

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

Nailma Silva aprigio dos Santos

**TRANS-SIALIDASE RECOMBINANTE DE *TRYPANOSOMA CRUZI* E
PARASITOS NOCAUTES PARA TRANS-SIALIDASES COMO MODELOS DE
VACINAS PARA DOENÇA DE CHAGAS**

Belo Horizonte

2023

Nailma Silva Aprigio dos Santos

**TRANS-SIALIDASE RECOMBINANTE DE *TRYPANOSOMA CRUZI* E
PARASITOS NOCAUTES PARA TRANS-SIALIDASES COMO MODELOS DE
VACINAS PARA DOENÇA DE CHAGAS**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutor (a) em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Santuza Maria Ribeiro Teixeira

Coorientadora: Caroline Furtado Junqueira

Belo Horizonte

2023

043

Santos, Nailma Silva Aprigio dos.

Trans-sialidase recombinante de *Trypanosoma cruzi* e parasitos nocautes para trans-sialidases como modelos de vacinas para doença de Chagas [manuscrito] / Nailma Silva Aprigio dos Santos. – 2020.

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

Orientadora: Santuza Maria Ribeiro Teixeira. Coorientadora: Caroline Furtado Junqueira.

Tese (doutorado) – 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. I. Teixeira, Santuza Maria Ribeiro. II. Giusta, Caroline Junqueira. 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 TESE DE DOUTORADO DE NAILMA SILVA APRIGIO DOS SANTOS. Aos vinte e nove dias do mês de junho de 2020 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Trans-sialidase recombinante de *Trypanosoma cruzi* e parasitos nocautes para trans-sialidasas como modelos de vacinas para doença de Chagas", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Biologia Molecular. 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 à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Alexandre de Magalhães Vieira Machado (Centro de Pesquisas René Rachou - Fiocruz-MG), aprovada; Dr. Edmundo Carlos Grisard (Universidade Federal de Santa Catarina), aprovada; Dr. Lucia Mendonça Previato (Universidade Federal do Rio de Janeiro), aprovada; Dr. Luis Henrique Franco (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Caroline Junqueira Giusta - Coorientadora (Centro de Pesquisas René Rachou - Fiocruz-MG), aprovada; Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata 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, 29 de junho de 2020.

Dr. Alexandre de Magalhães Vieira Machado (Centro de Pesquisas René Rachou - Fiocruz-MG)

Dr. Edmundo Carlos Grisard (Universidade Federal de Santa Catarina)

Digitally signed by
 Edmundo Carlos
 Grisard:57331901915
 Date: 2020.07.06
 15:56:30 -03'00'

Dra. Lucia Mendonça Previato (Universidade Federal do Rio de Janeiro)

Dr. Luis Henrique Franco (UFMG)

Digitally signed by Luis Henrique Franco
 DN: cn=Luis Henrique Franco, o=UFMG,
 ou=Universidade Federal de Minas Gerais,
 ou=Departamento de Bioquímica e
 Imunologia, email=lfranco@icb.ufmg.br
 Date: 2020.07.07 09:33:35 -03'00'

Dra. Caroline Junqueira Giusta - Coorientadora (Centro de Pesquisas René Rachou - Fiocruz-MG)

Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira - Orientadora (UFMG)

Agradecimentos

À Deus, guia da minha vida.

À professora Santuza pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pelos ensinamentos e confiança.

À minha coorientadora Caroline Junqueira por discussões e ideias sobre o projeto.

À Professora Jane Lima do Santos, por ter me incentivado e motivado na pesquisa desde a iniciação científica e por ter sido canal para minha entrada no lab.

Ao professor Ricardo Gazzinelli por ceder o espaço do seu laboratório e reagentes para os testes imunológicos, além de contribuir com ideias neste trabalho.

Aos alunos do Laim do Instituto René Rachou, em especial a Júlia Castro por toda a ajuda com os experimentos com animais e testes imunológicos, Guilherme de Castro pela ajuda com imunizações e parasitemia e Milton Pereira pela ajuda com as imunofluorescências.

Ao aluno de iniciação Carlos Almeida, por toda ajuda durante os experimentos, pelas conversas e amizade.

À Dr^a Gabriela Burle Caldas e à Dr^a Viviane Grazielle por todas as ajudas nos experimentos.

À Renata Peixoto pelas ajudas durante as infecções *in vitro*, e por nos ajudar no lab com o preparo de meios e com os repiques das células.

Aos profissionais do Centro de tecnologia em vacinas, CT-Vacinas, em especial à Natália Salazar pelas ajudas nas purificações de proteínas e ao Alex Fiorini pela ajuda com as qPCRs.

À professora Patiu por sempre estar a disposição para conversas e para emprestar reagentes do seu laboratório.

A todos os colegas do laboratório da professora Santuza pela amizade, companherismo, momentos de descontração e ajuda quando precisei: Carlos Almeida, Rafael, Vivi, Gabi, Carlos Esteves, Edson, Dani, Thaís, Fernanda, Renata, Wanessa e Melissa.

Ao Juliano Leal (*in memoriam*) pelo carinho quando em vida e pelos sequenciamentos.

Ao Elimar e ao Jamil por sempre estarem dispostos a ajudar.

À minha família, minha mãe (Cleusa), meu pai (Adalto), meus irmãos (Atila e Adaelson) por sempre me apoiarem em tudo, pela confiança e por todo amor.

Ao Henrique Aguiar por seu companherismo, amor e por inspirar meus dias.

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

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

(Albert Einstein)

Resumo

As trans-sialidases (TS) são proteínas de superfície codificadas por uma família multigênica com mais de 1400 cópias presentes no genoma do parasito *Trypanosoma cruzi*. Os membros dessa família foram classificados em oito grupos, sendo os membros do grupo I, alvos do nosso estudo, aqueles que incluem as trans-sialidases com atividade enzimática e repetições de 12 aminoácidos na porção C-terminal da proteína, denominadas SAPA (*Shed Acute Phase Antigen*). A função das TS é transferir ácido siálico de glicoconjugados do hospedeiro para proteínas do tipo mucinas também presentes na superfície do parasito. Essa atividade pode estar relacionada com a virulência do parasito, pois estudos indicam que estaria envolvida com a invasão da célula hospedeira e evasão do sistema imune. Foi demonstrado também que as repetições SAPA presentes na porção C-terminal de algumas TS, além de direcionar a resposta imune humoral contra essa região da proteína, é capaz de aumentar a meia vida da enzima no sangue. Proteínas da família das trans-sialidases são largamente exploradas em estudos de vacina para a doença de Chagas, mostrando serem promissoras como antígenos vacinais. No nosso estudo, testamos um membro da família das trans-sialidases que possui o sítio ativo e 19 repetições SAPA, em ensaios de imunização utilizando versões recombinantes dessa proteína com e sem repetições SAPA. Após imunização de camundongos com cada proteína e desafio com uma cepa virulenta do parasito foi a parasitemia nos animais foi avaliada. A maior redução na parasitemia foi observada nos animais imunizados com a proteína que não contém as repetições SAPA. Paralelamente, foi testada uma segunda estratégia de vacina para a doença de Chagas, utilizando parasitos nocautes para os genes das TS ativas gerados por meio da tecnologia CRISPR-Cas9. Além de demonstrar a ausência de infectividade pelos parasitos nocautes, a imunização de camundongos com esses parasitos foi capaz de conferir 100% de proteção contra o desafio por uma cepa virulenta do *T. cruzi*. Assim, além do estudo com a proteína TS recombinante, uma formulação contendo parasitos atenuados vivos mostrou-se promissora para o desenvolvimento de uma vacina para a doença de Chagas.

Palavras-chaves: Trans-sialidase, *Trypanosoma cruzi*.

Abstract

Trans-sialidases (TS) are surface proteins encoded by a multigenic family with more than 1400 copies present in the genome of the parasite *Trypanosoma cruzi*. The members of this family were classified into eight groups, the members of group I, the targets of our study, being those that include trans-sialidases with enzymatic activity and with a 12 amino acids repeat in the C-terminal portion of the protein, called SAPA (Shed Acute Phase Antigen). The function of TS is to transfer sialic acid from host glycoconjugates to mucin-like proteins also present on the parasite's surface. This activity appears to be related to the virulence of the parasite, as studies have indicated that it is involved with invasion of the host cell and evasion of the immune system. It has also been shown that the SAPA repeats present in the C-terminal portion of some TS, in addition to directing the humoral immune response against this region of the protein, is capable of increasing the half-life of the enzyme in the blood. Proteins of the trans-sialidase family are widely explored in vaccine studies for Chagas disease, showing that they are promising as vaccine antigens. In this study, we tested a member of the active trans-sialidase group I, which contains 19 SAPA repeats, in immunization assays using recombinant versions of this protein with and without SAPA repeats. After immunization of mice with each protein and challenge with a virulent strain of the parasite, parasitemia in animals was determined. The greatest reduction in parasitemia was observed in animals immunized with the protein that does not contain the SAPA repeats. At the same time, another vaccine strategy for Chagas disease was tested, using knockout parasites for the genes of active TS generated through the CRISPR-Cas9 technology. In addition to demonstrating the absence of infectivity of the knockout parasites, the immunization of mice with these parasites was able to provide 100% protection against the challenge by a virulent strain of *T. cruzi*. Thus, in addition to the study with recombinant TS protein, a formulation containing live attenuated parasites was revealed as a promising strategy for the development of a vaccine for Chagas disease.

Keywords: Trans-sialidase, *Trypanosoma cruzi*.

Lista de figuras

Figura 1: Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> no hospedeiro vertebrado e invertebrado.....	17
Figura 2: Representação esquemática da resposta imunológica durante a infecção pelo <i>T. cruzi</i>	21
Figura 3: Classificação das TS em oito grupos.....	22
Figura 4: Atividade das trans-sialidases ativas nos tripomastigotas do <i>T. cruzi</i>	23
Figura 5: Estrutura geral de uma TS de tripomastigota de <i>T. cruzi</i>	25
Figura 6: Esquema das diferentes partes da TS que foram clonadas.....	44
Figura 7: Digestão do pET21a, após clonagem do gene da TS completa e seus diferentes domínios.....	45
Figura 8: Expressão das proteínas recombinantes em bactéria BL21 <i>star</i>	46
Figura 9: Expressão da TS-SAPA em BL21 <i>star</i> e análise por espectrometria de massa.....	47
Figura 10: Solubilidade das proteínas recombinantes.....	48
Figura 11: Purificação das proteínas recombinantes.....	50
Figura 12: Esquema de imunização com as proteínas recombinantes.....	51
Figura 13: Gráfico de parasitemia e sobrevivência dos animais imunizados com TS recombinante e suas versões truncadas.....	53
Figura 14: Dosagem de IgG total do soro de animais BALB/C imunizado com a TS completa recombinante e suas versões contendo (TS sem SAPA) ou não as repetições SAPA (TS-SAPA).....	54
Figura 15: Dosagem de IgG total e suas subclasses IgG1 e IgG2a do soro de animais BALB/C imunizado com a TS completa recombinante e suas versões contendo (TS sem SAPA) ou não as repetições SAPA (TS-SAPA).....	55
Figura 16: Dosagem de IgG total do soro de animais BALB/C imunizado com a TS completa recombinante.....	57
Figura 17: Dosagem de IgG total do soro de animais BALB/C imunizado com a TS-SAPA.....	58
Figura 18: Dosagem de IgG total do soro de animais BALB/C imunizado com a TS sem SAPA recombinante.....	59

Figura 19: Dosagem de IgG total, IgG1 e IgG2a no soro de animais BALB/C imunizados com as proteínas recombinantes e desafiados com formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do <i>T. cruzi</i>	61
Figura 20: Geração de anticorpos contra a trans-sialidase completa e suas versões truncadas contendo ou não repetições SAPA.....	62
Figura 21: <i>Western blot</i> utilizando anticorpo anti-TS completa contra extrato proteico de parasitos CL Brener na forma tripomastigota e epimastigota, e formas tripomastigotas de parasitos expressando apenas a proteína cas9, dos nocautes para TS (clones 3 e clone 7), e dos parasitos addback.....	67
Figura 22: Imunofluorescência utilizando anticorpo anti-TS completa contra parasitos CL Brener na forma epimastigota, e formas tripomastigotas de parasitos expressando apenas a proteína cas9, dos nocautes para TS (clone 7), e dos parasitos addback.....	69
Figura 23: Imunofluorescência utilizando anticorpo anti mucina sialilada contra parasitos CL Brener na forma epimastigota, e formas tripomastigotas de parasitos expressando apenas a proteína cas9, dos nocautes para TS (clone 7), e dos parasitos <i>addback</i>	70
Figura 24: Liberação de tripomastigota no sobrenadante por células LLCMK2 infectadas com formas tripomastigotas metacíclicas dos parasitos nocautes.....	72
Figura 25: Parasitemia e sobrevivência dos animais C57/BL6 IFN- γ nocaute infectados com formas tripomastigotas obtidas de cultura dos parasitos expressando apenas cas9, e dos clones 3 e 7 nocautes para TS ativas.....	73
Figura 26: Proteção de animais BALB/c imunizados com os parasitos TSKO7.....	75

Lista de tabela

Tabela 1.....	65
---------------	----

Lista de abreviaturas

- APC - Célula apresentadora de antígeno
- ASP – *Amastigote surface protein-2*
- BSA - *Bovine serum albumin*
- CpG - Citosina-fosfato-Guanina
- CRISPR - *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*
- DAPI - *4',6-diamidino-2-phenylindole*
- DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DNA - *Deoxyribonucleic acid*
- DSB - *Double strand break*
- ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
- Gp - Glicoproteína
- GPI - Glicosilfosfatidilinositol
- GIPL - Fosfolipídio Glicoinositol
- HR - Recombinação homóloga
- IFN- γ - Interferon-gamma
- IL - Interleucina
- IPTG - *Isopropiltio- β -galactosídeo*
- LIT - *Liver Infusion Tryptose*
- MALP-2 - *Mycoplasma-derived lipopeptide*
- MASP - Proteínas de superfície associadas à mucinas
- ML - Mililitro
- mM - Milimolar
- MMEJ - *Microhomology-mediated End Joining*
- MyD88 - *Myeloid differentiation primary response 88*
- ng - Nanogramas
- NK - *Natural killer*
- OD - Densidade óptica
- PAMP - Padrão molecular associado ao patógeno
- Pb- par de base
- PBS - *Phosphate-Buffered Saline*
- PBS-T - *Phosphate-Buffered Saline tween*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*
PFA - Paraformaldeído
pH - Potencial hidrogeniônico
PMSF - Phenylmethylsulfonyl fluoride
qPCR – *Quantitative PCR*
RNA - *Ribonucleic acid*
RPM – rotação por minuto
SAPA - shed acute parasite antigen
SDS-PAGE - *Duodecil sulfato de sódio*
SgRNA - *Single guide RNA*
TLR - *Toll-like receptors*
TNF- α - *Tumor necrosis factor alpha*
TS - Trans-sialidase
WT- *Wild type*

Sumário

1	Introdução	16
1.1	O <i>Trypanosoma cruzi</i> e seu ciclo de vida	16
1.2	A doença de Chagas	16
1.3	Resposta imune na infecção pelo <i>T. cruzi</i>	19
1.4	A família das Trans-sialidases do <i>T. cruzi</i>	20
1.5	Estratégias para o desenvolvimento de vacinas para a doença de Chagas	27
2	Objetivos	31
2.1	Geral	31
2.2	Específicos	31
3	Material e métodos	32
3.1	Cultivo de parasitos e obtenção das formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	32
3.2	Clonagem do gene da trans-sialidase e suas versões truncadas contendo ou não as repetições SAPA	32
3.3	Transformação bacteriana e indução da expressão das proteínas recombinantes	33
3.4	Teste de solubilidade das proteínas recombinantes	34
3.5	Purificação, diálise e quantificação das proteínas recombinantes	35
3.6	<i>Western blot</i>	36
3.7	Extração de LPS	37
3.8	Geração de anticorpos policlonais anti trans-sialidase	37
3.9	Imunização com as proteínas recombinantes, desafio com cepa Y do <i>T. cruzi</i> e parasitemia	37
3.10	Dosagem de anticorpos por ELISA	38
3.11	Ensaio de imunofluorescência com anticorpos anti-TS e anti-mucina sialilada	39

3.12	Infecção <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> com parasitos geneticamente manipulados.....	39
3.13	Imunização com parasitos TS nocaute e desafio com fomas tripomastigotas do <i>T. cruzi</i>	39
3.14	Análise do parasitismo tecidual.....	41
3.15	Plotagem de dados e análises estatísticas	41
4	Resultados.....	42
4.1	Clonagem e expressão em <i>E. coli</i> de uma trans-sialidase do grupo I e seus diferentes domínios	42
4.2	Purificação das proteínas recombinantes.....	49
4.3	Imunização de animais com a TS recombinante e seus domínios e desafio com uma cepa virulenta do <i>T. cruzi</i>	49
4.4	Caracterização da família multigênica das trans-sialidasas do <i>T. cruzi</i>	63
4.5	Caracterização de linhagens nocautes de TS ativas.....	64
4.6	Perfil da infecção <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de linhagens nocautes de TS ativas.....	68
4.7	Imunização com linhagens nocautes de TS e desafio com cepa virulenta.....	71
5	Discussão	76
6	Conclusões	84
7	Referências bibliográficas	85

1. Introdução

1.1 O *Trypanosoma cruzi* e seu ciclo de vida

O protozoário *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas. Este parasito, seu ciclo de vida, hospedeiros invertebrados transmissores da doença e hospedeiros vertebrados reservatórios da doença foram descritos pela primeira em 1909 pelo médico e pesquisador Carlos Chagas (Chagas, 1909).

