host cell invasion and immune evasion in parasitic protozoa. **Mol Biol Evol** 30, 951–963. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst001>
- MOR, G., KLINMAN, D.M., SHAPIRO, S., HAGIWARA, E. *et al.*, 1995. Complexity of the cytokine and antibody response elicited by immunizing mice with *Plasmodium yoelii* circumsporozoite protein plasmid DNA. **J Immunol** 155, 2039–2046.
- PAIS, F.S., DAROCHA, W.D., ALMEIDA, R.M. *et al.*, 2008. Molecular characterization of ribonucleoproteic antigens containing repeated amino acid sequences from *Trypanosoma cruzi*. **Microbes Infect** 10, 716–725. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.03.005>

PARDI, N., HOGAN, M.J., PORTER, F.W., WEISSMAN, D., 2018. mRNA vaccines—a new era in vaccinology. **Nat Rev Drug Discov** 17, 261–279. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.243>

PARODI, A.J., POLLEVICK, G.D., MAUTNER, M. *et al.*, 1992. Identification of the gene(s) coding for the trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi*. **EMBO J** 11, 1705–1710. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05221.x>

PASCUALE, C.A., BURGOS, J.M., POSTAN, M. *et al.*, 2017. Inactive trans-Sialidase Expression in iTS-null *Trypanosoma cruzi* Generates Virulent Trypomastigotes. **Front Cell Infect Microbiol** 7, 430. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00430>

PEREIRA, I.R., VILAR-PEREIRA, G., MARQUES, V. *et al.*, 2015. A human type 5 adenovirus-based *Trypanosoma cruzi* therapeutic vaccine re-programs immune response and reverses chronic cardiomyopathy. **PLoS Pathog** 11, e1004594. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004594>

PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L., ACOSTA-SERRANO, A., CORREIA DE ALMEIDA, I. *et al.*, 2000. Mucin-like molecules form a negatively charged coat that protects *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes from killing by human anti-alpha-galactosyl antibodies. **J Cell Sci** 113 (Pt 7), 1299–1307. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.7.1299>

PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L., COSTA, F., RIBEIRÃO, M. *et al.*, 1999. Comparison of antibody and protective immune responses against *Trypanosoma cruzi* infection elicited by immunization with a parasite antigen delivered as naked DNA or recombinant protein. **Parasite Immunol** 21, 103–110. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1999.00201.x>

QUIJANO-HERNANDEZ, I., DUMONTEIL, E., 2011. Advances and challenges towards a vaccine against Chagas disease. **Hum Vaccin** 7, 1184–1191. <https://doi.org/10.4161/hv.7.11.17016>

RASSI, A., RASSI, A., MARIN-NETO, J.A., 2010. Chagas disease. **Lancet** 375, 1388–1402. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)

RIOS, L.E., VÁZQUEZ-CHAGOYÁN, J.C., PACHECO, A.O., ZAGO, M.P., GARG, N.J., 2019. Immunity and vaccine development efforts against *Trypanosoma cruzi*. **Acta Trop** 200, 105168. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105168>

ROCK, K.L., SHEN, L., 2005. Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. **Immunol Rev** 207, 166–183. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00301.x>

RODRIGUES, M.M., RIBEIRÃO, M., PEREIRA-CHIOCCOLA, V., RENIA, L., COSTA, F., 1999. Predominance of CD4 Th1 and CD8 Tc1 cells revealed by characterization of the cellular immune response generated by immunization with a DNA vaccine containing a *Trypanosoma cruzi* gene. **Infect Immun** 67, 3855–3863. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.8.3855-3863.1999>

RODRÍGUEZ-MORALES, O., MONTEÓN-PADILLA, V., CARRILLO-SÁNCHEZ, S.C. *et al.*, 2015. Experimental Vaccines against Chagas Disease: A Journey through History. **J Immunol Res** 2015, 489758. <https://doi.org/10.1155/2015/489758>