O *T. cruzi* apresenta um complexo ciclo de vida, que compreende estágios em hospedeiros vertebrados e invertebrados, podendo assumir três formas principais durante esse processo: tripomastigotas, epimastigotas e amastigotas. Como mostrado na figura 1, as formas tripomastigotas circulam no sangue do hospedeiro vertebrado infectado e são ingeridas pelo inseto triatomíneo no momento do repasto sanguíneo. No estômago do inseto, as formas tripomastigotas se diferenciam nas formas chamadas epimastigotas. Essas formas migram para o intestino médio do inseto, onde se multiplicam por fissão binária. Na região posterior do intestino e no reto, as formas epimastigotas diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicas, que são liberadas junto com as fezes e urina do inseto e são altamente infectivas, podendo infectar qualquer célula nucleada, onde são internalizadas num compartimento chamado vacúolo parasitóforo. As formas tripomastigotas metacíclicas diferenciam-se então nas formas amastigotas, que são capazes de se replicar por fissão binária e após alguns ciclos de replicação se diferenciam nas formas tripomastigotas que são liberadas na corrente sanguínea após rompimento da célula. Essas tripomastigotas podem infectar outras células ou serem ingeridas por insetos hematófagos, retornando ao ciclo no triatomíneo (De Souza, De Carvalho e Barrias, 2010; Fernandes, Andrews, 2012).

1.2 A doença de Chagas

Atualmente, estima-se que 8 milhões de pessoas estejam infectadas pelo *T. cruzi* em todo o mundo. A doença ocorre principalmente em países da América latina, no entanto tem se espalhado para outros continentes devido às migrações (<http://www.who.int/neglecteddiseases/diseases/en>). O controle vetorial mostrou ser

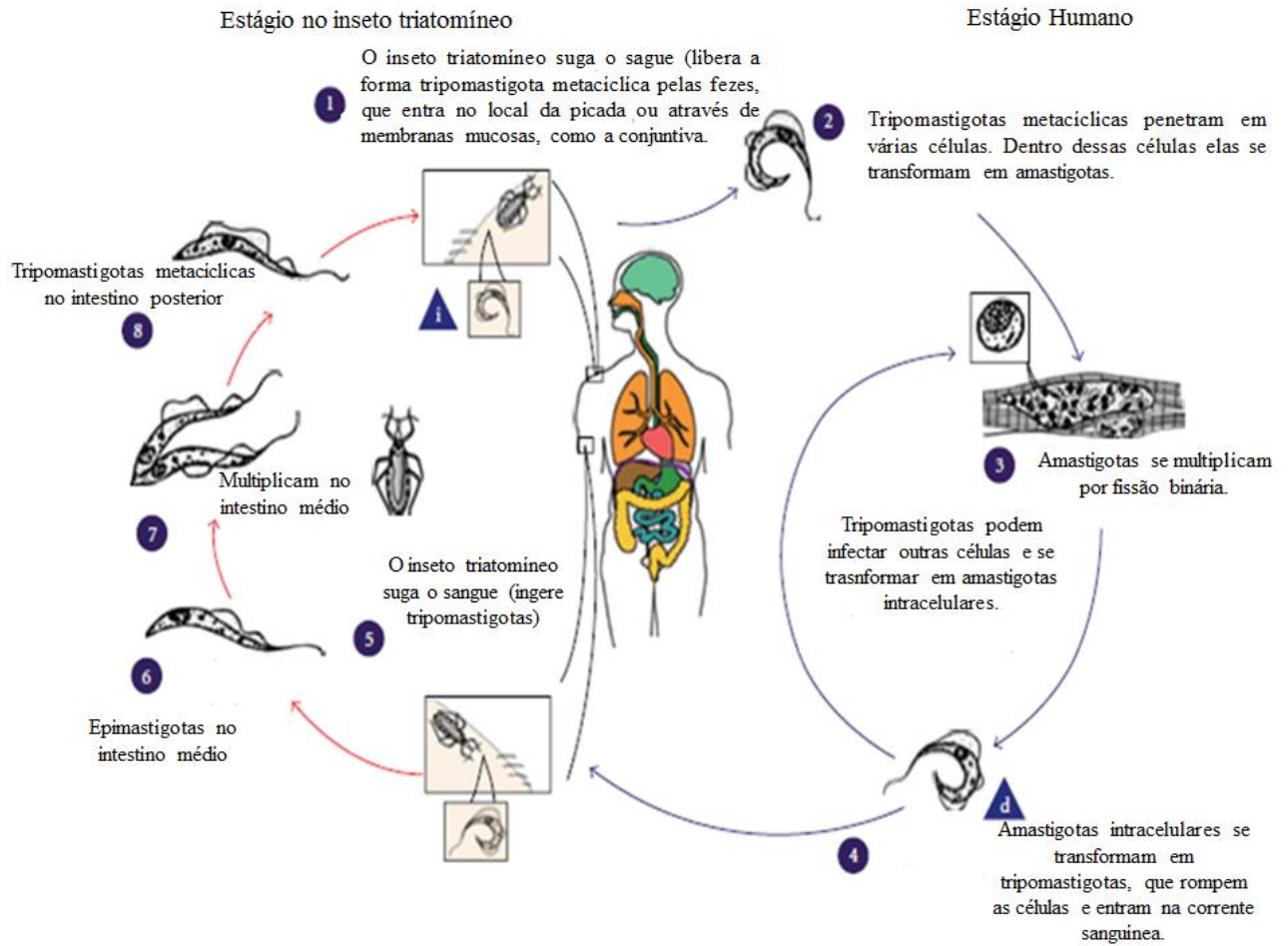


Figura 1: **Ciclo de vida do *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado e invertebrado** (De Souza, De Carvalho e Barrias, 2010 - adaptado).

a forma mais efetiva de prevenção da doença em vários países da América latina capaz de reduzir o risco de infecção das populações. O Brasil, recebeu em 2006, a certificação internacional da interrupção da transmissão vetorial da doença pela principal espécie do inseto, o *Triatoma infestans*. No entanto, existem limitações nessa estratégia de prevenção, pois nem todas as espécies de triatomíneos foram efetivamente controladas, sendo responsáveis por uma transmissão significativa do *T. cruzi* ao homem (Quijano-Hernandez, dumonteil, 2011). Além da transmissão vetorial, a transmissão oral tem sido muito importante no processo de contaminação pelo parasito. Surto recentes de infecção oral pelo *T. cruzi* através de alimentos contaminados com fezes do barbeiro tem acontecido, principalmente na região norte do Brasil. Isso acontece quando em algum momento da produção do alimento ocorre a contaminação com o conteúdo do estômago do inseto (Nobrega *et al.* 2009). Adicionalmente a infecção vetorial e por meio de alimentos contaminados, o *T. cruzi* pode ainda ser transmitido por transfusões e transplantes, acidentes de trabalho e de forma vertical, da mãe para o filho (Rassi e Marin-Neto, 2010).

A doença de Chagas pode apresentar três fases: a fase aguda, a crônica e a indeterminada. A fase aguda é caracterizada por elevada parasitemia e parasitismo tecidual, sendo assintomática em muitos dos casos. No entanto, sinal de Romaña pode ser observado quando a porta de entrada do parasito ocorre pela mucosa ocular. Por outro lado, na fase crônica a parasitemia e o parasitismo tecidual são muito baixos e somente cerca de 20-30% dos casos são sintomáticos, podendo haver complicações cardíacas, digestivas ou neurológicas anos após a infecção ter ocorrido. As drogas utilizadas para o tratamento da doença são o benznidazol e o nifurtimox, efetivos apenas na fase aguda, sendo pouco eficientes na fase crônica da doença (Cançado, 1999; Junqueira *et al.* 2010; Rassi e Marin-Neto, 2010). Além disso, essas drogas apresentam grandes efeitos colaterais incluindo intolerância digestiva, neuropatia periférica, erupções cutâneas e hepatite e além disso. O fato da fase aguda da doença apresentar-se muitas vezes assintomática ou com sintomas inespecíficos dificulta o tratamento que pode ser eficiente nas fases iniciais da infecção, contribuindo para a evolução para a fase crônica, onde podem haver complicações cardíacas e digestivas, cujos tratamentos paliativos geram ainda mais custo no tratamento da doença (Castro, Mecca, Bartel, 2006; Cançado, 1999; Rassi e Marin-Neto, 2010). Assim, o desenvolvimento de uma vacina para a doença de Chagas pode ser a estratégia mais eficaz para prevenção da doença e suas complicações, além de

eliminar os custos gerados no seu tratamento. Contudo, priorizar doenças frequentemente associadas a pobreza e áreas rurais, como a doença de Chagas, ainda é um desafio a ser superado para que um tratamento eficiente contra essas doenças possa ser desenvolvido e mais rapidamente.

1.3 Resposta imune na infecção pelo *T. cruzi*

Nos estágios iniciais da infecção pelo *T. cruzi*, a resposta imune inata exerce um papel crucial no controle da replicação do parasito. Ocorre ativação de macrófagos, células dendríticas e células NK (*Natural killer*). Os receptores *Toll Like* (TLR) atuam como mediadores centrais da ativação do sistema imune inato durante a infecção pelo parasito, acionando vias dependentes de MyD88 e TRIF como proteínas adaptadoras transdutora dos sinais recebidos pelos TLRs. Proteínas tipo mucina ancoradas por Glicosilfosfatidilinositol (GPI) e Fosfolípido Glicoinositol (GIPL), por exemplo, são agonistas para TLR2/6 e TLR4, respectivamente, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos e células dendríticas. O DNA do parasito também é capaz de estimular resposta via TLR, podendo ativar macrófagos e células dendríticas através dos domínios CpG presentes no seu DNA por meio de TLR9. As citocinas produzidas durante a imunidade inata fazem a ligação com a imunidade adquirida, na qual há polarização de uma resposta do tipo Th1 por células CD4+, com ativação de células T CD8+ citotóxicas (Junqueira *et al.* 2010).

Existe um consenso de que a resposta Th1 com ativação de células T CD8+ é crucial na defesa contra o *T. cruzi*. Dados da literatura demonstram que essa proteção é devida principalmente a produção de IFN- γ por essas células, que leva a indução da produção de óxido nítrico pelos macrófagos, tendo como alvo os parasitos extracelulares, além da atividade citotóxica das células T CD8+, que irá eliminar as células contendo as formas intracelulares do parasito (Junqueira *et al.* 2010). As primeiras evidências do papel das células T CD8+ na imunidade a *T. cruzi* veio dos resultados de estudos de depleção usando anti-CD8 e, posteriormente, o uso de linhagens de camundongos CD8 nocautes, que demonstraram que na ausência de células T CD8+, os camundongos sucumbem rapidamente à infecção ou desenvolvem uma doença crônica mais grave (Revisado por Martin e Tarleton, 2004). Essas células reconhecem os epítomos apresentados via moléculas de MCH classe I, e experimentos de infecção com camundongos deficientes na molécula de MHC I

resultaram em aumento da parasitemia e mortalidade desses animais (Tarleton *et al.* 1992). Dentre os alvos, importantes para a resposta por essas células, destacam-se as proteínas ancoradas por GPI e membros da família das trans-sialidases. (Martin, Tarleton, 2004). Produção de anticorpos também é observada durante a infecção pelo *T. cruzi*, que também demonstra ter um papel importante no combate ao parasito (Kumar, Tarleton, 1998). Um esquema da resposta imune na infecção pelo *T. cruzi* é mostrado na figura 2 (Junqueira *et al.* 2010).

1.4 A família das Trans-sialidases do *T. cruzi*

Os genes codificadores das trans-sialidases (TS) representam uma grande família multigênica expressa pelo *T. cruzi*, havendo mais de 1400 cópias no genoma clone CL Brener (El Sayed *et al.* 2005). Essas são expressas nos diferentes estágios de vida do parasito, podendo desempenhar funções variadas no mesmo. Em 2011, Freitas *et al.* estabeleceram uma classificação das trans-sialidase em oito grupos (figura 3). Todos os membros dessa família possuem o motivo VTVxNVxLYNR conservado, o que permite a classificação como TS. Além disso, a grande maioria dos membros possuem sequência de peptídeo sinal, o que permite sua expressão na membrana, e sinal de âncora GPI. Alguns grupos são melhores caracterizados que outros. O grupo I contém as TS que tem ou não resíduos críticos para a atividade enzimática. A característica principal de uma TS ativa é a presença do aminoácido histidina na posição 342, enquanto que as inativas possuem uma mutação que gera a troca para uma tirosina na mesma posição. Além desse grupo, vale ressaltar o grupo II, que é composto por glicoproteínas de superfície tais como TSA-1, gp82 e ASP-2, relacionadas a processos de adesão e invasão. E o grupo III, o qual inclui a proteína FL-160, que inibe a via clássica e alternativa do complemento.

A função das TS ativas é a de transferir resíduos de ácido siálico de glicoconjugados do hospedeiro para mucinas na superfície do parasito, visto que esse parasito é incapaz de sintetizar essas moléculas (figura 4) (Rubin-De-Celis *et al.* 2012). Os ácidos siálicos são um grupo de monossacarídeos de 9 carbonos estruturalmente diversos com estruturas em anel heterocíclico e com carga negativa através de um carboxílico grupo ácido ligado ao anel, bem como outros grupos químicos, incluindo grupos N-acetil e N-glicolil. Essas moléculas estão presentes em

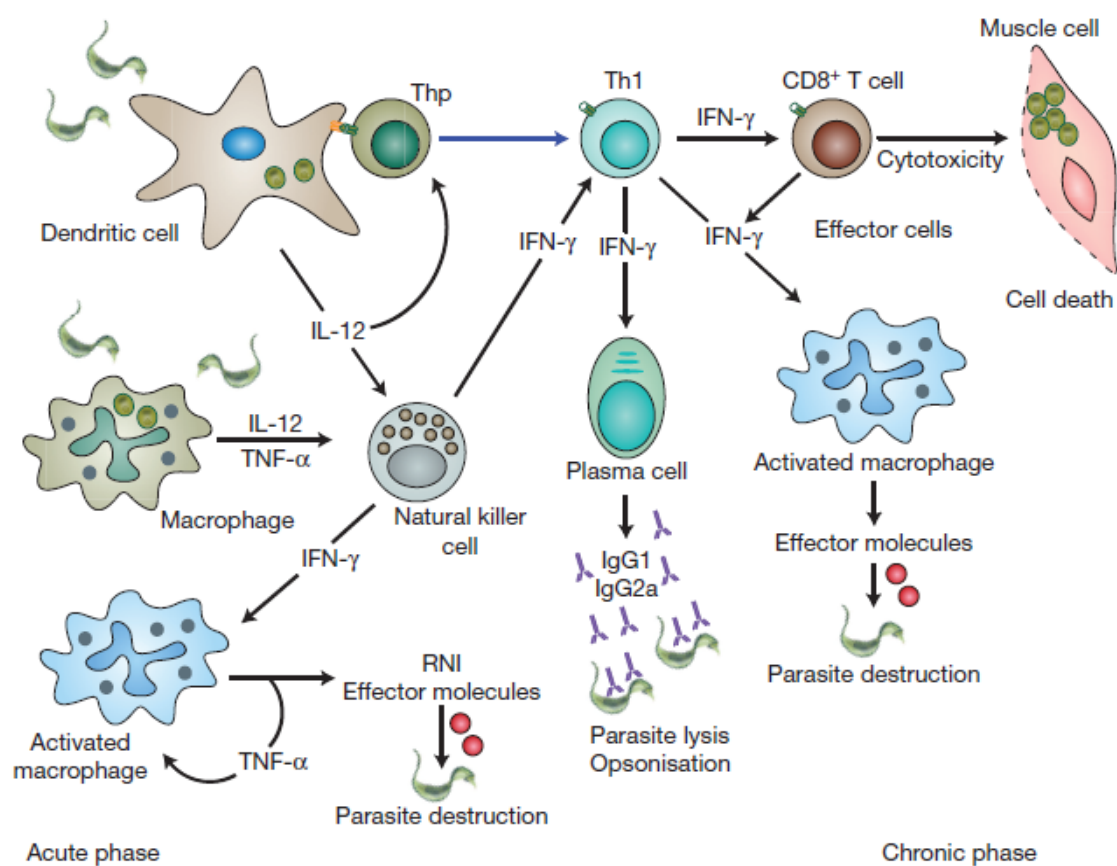


Figura 2: Representação esquemática da resposta imunológica durante a infecção pelo *T. cruzi*. Citocinas e células envolvidas na resposta imune ao protozoário *T. cruzi* (Junqueira *et al.* 2010).

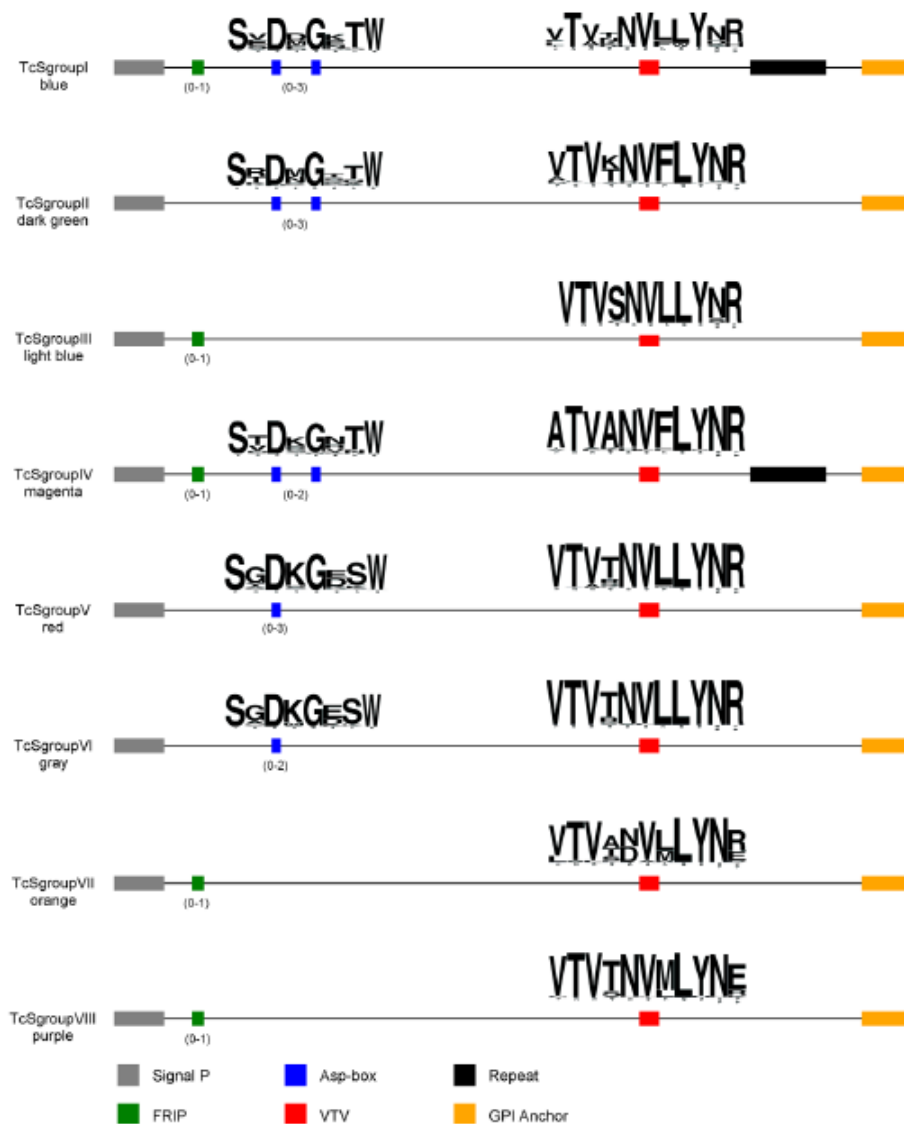


Figura 3: **Classificação das TS em oito grupos.** A figura mostra os diferentes motivos que podem ser encontrados na maioria dos membros de cada grupo: peptídeo sinal (cinza), motivo de sialidases (azul), sequências repetitivas de aminoácidos (preto) motivo FRIP (verde), motivo característico das TS VTVxNVxLYNR (vermelho) e sinal para âncora GPI (amarelo) (Freitas *et al.* 2011).

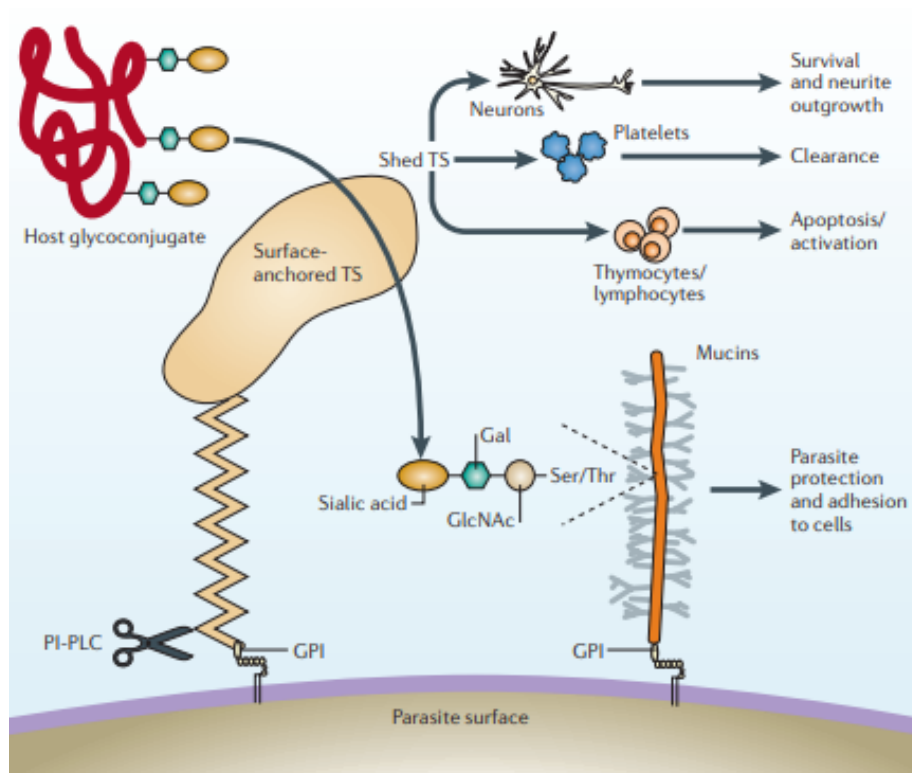


Figura 4: **Atividade das trans-sialidases ativas nos tripomastigotas do *T. cruzi*.** TS transfere ácido siálico de glicoconjugados do hospedeiro para as mucinas na superfície do *T. cruzi* (Buscaglia *et al.* 2006)

todas as células de mamíferos, possuindo milhares delas em sua superfície, localizadas em posições terminais de glicoconjugados de proteínas e lipídeos. Suas funções incluem adesão célula-célula, mediadores na comunicação intercelular, renovação celular e receptores para bactérias e vírus. Por outro lado, as neuraminidases ou sialidases são enzimas que clivam a ligação glicosídica e liberam o ácido siálico do substrato sialilado. Estão presentes em diferentes organismos, como vírus, bactérias, protozoários e são envolvidas em processos patológicos e em processo de infecção. O vírus Influenza, por exemplo, possuem hemaglutininas e neuraminidases que reconhecem resíduos de ácidos siálicos presentes nas glicoproteínas das células a serem infectadas e assim induzem a fusão e incorporação do envelope viral na célula hospedeira (Freire-de-Lima *et al.* 2015). No caso do *T. cruzi*, essas enzimas correspondem às trans-sialidases, que possuem características singulares, pois além de clivar e liberar o ácido siálico, são capazes de transferir essa molécula para aceptores na sua superfície.

As vantagens da sialilação conferida ao parasito por meio da ação das trans-sialidases ativas, incluem: resistência do parasito à lise pelo sistema complemento; proteção das formas tripomastigotas à lise por anticorpos anti alfa-gal, que são induzidos pelo epítipo imunodominante alfa gal das mucinas e são capazes de lisar o *T. cruzi*; contribui para a re-sialilação de células TCD8⁺ que são naturalmente sialiladas num estado *naïve*, comprometendo a atividade dessas células essenciais no controle do parasito; além disso, o ácido siálico tem grande importância no processo de invasão da célula, visto que células deficientes nessa molécula possuem uma redução da invasão pelo parasito (Tomlinson *et al.* 1994; Pereira-Chiocola *et al.* 2000;); Schenkman, Vandekerckhove e Schenkman, 1993). Dessa forma, essa enzima representa um importante fator de virulência do parasito.

Uma característica muito importante de algumas TS ativas é a presença de repetições em *tandem* de 12 aminoácidos, na porção C-terminal da proteína (figura 5). Esse motivo, denominado SAPA (*shed acute parasite antigen*) consiste dos aminoácidos DSSAH(S/G)TPSTP(A/V), que se repetem um número variado de vezes e não é requerido para atividade catalítica das TS ativas (Parodi *et al.* 1992). Essas enzimas são ancoradas por âncora GPI e são liberadas durante a fase aguda da doença. Muitas teorias foram desenvolvidas para explicar o papel das repetições SAPA presentes na TS do parasito, no entanto sua função permanece desconhecida.

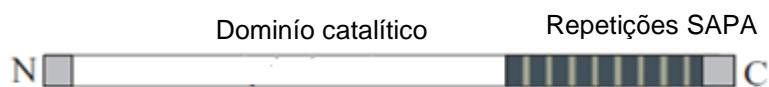


Figura 5: **Estrutura geral de uma TS de tripomastigota de *T. cruzi*.** Na porção N-terminal está representado o peptídeo sinal (quadrado cinza, esquerda) e o domínio catalítico da enzima. As repetições SAPA são representadas na porção C-terminal, próxima a ancora GPI (quadrado cinza, direita). Adaptado de Rubin-De-Celis *et al.* 2006.

Todavia, já foi observado que a presença desses motivos aumenta a estabilidade da enzima TS no sangue, fato que contribui para a virulência do parasito, dada as vantagens da sialilação para o parasitos já citadas aqui (Buscaglia *et al.* 1999). Além disso, dados relacionam a presença desses motivos a alta e inespecífica produção de anticorpos, o que pode representar um mecanismo de evasão da resposta imune: a imunodominância das repetições SAPA podem desviar o sistema imune de alvos importantes, como a porção catalítica da própria proteína (Gao *et al.* 2002). No entanto, estudos ainda são necessários para elucidar o papel dessas repetições durante a infecção pelo *T. cruzi* e sua influência sobre o sistema imune do hospedeiro. As formas epimastigotas do parasito também expressam a enzima TS, contudo, essas não possuem as repetições SAPA e o motivo de ancoramento GPI. Na forma epimastigota, essa enzima permite a sialilação da sua superfície, promovendo adesão ou não a células endoteliais do intestino do inseto, o que pode influenciar na diferenciação e migração do parasito através do intestino do inseto (revisado por DC- Rubin *et al.* 2012).

Não somente as trans-sialidases, mas também outras proteínas do *T. cruzi* possuem sequências repetitivas de aminoácidos. Por meio de um *immunoscreening* de uma biblioteca de expressão de formas amastigotas do *T. cruzi*, utilizando soro de pacientes com doença de Chagas, Da Rocha *et al.* (2002) identificaram proteínas do parasito alvos da resposta imune. De todas as proteínas identificadas nesse estudo, 70% correspondiam à proteínas com sequências repetitivas de aminoácidos. Esse e outros trabalhos do nosso grupo investigando uma proteína ribossômica identificada no estudo 2002 e que também possui sequências repetitivas de aminoácidos, denominada TcL7a, levaram à hipótese de que o motivo repetitivo teria um papel imunomodulador, visto que a imunização de animais com apenas a porção repetitiva da TcL7a foi capaz de exacerbar a parasitemia de animais desafiados com uma cepa virulenta do *T. cruzi*. Além disso, o motivo repetitivo da proteína causou uma redução nos níveis de anticorpos contra antígenos do *T. cruzi* e inibiu proliferação de células B estimuladas por ativadores policlonais (Toro *et al.* 2017). Além do *T. cruzi*, outros protozoários como *Plasmodium* spp. e *Leishmania* spp. também contém diferentes proteínas com sequências repetitivas de aminoácidos. Muitos desses motivos tem em comum o fato de serem alvos da resposta imune, sugerindo exercer uma imunodominância em relação a outras partes da proteína. Esses estudos levaram à elaboração da hipótese da “cortina de fumaça” que conjectura que uma forte resposta

imune contra antígenos contendo repetições, presentes em diferentes proteínas de parasitos, desviaria a resposta imune humoral de alvos mais importantes daquele patógeno, favorecendo a infecção. Esse seria um possível mecanismo de escape utilizado pelo *T. cruzi* por meio das repetições SAPA presentes em algumas TS que impediria ou retardaria uma resposta de anticorpos contra a porção catálica da enzima (Soto *et al.* 1995; Kemp *et al.* 1987).

1.5 Estratégias para o desenvolvimento de vacinas para a doença de Chagas

Ao longo dos anos, um grande número de estudos envolvendo diferentes antígenos do *T. cruzi* foram descritos estratégias para o desenvolvimento de uma vacina para a doença de Chagas. Em muitos casos foi de fato possível observar um papel protetor potencial, ou seja, a capacidade de eliciar resposta imune favorável à destruição do parasito com a redução na parasitemia e mortalidade do hospedeiro. Dentre as formulações já avaliadas encontram-se testes com parasitos inteiros mortos ou atenuados, proteínas isoladas purificadas e recombinantes, vacinas de DNA e vetores virais, por exemplo (Quijano-Hernandez, Dumonteil, 2011; Bivona *et al.* 2020)

Testes de vacinas com parasitos inteiros demonstraram que as formulações com as formas tripomastigotas são mais eficientes do que com as formas epimastigotas. Além disso, o uso de parasitos vivos atenuados ou não infecciosos é muito mais eficiente em reduzir a carga parasitária e permitir a sobrevivência de animais infectados com uma cepa virulenta do *T. cruzi* do que as formulações com parasitos mortos (Basombrio, 1990; Basombrio, 1982). Esse efeito pode ser explicado pelo fato de parasitos vivos atenuados infectarem as células do hospedeiro, porém levam a uma infecção subclínica que assegura a persistência do antígenos e o múltiplo estímulo antigênico (Basombrio, 1990). Assim, ao contrário da inoculação de parasitos mortos, há geração de uma forte e duradoura resposta imune capaz de reduzir o número de parasitos presentes no sangue e o parasitismo nos tecidos. Entretanto, apesar do desenvolvimento de uma vacina para a doença de Chagas utilizando parasitos vivos atenuados parecer ser a estratégia mais eficaz para controlar a infecção, questões de segurança relacionadas a esse tipo de vacina representam grande desafio.