SANCHEZ-BURGOS, G., MEZQUITA-VEGA, R.G., ESCOBEDO-ORTEGON, J. *et al.*, 2007. Comparative evaluation of therapeutic DNA vaccines against *Trypanosoma cruzi* in mice. **FEMS Immunol Med Microbiol** 50, 333–341. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00251.x>

SÁNCHEZ-VALDÉZ, F.J., PÉREZ BRANDÁN, C., FERREIRA, A., BASOMBRÍO, M.Á., 2015. Gene-deleted live-attenuated *Trypanosoma cruzi* parasites as vaccines to protect against Chagas disease. **Expert Rev Vaccines** 14, 681–697. <https://doi.org/10.1586/14760584.2015.989989>

SANGENIS, L.H.C., NIELEBOCK, M.A.P., SANTOS, C. DA S. *et al.*, 2016. Chagas disease transmission by consumption of game meat: systematic review. **Rev Bras Epidemiol** 19, 803–811. <https://doi.org/10.1590/1980-5497201600040010>

SCHIJMAN, A.G., BISIO, M., ORELLANA, L., *et al.*, 2011. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. **PLoS Negl Trop Dis** 5, e931. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000931>

SERNA, C., LARA, J.A., RODRIGUES, S.P., MARQUES, A.F. *et al.*, 2014. A synthetic peptide from *Trypanosoma cruzi* mucin-like associated surface protein as candidate for a vaccine against Chagas disease. **Vaccine** 32, 3525–3532. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.04.026>

SILVA, J.S., VESPA, G.N., CARDOSO, M.A., ALIBERTI, J.C., CUNHA, F.Q., 1995. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. **Infect Immun** 63, 4862–4867. <https://doi.org/10.1128/iai.63.12.4862-4867.1995>

SOTO, M., REQUENA, J.M., QUIJADA, L. *et al.*, 1995. During active viscerocutaneous leishmaniasis the anti-P2 humoral response is specifically triggered by the parasite P proteins. **Clin Exp Immunol** 100, 246–252. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1995.tb03661.x>

TARLETON, R.L., 1990. Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol** 144, 717–724.

TARLETON, R.L., KOLLER, B.H., LATOUR, A., POSTAN, M., 1992. Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Nature** 356, 338–340. <https://doi.org/10.1038/356338a0>

TOMLINSON, S., PONTES DE CARVALHO, L.C., VANDEKERCKHOVE, F., NUSSENZWEIG, V., 1994. Role of sialic acid in the resistance of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to complement. **J Immunol** 153, 3141–3147.

TORO ACEVEDO, C.A., VALENTE, B.M., BURLE-CALDAS, G.A. *et al.*, 2017. Down Modulation of Host Immune Response by Amino Acid Repeats Present in a *Trypanosoma cruzi* Ribosomal Antigen. **Front Microbiol** 8, 2188. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02188>

VÁZQUEZ-CHAGOYÁN, J.C., GUPTA, S., GARG, N.J., 2011. Vaccine development against *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease. **Adv Parasitol** 75, 121–146. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385863-4.00006-X>

VUITIKA, L., PRATES-SYED, W.A., SILVA, J.D.Q. *et al.*, 2022. Vaccines against Emerging and Neglected Infectious Diseases: An Overview. **Vaccines (Basel)** 10, 1385. <https://doi.org/10.3390/vaccines10091385>

WIZEL, B., NUNES, M., TARLETON, R.L., 1997. Identification of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase family members as targets of protective CD8+ TC1 responses. **J Immunol** 159, 6120–6130.

ZAPATA-ESTRELLA, H., HUMMEL-NEWELL, C., SANCHEZ-BURGOS, G. *et al.*, 2006. Control of *Trypanosoma cruzi* infection and changes in T-cell populations induced by a therapeutic DNA vaccine in mice. **Immunol Lett** 103, 186–191. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2005.11.015>

WHO (2023). Chagas disease (American trypanosomiasis). **World Health Organization**. 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: 15 jan. 2023.