Estudos iniciais com parasitos vivos utilizaram parasitos naturalmente atenuados ou induziram atenuação dos mesmos por métodos que não utilizavam a manipulação do genoma do parasito. Entretanto, nesses estudos, a base molecular da atenuação do parasito não era conhecida. Nos últimos anos, porém, o avanço das técnicas de manipulação do DNA tornou possível a geração de organismos atenuados por meio da manipulação gênica de alvos específicos (Sánchez-Valdéz *et al.* 2015). No *T. cruzi* a deleção de genes alvos pode ser feita por meio do processo de recombinação homóloga e interrupção do gene de interesse, adicionando no meio da sequência alvo um gene de resistência a uma droga, através do processo de transfecção por elteroporação. Dentre as limitações dessa técnica está o tempo de espera para selecionar os parasitos transfectados e a necessidade de uma segunda etapa de transfecção para interromper o segundo alelo (Burle-Caldas *et al.* 2015). Utilizando essa estratégia, um número reduzido de estudos utilizando parasitos atenuados por meio da interrupção de diferentes genes foram descritos e poucos foram testados em experimentos de imunização (Sánchez-Valdéz *et al.* 2015).

A imunização com proteínas do parasito alvos do sistema imune pode ser obtida por meio da produção da proteína de forma recombinante. Um grande número de proteínas recombinantes do *T. cruzi* foram testadas em estudos voltados para o desenvolvimento de vacinas de subunidade para a doença de Chagas. Dentre os candidatos já testados é possível citar a cruzipaína, principal cisteína protease do *T. cruzi*; a Tc52, uma glutatona S-transferase altamente conservada; a Tc80, uma oligopeptidase capaz de degradar componentes da matriz extracelular; glicoproteínas como Gp90 e Gp72; proteínas paraflagelares (PAR e PFR); Tc24, proteína de ligação ao cálcio flagelar; antígeno repetitivo citoplasmático (CRA); antígeno repetitivo flagelar (FRA); e membros da família das trans-sialidases do *T. cruzi*, como a ASP, TSA-1 e Gp82 (para uma revisão, veja Quijano-Hernandez & Dumonteil, 2011).

Dentre os candidatos listados acima, é importante ressaltar o potencial promissor das formulações contendo proteínas da família das trans-sialidases em conferir proteção contra o parasito. Giddings *et al.* (2005) demonstraram que a vacinação intranasal com uma trans-sialidase recombinante associada ao adjuvante CpG foi capaz de induzir o aumento na proliferação de células produtoras de IFN- γ e 80% de sobrevivência em animais vacinados e posteriormente desafiados com formas tripomastigotas sanguíneas do *T. cruzi*. Hoft *et al.* (2007) também estudaram a vacinação intranasal com um membro das TS e observou que a imunização com uma

TS ativa mais CpG foi capaz de aumentar a produção de IFN- γ pelos animais imunizados e proteção de 100% nos animais imunizados e posteriormente desafiados, e redução significativa do parasitismo tecidual. Araújo *et al.* (2005) também estudaram um membro da família das TS e observou redução na parasitemia e uma taxa de sobrevivência de 80% dos camundongos vacinados com a proteína recombinante ASP-2 mais os adjuvantes CpG e alumínio e posteriormente desafiados com formas tripomastigotas sanguíneas do *T. cruzi*. No mesmo estudo também foi realizada a imunização com apenas um segmento dessa mesma proteína, conferindo uma proteção ainda maior, com uma taxa de sobrevivência de 100% pós infecção dos animais vacinados e desafiados. Contudo, apesar dos resultados favoráveis, proteção estéril não foi observada nenhum desses trabalhos. Além disso, em nenhum dos estudos descritos envolvendo o uso das TS, foi investigado se a presença das repetições de aminoácidos do domínio SAPA, presente em alguns membros do grupo I da família das TS, teria um papel protetor ou associado à virulência quando a TS é utilizada como imunógeno.

Além do antígeno específico, uma vacina constituída por proteínas necessita de um adjuvante adequado ao tipo de resposta que se deseja que seja polarizar pelo sistema imune do hospedeiro. Os adjuvantes CpG, um oligonucleotídeo que ativa TLR9, MALP-2 um lipopeptídeo do *Mycoplasma* que ativa TLR2/6 polarizam uma resposta do tipo Th1. Por outro lado adjuvantes com Alumínio e o adjuvante incompleto de Freund geram um perfil de resposta do tipo Th2. A escolha do adjuvante irá depender portanto do tipo de resposta esperada para o controle de determinada infecção, sendo o perfil Th1 o mais importante para o controle da infecção pelo *T. cruzi* (Quijano-Hernandez & Dumonteil, 2011; Junqueira *et al.* 2010).

Vacinas de DNA com diferentes antígenos do *T. cruzi* também tem se mostrado promissoras. Essas vacinas são baseadas na administração de um plasmídeo contendo uma sequência codificadora de antígeno dentro de um cassete de expressão. Quando essa construção atinge o núcleo de uma célula apresentadora de antígeno (APC), a própria célula hospedeira pode produzir o antígeno. Como as proteínas são sintetizadas no citosol, há uma maior probabilidade de processar e apresentar antígenos através das moléculas do MHC classe I. Portanto, esse tipo de vacina favorece a ativação das células T CD8 +, que é fundamental numa resposta protetora contra o *T. cruzi* (Bivona *et al.* 2020).

Além do antígeno poder ser entregue a célula por meio de um cassete de expressão, como no caso das vacinas de DNA, uma abordagem semelhante consiste na utilização de vetores virais. Nesse caso, o gene correspondente ao antígeno de interesse é inserido no material genético do vírus e este inocula seu material genético ao infectar a célula hospedeira. Dentre os vírus que são utilizados para essa finalidade estão o adenovírus e o vírus vaccinia. Além de estimular uma resposta T-citotóxica potente, uma grande vantagem desse sistema é que os vírus podem atuar como um adjuvante natural devido à presença de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) que recrutam e ativam as APCs por meio da estimulação de receptores de reconhecimento de padrões (Mali,2013; Bivona *et al.* 2020).

Assim como para as vacinas utilizando proteínas purificadas ou recombinantes, estudos com vacinas de DNA ou vacinas utilizando vetores virais mostraram que membros da família das trans-sialidases são alvos promissores a serem utilizados, cuja proteção é associada ao um perfil de resposta Th1. Araújo *et al.* (2005) demonstraram redução na parasitemia e uma taxa de sobrevivência de 75% de camundongos vacinados com DNA plasmidial contendo o gene da ASP-2, um membro da família das TS, e desafiados com formas tripomastigotas sanguíneas do *T. cruzi*. Também estudando a ASP-2 e um outra outra proteína da família das TS, Vasconcelos *et al.* (2004) observaram diminuição da parasitemia e sobrevivência de mais de 80% em animais vacinados com plasmídeos contendo o gene correspondente a essas proteínas e posteriormente desafiados com o *T. cruzi*. Alta taxa de sobrevivência, de 100%, e redução na parasitemia (quase de 50%) também foi observado por Silveira *et al.*(2008) em camundongos vacinados com plasmídeo contendo um segmento específico do gene da ASP-2 e desafiados posteriormente com a cepa colombiana do *T. cruzi*.

Ainda no contexto de vacina de DNA e por vetores virais é importante citar a introdução de vacinas terapêuticas no controle e tratamento da doença de Chagas. Ao contrário das vacinas profilática, administradas após infecção do hospedeiro e desenvolvimento da doença, as vacinas terapêuticas podem ser administradas após a infecção por um patógeno mas antes do desenvolvimento da doença. Pereira *et al.* (2015), por exemplo, realizaram experimentos de vacinação em animais previamente infectados com o *T. cruzi* (após 120 dias de infecção), utilizando uma combinação de dois adenovírus contendo a sequência do gene de duas TS diferentes. No estudo, além 100% de sobreviência dos animais que receberam a vacinação terapêutica, foi

observada a diminuição de anormalidades cardioelétricas e injúria no tecido cardíaco desses animais, demonstrando mais uma vez o papel protetor dos membros da família das trans-sialidases.

Assim, diante de todos os trabalhos descritos na literatura que investigam não somente o papel das TS ativas como fator de virulência do parasito, mas o seu uso potencial como antígeno vacinal, neste trabalho propomos estudar o papel das repetições SAPA presentes em algumas TS e sua influência sob a resposta imune do hospedeiro. Paralelamente, buscamos também avaliar o papel das TS ativas por meio do estudo da infecção de uma cepa do *T. cruzi* que foi tornada atenuada após a deleção dos genes codificadores de TS ativas utilizando a tecnologia de CRISPR.

2 Objetivos

2.1 Geral

Testar diferentes versões da Trans-sialidase de *T. cruzi* como antígenos protetores na infecção bem como linhagens atenuadas geneticamente modificadas do parasito como estratégias de vacina para a doença de chagas.

2.2 Específicos

- i. Clonagem e expressão, em *E. coli*, e purificação de diferentes versões recombinantes de uma Trans-sialidase contendo o sítio catalítico e motivos repetitivos SAPA na porção C-terminal;
- ii. Imunização de camundongos com as proteínas recombinantes purificadas e avaliação da resposta imune humoral induzida pelas diferentes proteínas;
- iii. Imunização de camundongos com as proteínas recombinantes purificadas e avaliação da capacidade protetora após o desafio com uma cepa virulenta do *T. cruzi*;
- iv. Caracterização molecular de parasitos nocautes de TS obtidos por meio da tecnologia CRISPR/Cas9;
- v. Determinação da infectividade de parasitos nocautes de TS em ensaios de infecção *in vitro* e *in vivo*;

- vi. Determinação da capacidade protetora de parasitos nocautes de TS após imunização de camundongos e desafio com cepa virulenta *T. cruzi*;
- vii. Caracterização da resposta imune celular desencadeada pela imunização de camundongos com parasitos nocautes de TS.

3 Material e métodos

3.1 Cultivo de parasitos e obtenção das formas tripomastigotas de *T. cruzi*

O cultivo de formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* foi realizado de acordo com os protocolos descritos por Camargo (1964). Resumidamente, as formas epimastigotas foram mantidas em fase exponencial de crescimento a 28°C em meio LIT (10 g/L de infuso de fígado; 4 g/L NaCl; 400 mg/L KCl; 8 g/L Na₂HPO₄; 1g/L glicose; 5 g/L triptose; 10 mL de hemina a 0,2% em NaOH (p/v); pH 7,2) acrescido de 10% de soro fetal bovino, estreptomicina 100 µg/mL e penicilina 100 µg/mL. Tripomastigotas derivadas de cultura foram obtidas através de infecção de monocamadas de células LLCMK2 com formas tripomastigotas metacíclicas derivadas de cultura em fase estacionária em meio LIT. Formas tripomastigotas liberadas das células foram centrifugadas a 1.200g a partir do sobrenadante das cultura e utilizadas para os experimentos de imunofluorescência, para obtenção de extratos proteicos utilizados nos *western blots* e para os ensaios de infecções *in vivo*.

3.2 Clonagem do gene da trans-sialidase e suas versões truncadas contendo ou não as repetições SAPA

A sequência do gene da trans-sialidase (ID: Tc00.1047053509495.30), clonada no vetor pROCK (Belew *et al.* 2007) foi utilizada como molde para amplificar o gene completo da TS (TS completa) apenas a porção catalítica (TS sem SAPA) ou as apenas repetições SAPA da trans-sialidase (TS-SAPA). Para isso, quatro diferentes iniciadores foram desenhados. Para facilitar a posterior clonagem em vetor de expressão, foram adicionados aos mesmos os sítios para as enzimas de restrição *XhoI* e *NheI*. Os seguintes pares de iniciadores foram utilizados para as diferentes

sequências: 5'- GCTAGCATGCTCTGCCCCAGCGAGCCC-3' e 5'-CTCGAGGGGCAAATCAAACCGTAC-3' para a TS completa, gerando um produto de 2673 pb (pares de bases); 5'-GCTAGCATGCTCTGCCCCAGCGAGCCC-3' e 5'-CTCGAGCATGTGTGCTTCCGTGCC-3' para a TS sem SAPA, gerando um produto de 1941 pb; e 5'-GCTAGCATGGACAGCAGCAGCGACAG-3' e 5'-CTCGAGGGGCAAATCAAACCGTAC-3', para a TS-SAPA, gerando um produto de 747 pb. Todos os fragmentos foram amplificados por PCR e analisados em gel de agarose 1% . Após confirmação dos tamanhos, as sequências foram clonadas em vetor TOPO-TA (Invitrogen), conforme recomendações do fabricante. Posteriormente, o vetor foi clivado com as enzimas de restrição *XhoI* e *NheI* (Promega) para liberação dos insertos que foram ligados pela T4 DNA ligase no vetor de expressão pET21a (Novagen), previamente digerido com as mesmas enzimas.

3.3 Transformação bacteriana e indução da expressão das proteínas recombinantes

Bactérias BL21 Star™(DE3), quimiocompetentes, foram transformadas por choque térmico com 10 ng dos diferentes plasmídeos pET21a contendo os diferentes insertos da TS. Para isso, foi feita a incubação de aproximadamente 10 ng de plasmídeo com a bactéria, durante 30 minutos em gelo, em seguida foi realizado o choque térmico a 42°C por 50 segundos. Após esse tempo, as bactérias foram mantidas no gelo por 2 minutos e posteriormente foi adicionado 400 µl de meio de cultura 2XYT (1,6% de triptona; 1% de extrato de levedura; 0,5% de NaCl; pH 7,0) sem antibiótico a 37°C por 1 hora. Posteriormente, 200 µL da cultura foi plaqueada em meio de cultura 2XYT contendo 1,5% de ágar e antibiótico de seleção ampicilina (100 µg/mL). Essas foram então incubadas *overnight* a 37°C para o crescimento das bactérias que incorporaram o plasmídeo e adquiriram resistência ao antibiótico. Para o procedimento de indução, bactérias recém transformadas ou clone congelado das mesmas foram utilizados para preparar um pré-inóculo. Para isso as bactérias foram inoculadas no meio que estava no Erlenmeyer contendo 25 mL de meio 2XYT com ampicilina e mantidas a 37°C sob agitação (180 RPM) até atingirem a densidade óptica (OD₆₀₀) entre 0,4 - 0,6. Para o inóculo, 20 mL dessa cultura foi passado para erlenmeyer de 2 litros contendo 400 mL de 2XYT com ampicilina fazendo assim uma diluição de 1:20 da cultura inicial. O inóculo foi mantido a 37°C sob agitação até atingir

a OD entre 0,4 - 0,6, sendo posteriormente adicionado 0,5mM de IPTG. A cultura foi mantida sob agitação (180 rpm) 37°C durante 4 horas. Uma alíquota de 1mL foi coletada antes da adição do IPTG para análise da fração não induzida. Após o período de indução, foi realizada novamente a leitura da OD da cultura e uma alíquota proporcional a fração não induzida foi coletada para análise posterior em SDS-PAGE da fração induzida. O restante da cultura foi centrifugado a 26100 g por 10 min a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* guardado em freezer -80°C. As alíquotas coletadas para eletroforese em SDS-PAGE foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e os *pellets* ressuspensos em 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 10 min, 95°C e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida.

3.4 Teste de solubilidade das proteínas recombinantes

Após a confirmação da indução das proteínas recombinantes por SDS-PAGE, os *pellets* congelados, correspondentes a indução da TS completa, TS sem SAPA e TS-SAPA foram ressuspensos em tampão de ligação Histrap (20 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 30 mM de Imidazol pH 7,4), contendo PMSF ou coquetel de inibidores de protease. Esses foram lisados em homogeneizador EmulsiFlex-C3 (Avestin) de acordo com as instruções do fabricante. O produto da lise foi centrifugado a 26.100 x g a 4°C até 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 misturadas em tampão de amostra de proteína. O material foi aquecido a 95°C e resolvido em gel de poliacrilamida 10% ou 12,5% . No caso da TS sem SAPA, cuja maior parte estava presente na fração insólúvel, mais um teste de solubilidade foi feito com a mesma, mas dessa vez em diferentes concentrações de uréia (2M, 4M e 8M) dissolvida em tampão de ligação (20 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 30 mM de Imidazol pH 7,4). Para isso, o *pellet* obtido após a lise foi ressuspenso nos tampões contendo as diferentes concentrações de uréia, partindo da menor para a maior concentração. Este foi homogenizado com pipeta e vortex e posteriormente centrifugado 26.100 x g por 30 min, 4°C. Uma alíquota referente a cada concentração de uréia foi coletada, misturada em tampão de amostra de proteína e submetida a eletroforese em SDS-PAGE.

3.5 Purificação, diálise e quantificação 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* ressuspensão em tampão de ligação (20 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 30 mM de Imidazol pH 7,4) contendo 8M de ureia foram previamente filtradas em filtro 0,22 µm e purificadas em colunas de níquel de 5mL, sendo importante ressaltar que colunas novas e diferentes foram utilizadas para cada proteína. Os tampões utilizados para a purificação foram o tampão de ligação HisTrap (20 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 30 mM de Imidazol pH 7,4) usado como tampão de lavagem, e a eluição foi realizada utilizando o mesmo tampão com elevada concentração de imidazol (30 mM de fosfato de sódio, 500 mM NaCl e 500 mM de imidazol, pH 7,4.). O aparelho utilizado foi o ÄKTA Prime Plus (GE *Healthcare*) e o programa utilizado para a purificação foi configurado manualmente, com os passos de equilíbrio da coluna com 25mL de tampão de lavagem, injeção da amostra pelo *loop* 8 do aparelho e sua passagem na coluna de histidina, lavagem da coluna com tampão de lavagem e eluição da proteína com tampão contendo 500mM de imidazol.

No caso específico da proteína TS sem SAPA que apresentou-se na fração insolúvel, 8M de uréia foi adicionado aos tampões. Após purificação, alíquotas de 9 µL referentes as frações do pico de absorbância 280 nm de todas as purificações foram submetidas a eletroforese em SDS-PAGE. No caso da proteína completa, o processo de purificação foi repetido com as frações do pico da primeira cromatografia, no intuito de eliminar os contaminantes observados após a primeira cromatografia. No caso específico da proteína TS-SAPA, um passo adicional de purificação por troca iônica foi realizado de forma a eliminar os contaminantes observados após a cromatografia. Para isso, as frações do pico foram juntadas e passadas em coluna hitrap (GE HealthCare), utilizando o programa para troca iônica do aparelho. A diálise de todas as proteínas foi realizada em cassete *Slide-ALyser/Thermo Scientific*, sendo utilizado diferentes cassetes para cada proteína. Para a quantificação das proteínas, foi utilizado o reagente Bradford (BioRad) para as proteínas TS completa e TS sem SAPA e Kit 2-D Quant (GE *HealthCare*) para a TS-SAPA, visto que a proteína TS-SAPA não contém aminoácidos com anel aromático, que são importantes para a dosagem pelo método de Bradford. A massa da TS-SAPA foi confirmada por análise

da proteína purificada através de espectrometria de massa em MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization -Time of Flight) no aparelho Autoflex III (Bruker Daltonics, Alemanha), com o software Flex Control 2.4.30.0 (Bruker Daltonics, Alemanha), realizada na FUNED, Belo Horizonte, Minas Gerais.

3.6 Western blot

Após purificação, as proteínas recombinantes foram submetidas a eletroforese em SDS-PAGE 10% e posteriormente transferidas para membranas de nitrocelulose (GE HealthCare), a 100v, por 2h. Para *western blot* com extratos de parasitos foram utilizadas formas tripomastigotas e epimastigotas dos parasitos CL Brener selvagem, formas tripomastigotas dos clones 3 e 7 nocautes para genes das TS ativas, tripomastigotas dos parasitos cas::GFP (parasitos que expressam apenas a proteína cas9 e não passaram pelo processo de nocaute gênico) e dos parasitos *adback* (parasitos do clone 7 nocaute para as TS ativas que foram transfectados com uma nova construção correspondente ao vetor pROCK contendo um gene de resistência a higromicina, a sequência do gene de uma TS ativa com 19 repetições SAPA, sequência para adição de peptídeo sinal e âncora GPI, de forma a promover restauração do fenótipo $2 \cdot 10^7$ de cada cultura de parasitos foi coletado e centrifugado a $1260 \times g$ durante 10min, lavadas 1x com PBS e ressuspendidas em 200 uL de tampão RIPA (TrisHCl pH 8,0 5mM; NaCl 15 mM; NP-40 0,1%, 0,05% de Deoxicolato de sódio, 0,01% SDS), contendo tampão de amostra de proteína e posteriormente aquecidos a 95°C por 10 minutos. Essas amostras (20uL de cada) foram então submetidas a eletroforese em SDS-PAGE 7,5% e posteriormente transferidas *overnight* para membranas de nitrocelulose (GE HealthCare), num protocolo de transferência que inclui a voltagem de 24V *overnight* e 48V 1 hora antes de terminar a transferência. Após transferência, foi realizado o bloqueio das membranas com PBS-T (PBS + 0,01% Tween 20) contendo 5% de leite desnatado por pelo menos 2 horas. Após bloqueio, foi realizada incubação da membrana com o anticorpo primário anti-histidina (GE HealthCare) na diluição de 1:2000 em PBS-T 0,01% contendo 5% de leite durante 2 horas, no caso das proteínas recombinantes, e anticorpo anti-TS (gerado através da imunização de camundongos BALB/c com a proteína recombinante TS completa + alúmen e CpG) na diluição de 1:500 em PBS-T 0,01% contendo 5% de leite, *overnight*, na membrana contendo os extratos de parasito. Após os períodos de incubação, foi

realizada a lavagem das membranas por três vezes de 15min com PBS com 0,05% Tween 20 (PBS-T) e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG mouse conjugado com peroxidase (Sigma Aldrich) na diluição de 1:3000 e 1:1000 no caso das proteínas recombinantes e dos extratos dos parasitos, respectivamente. Após os períodos de incubação, foi realizada a lavagem das membranas por três vezes de 15min com PBS-T 0,05% e revelada com o reagente Luminata (Millipore). As membranas contendo os extratos dos parasitos foram posteriormente incubadas com anticorpos anti-tubulina (Sigma Aldrich) na diluição de 1:5000 por 1h como controle de *load*.

3.7 Remoção de LPS

Após purificação e diálise das proteínas recombinantes para remoção do excesso de Imidazol do tampão de eluição utilizado na purificação, NaCl e de ureia, no caso da TS sem SAPA, foi realizada a extração de LPS das proteínas recombinantes utilizando o kit toxinerasertm endotoxin removal kit (Genscript), segundo recomendações do fabricante.

3.8 Geração de anticorpos policlonais anti trans-sialidase

Os anticorpos contra as diferentes porções da proteína trans-sialidase foram gerados em camundongos BALB/c, fêmeas, com seis semanas de vida. Para isso, 10µg de cada proteína foram injetadas por via subcutânea juntamente com os adjuvantes CpG e alumínio. Nos casos da TS completa TS sem SAPA foram realizadas três imunizações, para a proteína TS-SAPA foram quatro imunizações. As imunizações foram feitas num intervalo de 15 dias entre cada uma e coleta de sangue foi realizada 10 dias depois da última imunização. O sangue foi centrifugado para obtenção do soro que foi armazenado a -20°C.

3.9 Imunização com as proteínas recombinantes, desafio com cepa Y do *T. cruzi* e parasitemia

Animais BALB/c com 6-7 semanas foram utilizados para imunização com as proteínas recombinantes e análise da parasitemia após o desafio com uma cepa virulenta do *T. cruzi*. Para isso, as proteínas recombinantes mais os adjuvantes CpG B344 (Junqueira *et al.* 2012) e alumínio 30% (v/v) foram inoculadas por via cutânea nos

animais. No total, foram dadas três doses dessa formulação aos animais, num intervalo de 21 dias entre cada imunização. Para analisar a resposta humoral dos animais imunizados, sangue foi coletado dos animais após a última imunização. Para avaliar o efeito das imunizações sob o desafio com o parasito *T. cruzi*, trinta dias após a última imunização os animais foram desafiados com 10000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y. Três dias após o desafio foi dado início a parasitemia. Para isso, 5 μ L de sangue foram coletados da cauda de cada animal e colocados entre lâmina e lamínula 20x20 mm para contagem de 50 campos em objetiva de 40X em microscópio óptico (Brener, 1969). A partir do número de parasitos observados em 5 μ L foi calculada a parasitemia, dada em número de parasitos/mL. A utilização dos animais para esses estudos foi realizada conforme aprovação pelo comitê de ética para experimentação animal da UFMG (CEUA: 11.794/2008).

3.10 Dosagem de anticorpos por ELISA

A dosagem de anticorpos foi realizada através de teste imunoenzimático (ELISA). Para isso, Placas de 96 poços foram sensibilizadas com 10ng das proteínas TS completa, TS sem SAPA e SAPA recombinantes, diluídas em tampão carbonato 0,1M (NaHCO₃, Na₂CO₃; pH 9.6) e incubadas por 18 horas a 4°C. Após esse período, o conteúdo foi descartado e a placa lavada uma vez com PBS-T 0,05% e uma vez com PBS puro. Após secagem, a placa foi bloqueada com tampão de bloqueio (PBS acrescido de 2% de leite em pó desnatado) durante o período de 2 horas a 37°C. Após esse período, o bloqueio foi descartado e a placa lavada uma vez com PBS-T e uma vez com PBS puro. Após secagem da placa, foi realizada a incubação com os soros dos animais imunizados e um soro controle (não imunizado). Para isso, os soros foram diluídos 1:400 em tampão de bloqueio e adicionada à placa. Esta foi incubada por 1h a 37°C. Após esse tempo, o conteúdo da placa foi retirado e a mesma foi lavada 3 vezes com PBS-T e 3 vezes com PBS puro. Após secagem foi realizada a incubação com o anticorpo secundário anti-IgG, diluído em tampão de bloqueio na diluição de 1:5000 e incubação durante 1 hora a 37°C. Após este tempo a placa foi lavada 6 vezes com PBS-T e 6 vezes com PBS puro. Após secagem da placa, foi adicionado aos poços 100 μ L de solução de substrato (tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 5,0 mais peróxido de hidrogênio e TMB, 3,30,5,50-tetramethylbenzidine) e esta foi mantida a temperatura ambiente por cerca de 20min, protegida da luz. A reação foi parada após

esse tempo utilizando 50uL de solução de H₂SO₄ na diluição de 1:20. A absorbância foi obtida por leitor de ELISA utilizando o comprimento de onda de 450nm.

3.11 Ensaio de imunofluorescência com anticorpos anti-TS e anti-mucina sialilada

Para realização da imunofluorescência formas tripomastigotas de parasitos WT da cepa CL Brener, parasitos cas:GFP, parasitos nocautes para as TS ativas, parasitos *addback* e formas epimastigotas de parasito WT foram fixados em paraformaldeído (PFA) 4% durante 20min e após centrifugação e remoção do PFA foram ressuspensos em PBS. Esses parasitos foram colocados em lâmina tratadas com polilisina para fixação dos parasitos na lâmina e deixados secar a temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram bloqueadas com PBS contendo 1% de BSA durante 1h. Após o período do bloqueio, as amostras foram incubadas com os anticorpos primários de interesse: anticorpos anti-TS completa na diluição de 1:50 e anticorpo anti- mucina sialilada 3C9 (Franchin *et al.*1997), cedido pelo Professor Sérgio Schenkman, da UNIFESP, na diluição de 1:10, diluídos na solução de bloqueio, durante 1h. Após incubação, o excesso de solução de anticorpo foi removido e as amostras foram lavadas três vezes com PBS. Posteriormente foi realizada a incubação com anticorpo mouse anti-IgG alexa fluor 594 (Abcam) na diluição de 1:600 em solução de bloqueio durante 1h. Posteriormente, as amostras foram lavadas três vezes com PBS e foi realizada a incubação com o corante DAPI (Sigma Aldrich) na concentração de 1mg/mL durante 30min. Após esse tempo, o excesso do corante foi removido e as amostras lavadas com PBS para retirar todo excesso do DAPI. As lâminas foram secas cuidadosamente e posteriormente foi adicionada uma gota do reagente ProlongTM Gold (*ThermoFisher Scientific*) colocando a lamínula por cima da amostra logo em seguida. Por ultimo, as extremidades da lamínula foram seladas com esmalte. As imagens foram capturadas em microscópio Ti-E confocal C2Plus (Nikon) na objetiva de 60x.

3.12 Infecção *in vitro* e *in vivo* com parasitos geneticamente manipulados

Os ensaios de infecção *in vitro* foram realizados com células LLCMK2 ou células Vero cultivadas em meio DMEM (Sigma Aldrich) que foram infectadas com

formas tripomastigotas metacíclicas obtidas de culturas em fase estacionária dos parasitos nocautes e parasitos CL Brener selvagens como controle da infecção. A progressão da infecção foi acompanhada por meio da determinação do número das formas tripomastigotas liberadas no sobrenadante através da contagem em Câmara de *Neubauer*, em comparação com a progressão da infecção das células infectadas com parasitos selvagens (WT). *In vivo*, a infectividade dos parasitos nocautes foi avaliada inicialmente por meio da análise da parasitemia de animais BALB/c inoculados intraperitonealmente com 5000 formas tripomastigotas de cultura ressuspendidas em PBS e posteriormente de animais IFN- γ nocaute inoculados com 5000 formas tripomastigotas de cultura ressuspendidas em PBS. Para a análise do sangue, 5 μ L de sangue foram coletados da cauda de cada animal e colocados entre lâmina e lamínula para contagem de 50 campos em objetiva de 40X em microscópio óptico. A partir do número de parasitos observados em 5 μ L foi calculada a parasitemia, dada em número de parasitos/ml.

3.13 Imunização com parasitos TS nocaute e desafio com formas tripomastigotas do *T. cruzi*

Para avaliar o uso potencial dos parasitos TS nocaute como vacina para a doença de Chagas, animais da linhagem BALB/c receberam uma única dose, por via intraperitoneal, de 5000 formas tripomastigotas de cultura dos parasitos nocautes, em PBS. Trinta dias após a inoculação, os animais foram desafiados com 10000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y. Animais do grupo controle receberam apenas PBS previamente ao desafio. A parasitemia dos animais foi acompanhada por contagem em câmara de *Neubauer* por cerca de 15 dias pela contagem a partir de 5 μ L de sangue coletados da cauda de cada animal e colocados entre lâmina e lamínula para contagem de 50 campos em objetiva de 40X em microscópio óptico (Brener, 1969). A partir do número de parasitos observados em 5 μ L foi calculada a parasitemia dada em número de parasitos/mL. Ao final do período de 30 dias após infecção foi coletado o sangue dos animais que sobreviveram bem como o coração, baço e músculo esquelético para avaliações histológicas e realização de qPCR para análise do parasitismo tecidual. Com relação aos órgãos coletados (baço, coração e músculo esquelético), parte deles foram fixados em solução de paraformaldeído 10% para processamento e posterior análise do número de ninhos de amastigotas e da

presença de infiltrado inflamatório, como descrito por Toro *et al.* (2017) e outra parte foi utilizada para extração de DNA tecidual para realização de qPCR. A utilização dos animais para esses estudos foi realizada conforme aprovação pelo comitê de ética para experimentação animal da UFMG (CEUA: 52/2020).

3.14 Análise do parasitismo tecidual

Para realização de qPCR foi realizada a extração de DNA de cerca de 10mg do coração, baço e músculo esquelético por meio de maceração utilizando pistilo e um tampão de lise contendo Tris 50mM pH8,0, NaCl 50mM, EDTA, 10mM, 1% de SDS e 4 mg/ml de proteinase K. Após maceração, os tecidos foram incubados a 56°C durante uma hora e posteriormente foi adicionado isopropanol absoluto para precipitação do DNA. A amostra foi centrifugada a 16.000 x g por 30min a 4°C e o sedimento, correspondente ao DNA precipitado, foi lavado uma vez com etanol 70%. O sobrenadante foi descartado, e após secagem completa do etanol do tubo, o DNA foi ressuspendido em Tris 10mM pH8, EDTA 0,1mM e quantificado em nanodrop. A concentração de DNA foi ajustada e 100ng total do mesmo foi utilizado para realização das qPCR utilizando kit Power SYBR green PCR Master Mix (*Life Technologies*) e os primers TCZ 1 (CGAGCTCTTGCCACACGGGTGCT) e TCZ 2 (CCTCCAAGCAGCGGATAGTTC AGG). Esses primers amplificam uma região repetitiva de 188pb do DNA genômico do *T. cruzi* e são específicos para esse parasito como descrito por Moser *et al.* (1989). Como controle interno as amostras também foram amplificadas com os primers do gene de camundongo que codifica TNF.

3.15 Plotagem de dados e análises estatísticas

Os gráficos gerados foram plotados utilizando o software GraphPad Prism 5 ou GraphPad Prism 8, por meio do qual também foram feitas as estatísticas dos dados, utilizando os métodos adequados para cada situação.

4 Resultados

4.1 Clonagem e expressão em *E. coli* de uma trans-sialidase do grupo I e seus diferentes domínios

Como descrito anteriormente, um dos antígenos mais testados e promissores em estudos voltados para o desenvolvimento de uma vacina para a doença de chagas é a trans-sialidase (TS). Entretanto, em nenhum dos estudos descritos envolvendo o uso desse antígeno, foi investigado se a presença das repetições de aminoácidos do domínio SAPA tem um papel protetor ou associado à virulência quando a TS é utilizada para imunização de animais. Com base nos dados do nosso grupo de pesquisa sobre antígenos contendo repetições de aminoácidos, foi sugerido que a essas repetições possam fazer parte dos mecanismos de virulência do parasito, visto que a inoculação de uma proteína do *T. cruzi* contendo apenas a sua porção repetitiva resultou na exacerbação da parasitemia após o desafio com uma cepa virulenta do parasito (Toro *et al.* 2017). Buscando testar se as repetições SAPA presentes nas TS poderiam ter um papel semelhante, foram geradas versões dessa proteína com e sem as repetições. Para isso, foi feita a clonagem e expressão do gene correspondente a TS Tc00.1047053509495.30, a qual contém 19 repetições SAPA, bem como dos domínios correspondentes a porção catalítica (N-terminal) e a porção contendo apenas as repetições SAPA (C-terminal). Esquema das diferentes partes da proteína é mostrado na figura 6.

Pares de *primers* específicos para cada segmento foram gerados para amplificar por PCR a sequência de DNA correspondente a cada domínio. Os amplicons gerados foram ligados no vetor de clonagem TOPO-TA (Invitrogen). Após digestão do plasmídeo com as enzimas *XbaI* e *XhoI*, os fragmentos de DNA correspondentes a cada domínio da TS foram transferidos para o vetor de expressão pET-21a (Novagen). A figura 7 mostra a digestão do pET-21a com as enzimas de restrição *XbaI* e *XhoI* e liberação dos fragmentos de DNA com o número de pares de bases esperado: 2673 pb para a TS completa, 1941 pb correspondente a porção catalítica e 747 pb correspondente as repetições SAPA.

Para avaliar a expressão das proteínas recombinantes, bactérias BL21 *Star* (DE3) quimiocompetentes foram transformadas com os plasmídeos contendo os respectivos insertos. Após 4 horas de indução das culturas com IPTG foram preparados extratos proteicos para serem analisados por SDS-PAGE. A figura 8 mostra a presença de

bandas correspondentes a TS completa, com 98 KDa e a TS sem SAPA, com 72 KDa somente nos extratos de bactérias que foram induzidas. 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 50KDa sendo a massa predita para essa proteína de 25KDa (figura 9A). Espectrometria de massas foi realizada com esta proteína purificada, a partir do eluato, no intuito de verificar a massa exata da proteína em questão e se a banda observada no gel seria um dímero de proteína. Como mostrado na figura 9B, uma proteína de 25590 Da foi identificada nessa análise. Assim, esse dado mostrou que de fato se tratava de uma proteína, que estava migrando como dímero no gel de poliacrilamida. Após indução, foi realizado o teste de solubilidade das proteínas recombinantes. Como mostrado na figura 10, a TS completa (A) e a TS-SAPA (B) apresentam-se tanto na porção solúvel quanto insolúvel, podendo ser feita a purificação das mesmas a partir do sobrenadante. Por outro lado, a proteína TS sem SAPA apresentou-se majoritariamente na porção insolúvel, o que tornou necessário posteriormente o tratamento dessa fração com um tampão contendo 8M de ureia para solubilização e obtenção da proteína presente nesse *pellet*.

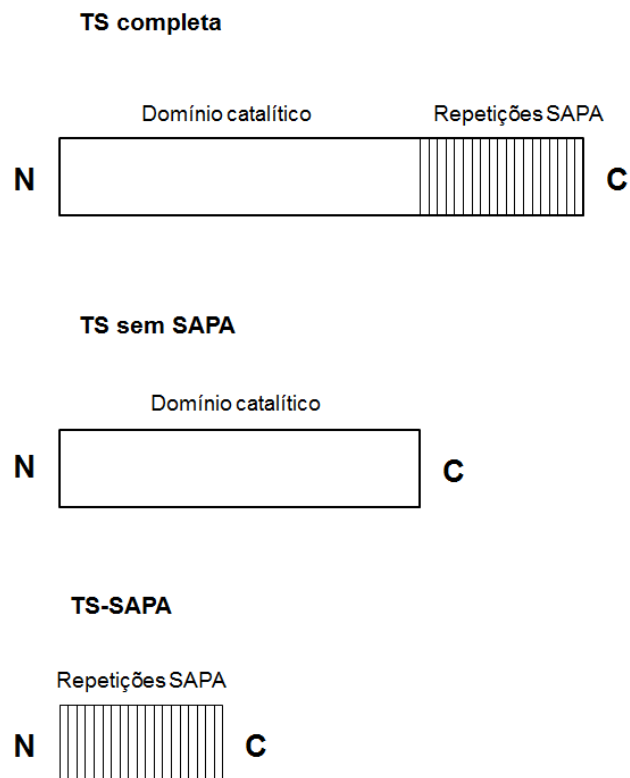


Figura 6: **Esquema das diferentes partes da TS que foram clonadas.** Figura mostra o modelo da proteína completa com o domínio catalítico, na porção N-terminal e as repetições SAPA na C-terminal; a proteína TS sem SAPA, correspondente a proteína contendo o domínio catalítico e sem as repetições SAPA; e a TS-SAPA, correspondente apenas ao motivo SAPA com 19 repetições.

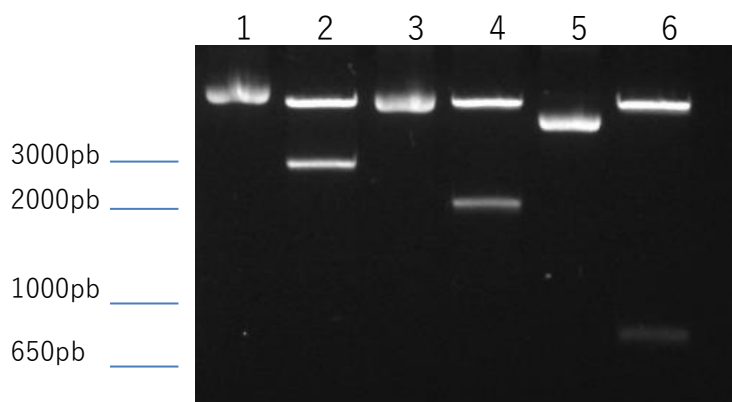


Figura 7: **Digestão do pET21a, após clonagem do gene da TS completa e seus diferentes domínios.** O vetor pET21a, contendo a sequência completa de DNA da TS Tc00.1047053509495.30 e os domínios correspondentes a porção catalítica e contendo apenas as repetições SAPA foi digerido como as enzimas *Xba*I e *Xho*I. A figura mostra um gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo onde os insertos correspondentes a TS completa, 2673 pb (canaleta 2) , TS sem SAPA, 1941 pb (canaleta 4) e TS-SAPA, 747 pb (canaleta 6) foram obtidos. As demais canaletas (1, 3 e 5) correspondem ao vetor sem digerir contendo os respectivos insertos, de acordo com a ordem acima.

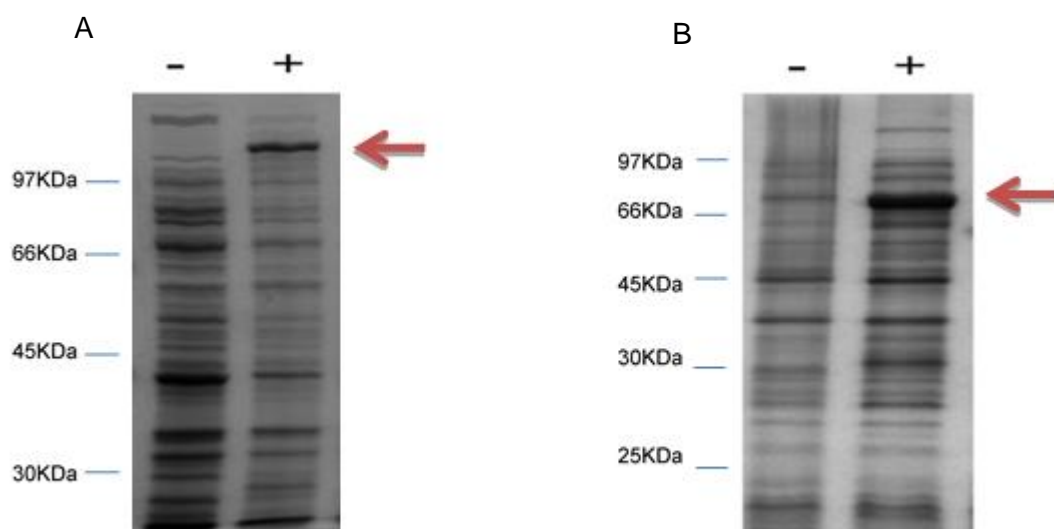


Figura 8: **Expressão das proteínas recombinantes em bactéria BL21 *star*.** SDS-PAGE (gel 10%) contendo os extratos totais das culturas de bactéria referentes a TS completa (A) e TS sem SAPA (B) antes (-) e após (+) a indução com 0,5mM de IPTG. As setas vermelhas apontam a banda correspondente a cada proteína.

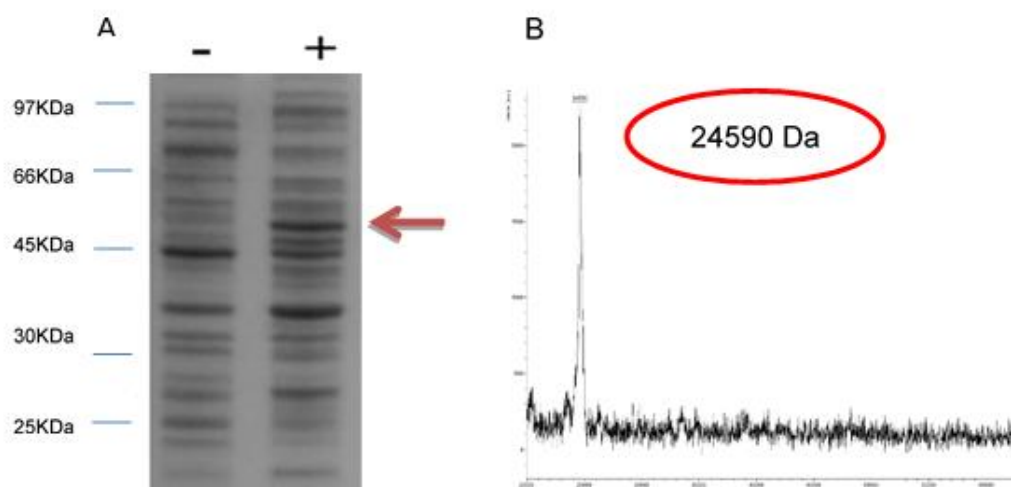


Figura 9: **Expressão da TS-SAPA em BL21 star e análise por espectrometria de massa.** (A) SDS-PAGE contendo o extrato total da cultura de bactéria referentes a TS-SAPA (A) antes (-) e após (+) a indução com 0,5mM de IPTG. A seta mostra a proteína migrando em aproximadamente 50 KDa. Em B é mostrado a espectrometria de massa da fração purificada da TS-SAPA, a partir do eluato da purificação.

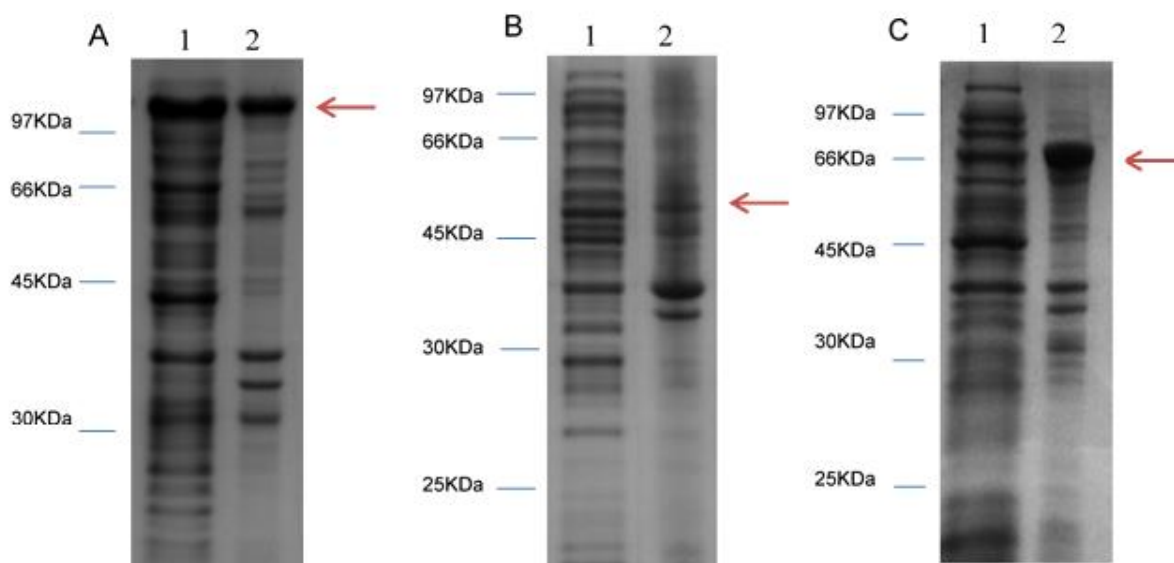


Figura 10: **Solubilidade das proteínas recombinantes.** SDS-PAGE mostrando as frações sóluvel (canaletas 1) e insolúvel (canaletas 2) das proteínas recombinantes após lise das bactérias: (A) TS completa, (B) TS-SAPA e (C) TS sem SAPA.

4.2 Purificação das proteínas recombinantes

Como mostrado no item anterior, após processo de indução e lise das culturas bacterianas, as proteínas TS completa e TS-SAPA apresentaram-se no sobrenadante, onde estão as proteínas solúveis. Essa fração foi utilizada para purificação por cromatografia de afinidade utilizando coluna de níquel. No caso da TS-SAPA, a cromatografia por troca iônica foi empregada em um segundo passo de purificação para obtenção de uma maior pureza da proteína de interesse. No caso da TS sem SAPA, a fração insolúvel foi utilizada e foi possível a obtenção da proteína de interesse após a solubilização do *pellet* insolúvel com 8M de ureia. A figura 11 mostra o produto final da purificação das proteínas recombinantes. *Western blot* utilizando anti-histag (GE) foi realizado para identificação das proteínas recombinantes. Como observado, tanto a TS completa como a TS sem SAPA foram identificadas pelo anti-his, no entanto um fraco sinal foi observado para a TS-SAPA.

4.3 Imunização de animais com a TS recombinante e seus domínios e desafio com uma cepa virulenta do *T. cruzi*

Após purificação e extração de LPS das proteínas recombinantes, essas foram utilizadas para imunização, juntamente com os adjuvantes CpG B344 (Junqueira *et al.* 2012) e alúmen, de camundongos da linhagem BALB/c. Três doses das diferentes proteínas recombinantes mais os adjuvantes foram administradas nos animais e 30 dias após a terceira imunização foi realizado o desafio dos animais com a cepa Y de *T. cruzi*. O Esquema da imunização é mostrado na figura 12.

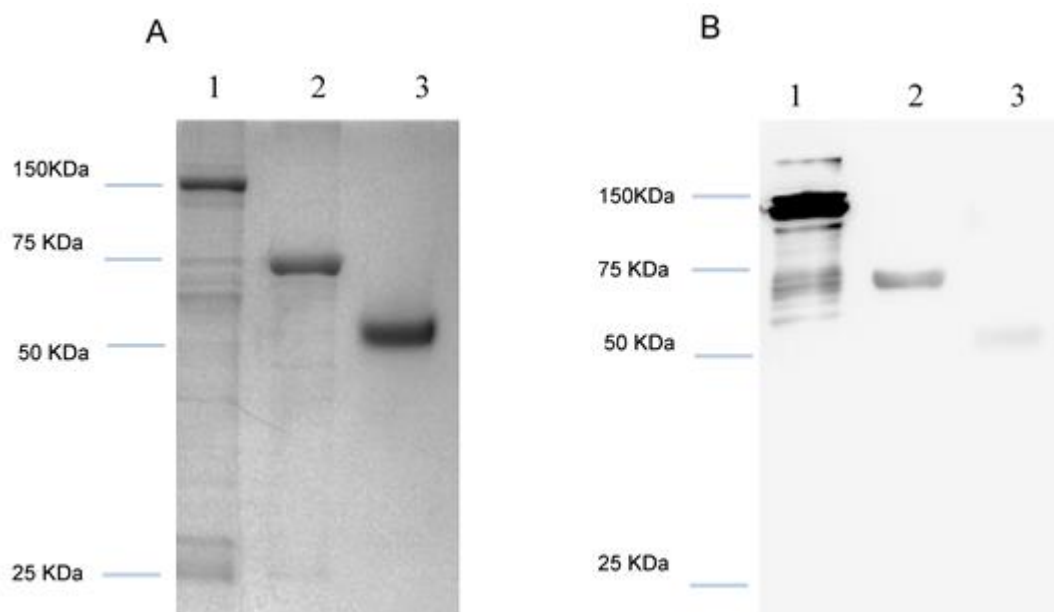


Figura 11: **Análise das proteínas recombinantes purificadas.** (A) SDS-PAGE das proteínas recombinantes TS completa (1), TS sem SAPA (2) e TS-SAPA (3). (B) Após separação em SDS-PAGE, cerca de 1 μ g das proteínas recombinantes purificadas foram transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com os anticorpos primários anti-histidina na proporção 1:2000 e secundário anti-IgG conjugado com peroxidase, na proporção 1:3000.

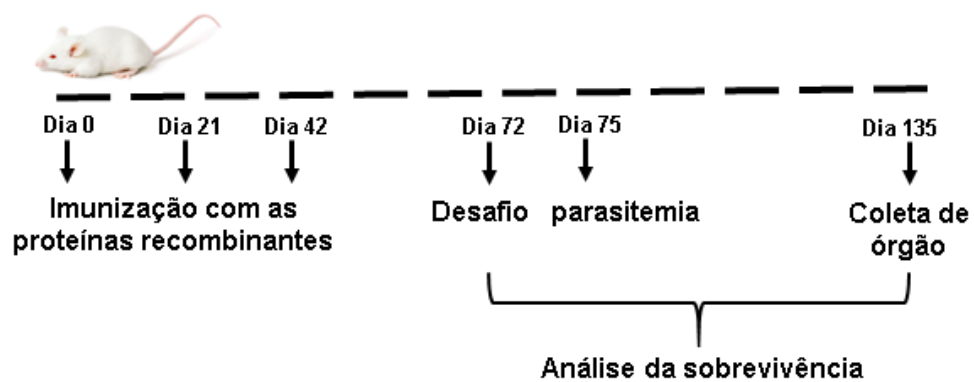


Figura 12: Esquema de imunização com as proteínas recombinantes.

Como mostrado na figura 13, a imunização com a proteína TS recombinante, bem como as versões TS sem SAPA e TS-SAPA foram capazes de reduzir o pico de parasitemia nos animais, quando comparadas ao grupo controle correspondente aos animais que receberam apenas PBS e os adjuvantes CpG B344 e alumínio (fig 13). Em nenhum dos grupos foi observada uma redução completa da parasitemia, sendo que a maior redução observada, de cerca de 90% em comparação ao grupo controle, foi obtida nos animais que foram imunizados com a TS sem SAPA. As demais proteínas, TS-SAPA e TS completa, causaram uma redução de cerca de 80% e 50% do pico da parasitemia nos animais, respectivamente, indicando terem um potencial menor de proteção após o desafio por uma cepa virulenta do *T. cruzi*. Com relação a sobrevivência, é interessante notar que em todos os grupos, exceto aquele imunizado com a TS-SAPA, contendo apenas o motivo repetitivo, houve sobrevivência de 100% dos animais até 60 dias pos-infecção. Apesar de não ser observada uma diferença significativa em relação ao grupo controle, a imunização com TS-SAPA parece levar a um aumento da mortalidade.

A resposta humoral dos animais imunizados com as diferentes proteínas foi avaliada através de ELISA por meio da quantificação da produção de IgG e suas subclasses, visto a importância de IgG para neutralização das formas extracelulares do *T. cruzi*. Para isso, o soro dos animais imunizados com as diferentes proteínas recombinantes mais os adjuvantes foram coletado cerca de 21 dias após a terceira imunização. Como mostrado na figura 14 a imunização com todas as proteínas recombinantes foi capaz de induzir produção de IgG total, sendo observado altos níveis de indução desse anticorpo quando os animais são imunizados com a TS-SAPA, proteína correspondente apenas as repetições SAPA.

Sabendo que o padrão de resposta Th1 é importante para proteção contra o *T. cruzi* (Martin, Tarleton, 2004) também avaliamos a produção das subclasses IgG1 e IgG2a induzida pelos animais imunizados, visto sua importância em definir os padrões de resposta anti-inflamatório (Th2) ou inflamatório (Th1), respectivamente. Como mostrado na figura 15, a imunização com todas as proteínas recombinantes foi capaz de induzir altos níveis de IgG1 contra elas mesmas, sendo possível observar níveis de indução ainda maiores pelos animais imunizados com a TS completa e com apenas as repetições SAPA (TS-SAPA). Por outro lado, ausência de IgG2a foi observada em todos os casos, não havendo indução dessa subclasse de anticorpo por nenhuma das proteínas recombinantes

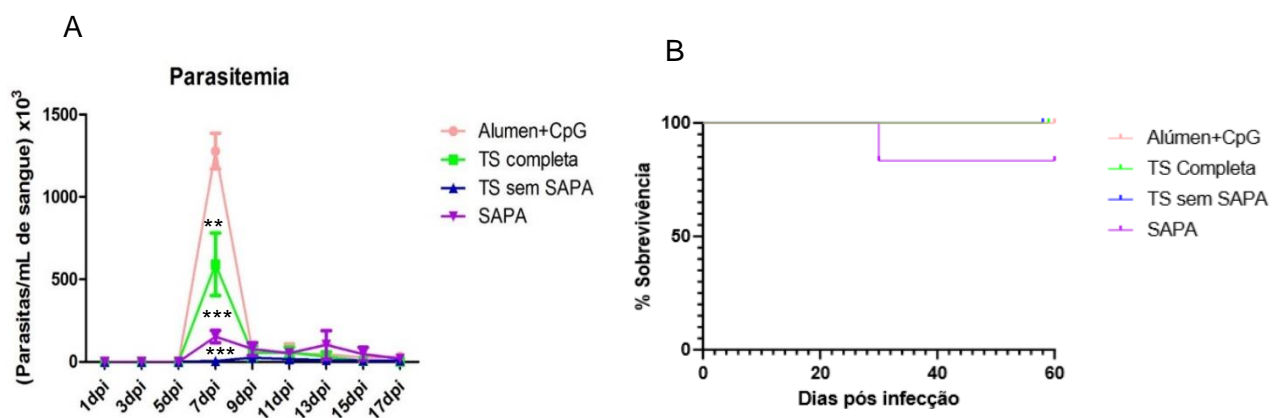
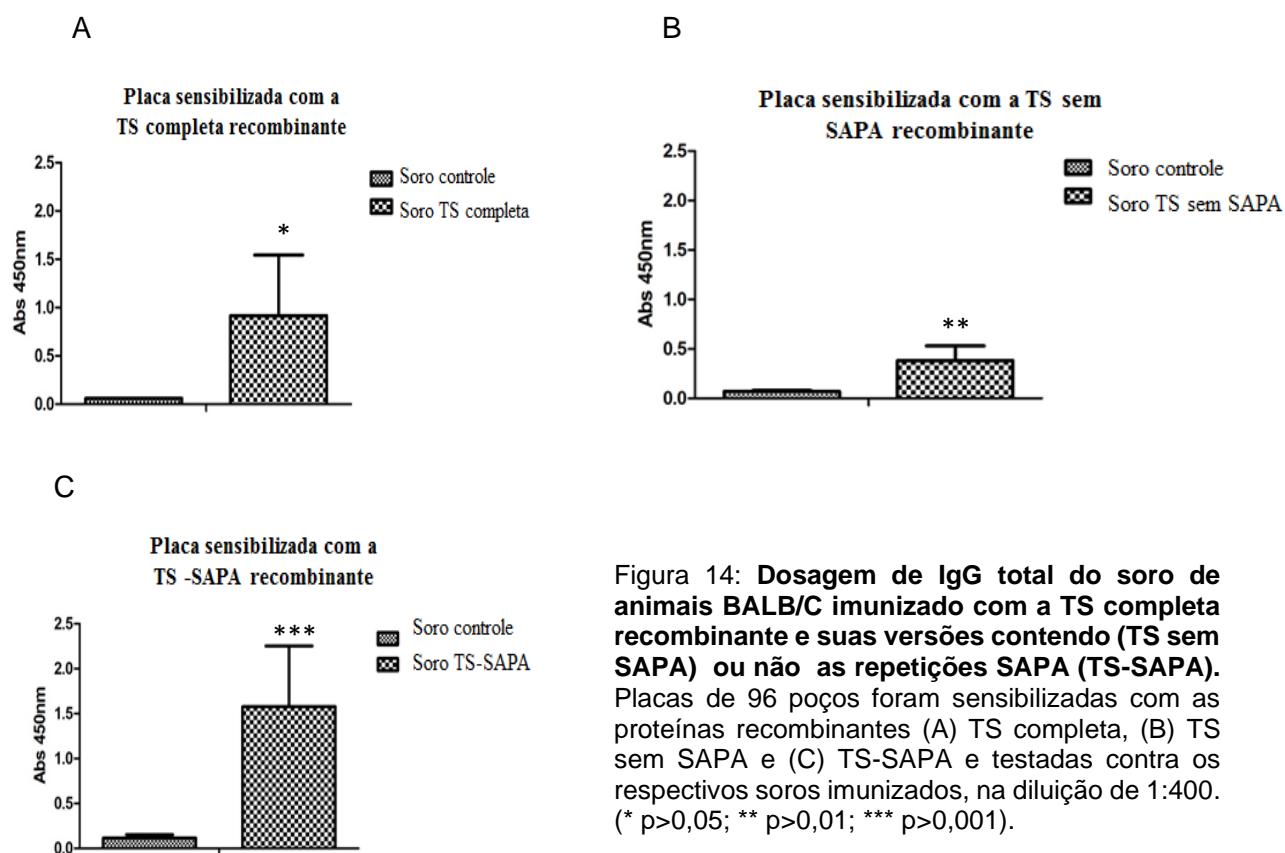


Figura 13: **Parasitemia e sobrevivência dos animais imunizados com TS recombinante e suas versões truncadas.** Parasitemia média (A) e sobrevivência (B) de camundongos BALB/c imunizados com as as proteínas recombinantes TS completa, TS sem SAPA e TS-SAPA mais os adjuvantes alúmen e CpG e o grupo controle imunizado apenas com os adjuvantes alúmen e CpG, e posteriormente desafiados com 10000 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*. Parasitemia foi analisada durante 17 dias (** $p > 0,01$; *** $p > 0,001$).



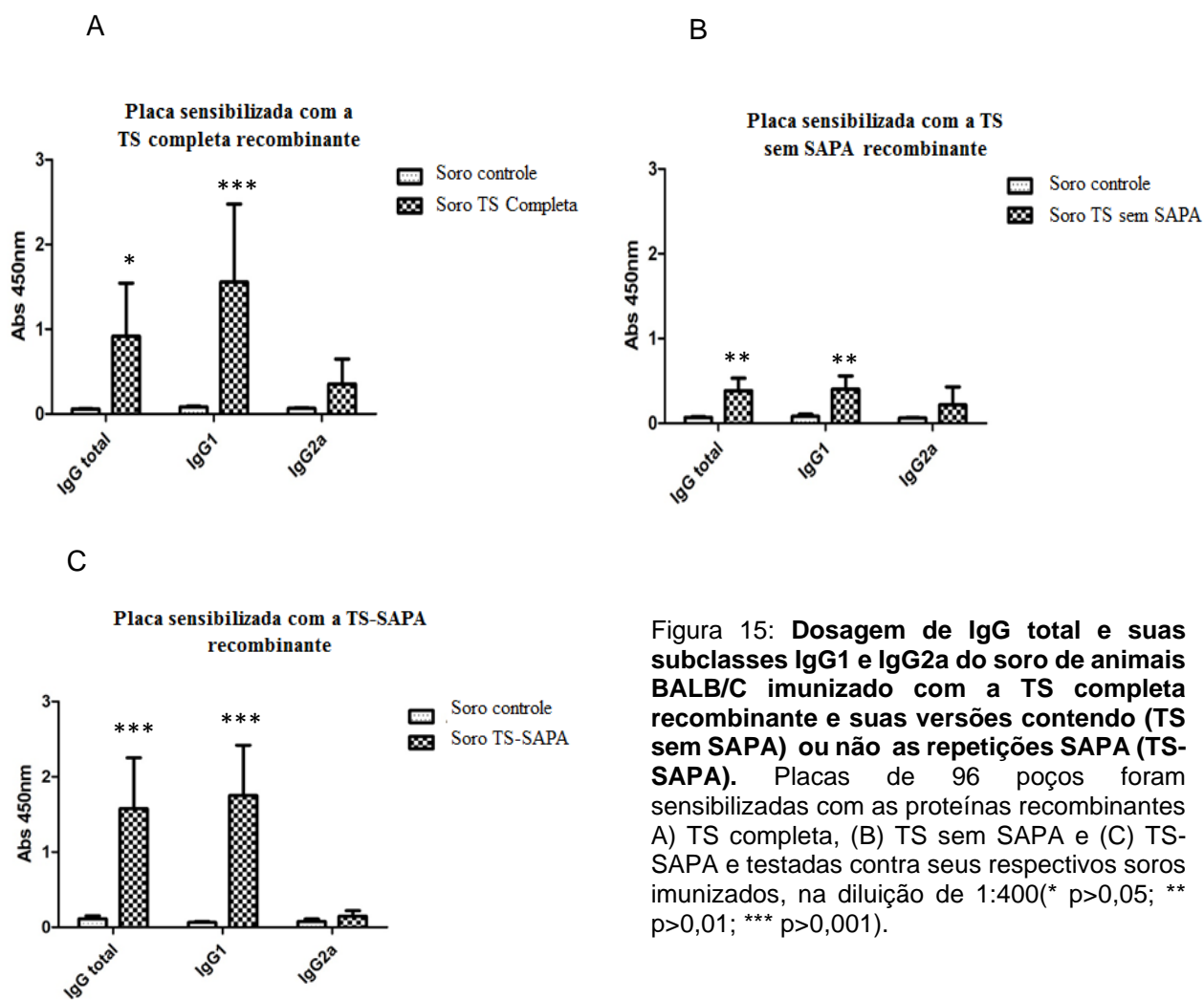


Figura 15: Dosagem de IgG total e suas subclasses IgG1 e IgG2a do soro de animais BALB/C imunizado com a TS completa recombinante e suas versões contendo (TS sem SAPA) ou não as repetições SAPA (TS-SAPA). Placas de 96 poços foram sensibilizadas com as proteínas recombinantes A) TS completa, (B) TS sem SAPA e (C) TS-SAPA e testadas contra seus respectivos soros imunizados, na diluição de 1:400 (* $p > 0,05$; ** $p > 0,01$; *** $p > 0,001$).

Além de analisar a produção de IgG total dos animais imunizados contra as respectivas proteínas utilizadas para imunizar, também testamos os soros dos animais imunizados contra as outras porções da TS. Assim, os soros dos imunizados com a TS completa foi testado tanto contra a proteína TS completa como para o domínio catalítico e a porção repetitiva da TS. A mesma análise foi realizada com os soros dos imunizados com a TS sem SAPA e a TS-SAPA.

Como já mencionado, a imunização com a proteína TS completa é capaz de induzir produção de IgG total contra ela mesma. A análise de produção de IgG total pelos animais imunizados com a TS completa contra os demais domínios da TS demonstra uma alta produção de anticorpos IgG direcionada para a porção repetitiva, visto que não é possível detectar IgG quando o soro é incubado com a proteína TS sem SAPA (fig 16). Assim, esse dado corrobora os estudos que apontam as repetições SAPA como uma porção imunodominante da TS rica em epítomos para célula B, o que torna esperada a grande produção de anticorpos contra mesma. Quando analisamos a produção de IgG total dos animais imunizados com a proteína correspondente apenas ao domínio repetitivo (TS-SAPA), observamos uma alta produção de anticorpos contra ela mesma. Nenhum grau de produção de IgG é observado contra a proteína TS sem SAPA, que compreende a região do domínio catalítico, fato já esperado, visto que essa proteína não inclui nenhum segmento das repetições SAPA. Curiosamente, também não foi observada produção de IgG contra a proteína TS completa, o que não era esperado visto que esta proteína contém além do domínio catalítico as 19 repetições SAPA (fig 17).

Com relação ao soro dos imunizados com TS sem SAPA, produção de IgG foi detectada contra a própria proteína TS sem SAPA. Porém produção de IgG total contra a TS completa não foi observada, o que não era esperado visto que, exceto pelas repetições SAPA, a TS completa compartilha um grande segmento da sua sequência com a TS sem SAPA. Por outro lado, como esperado, produção de IgG total não foi observada contra a proteína TS-SAPA, visto que a TS sem SAPA não inclui nenhum segmento das repetições SAPA (fig 18).

Além dessas análises, de forma a avaliar se a imunização com a TS e seus domínios poderia influenciar a resposta dos animais às demais proteínas do *T. cruzi*, testamos os soros dos animais imunizados com as diferentes proteínas e desafiados com a cepa Y do *T. cruzi* contra o extrato proteico de formas tripomastigotas dessa mesma cepa. A produção de IgG total, IgG1 e IgG2a foram avaliadas. Os dados de

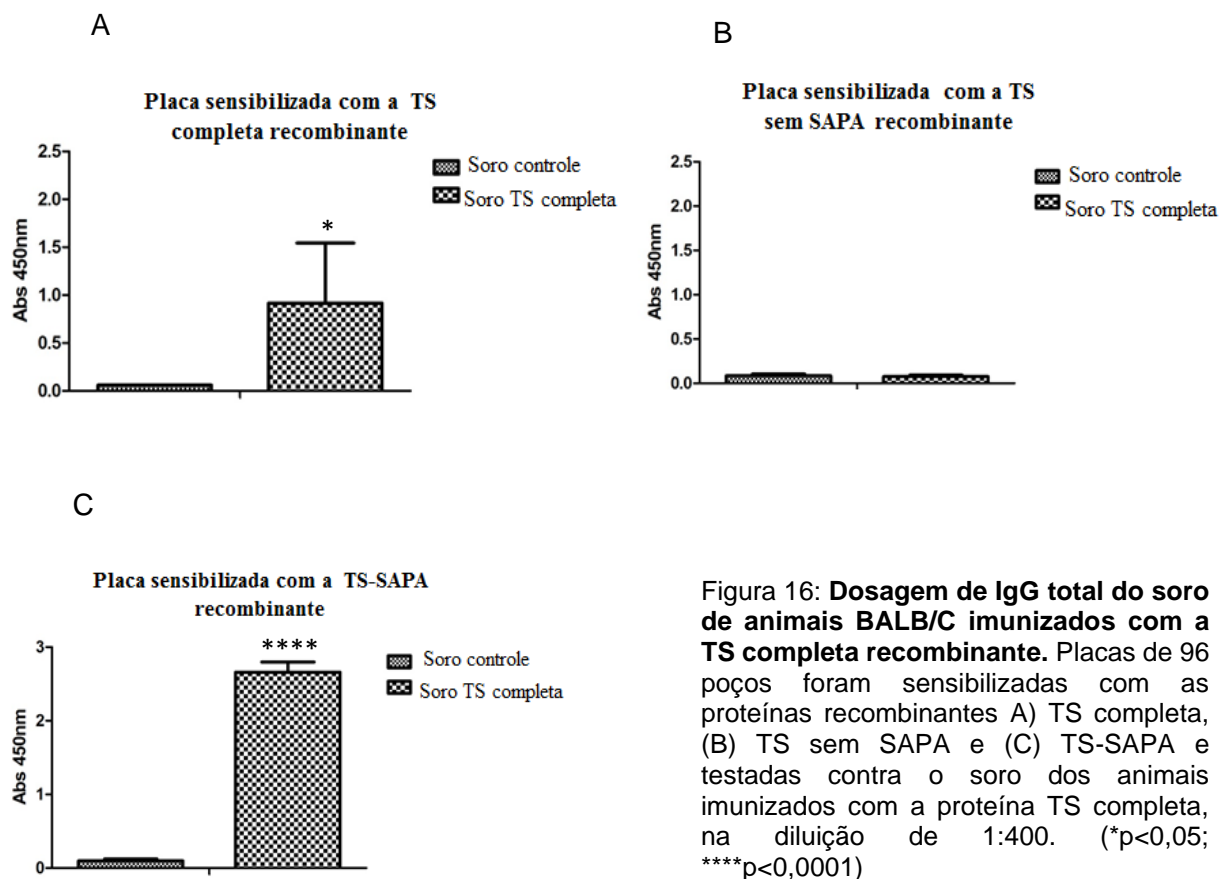


Figura 16: Dosagem de IgG total do soro de animais BALB/C imunizados com a TS completa recombinante. Placas de 96 poços foram sensibilizadas com as proteínas recombinantes A) TS completa, (B) TS sem SAPA e (C) TS-SAPA e testadas contra o soro dos animais imunizados com a proteína TS completa, na diluição de 1:400. (* $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$)

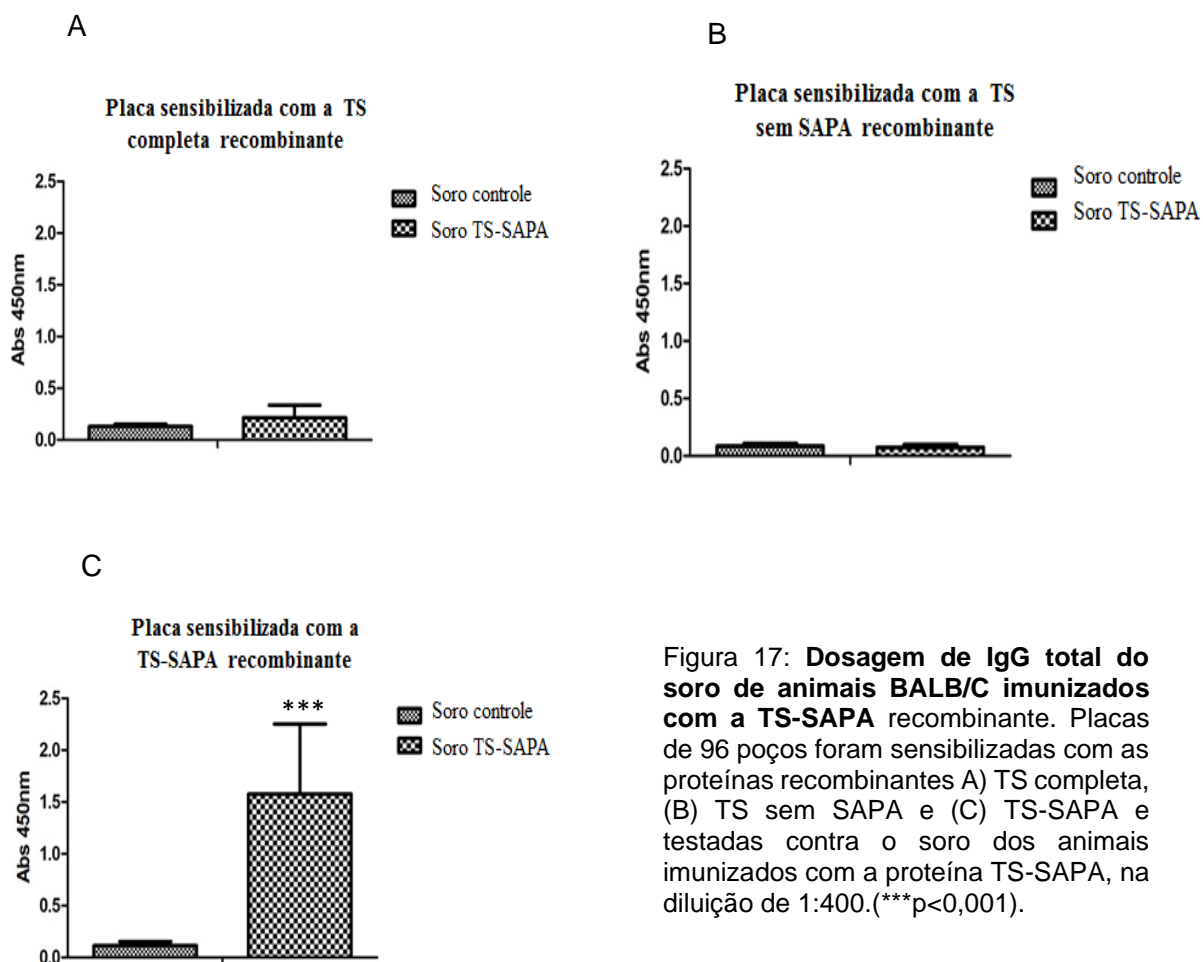
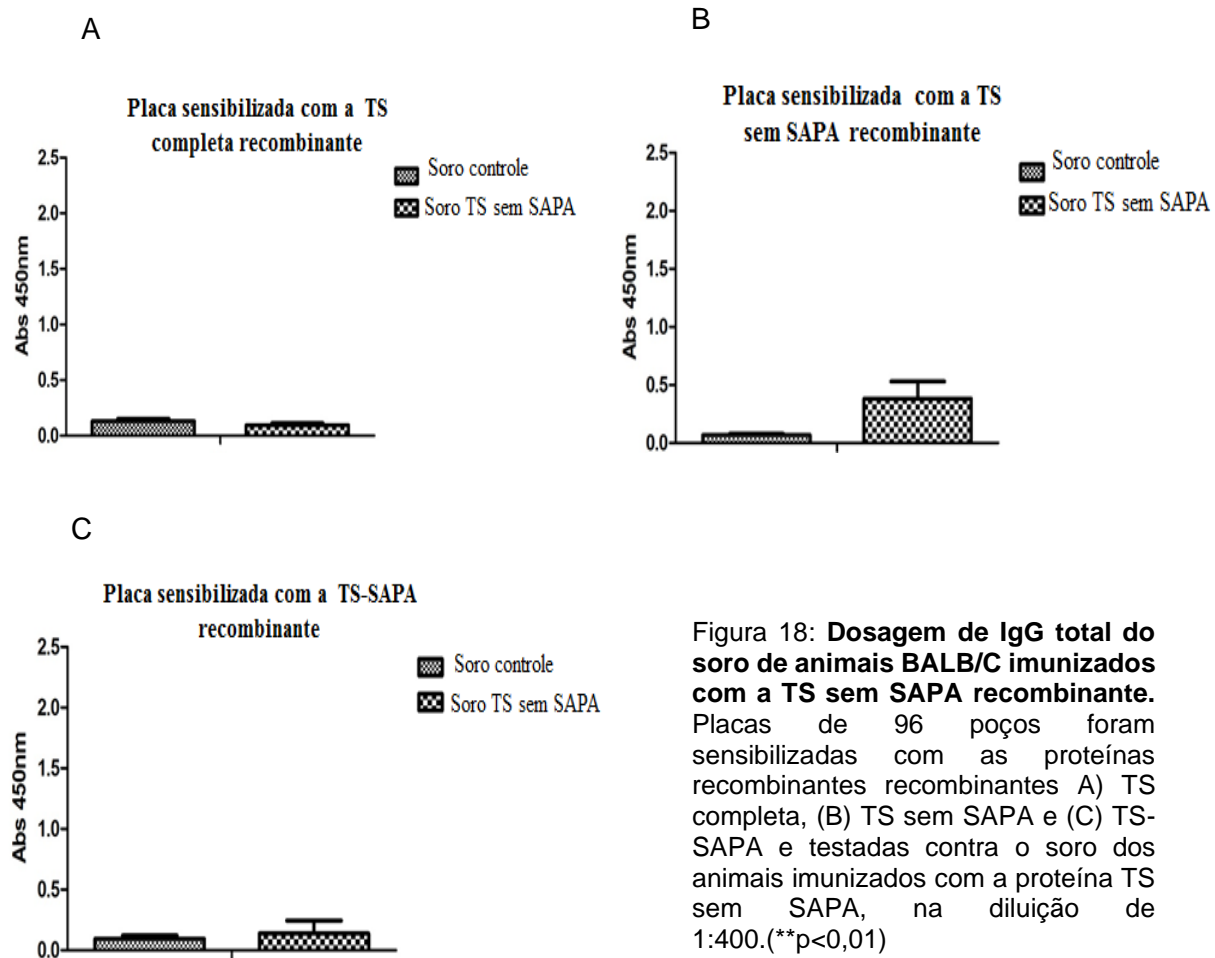


Figura 17: Dosagem de IgG total do soro de animais BALB/C imunizados com a TS-SAPA recombinante. Placas de 96 poços foram sensibilizadas com as proteínas recombinantes A) TS completa, (B) TS sem SAPA e (C) TS-SAPA e testadas contra o soro dos animais imunizados com a proteína TS-SAPA, na diluição de 1:400. (** $p < 0,001$).



ELISA utilizando placas sensibilizadas com o extrato proteico das formas tripomastigotas do *T. cruzi* sugerem que a imunização com a TS e seus domínios não alteram a produção de anticorpos IgG total e IgG1 contra outras proteínas do parasito. No entanto, quando analisamos a produção da subclasse IgG2a, há uma tendência de diminuição de anticorpos IgG2a contra o extrato proteico do *T. cruzi* no soro dos imunizados com a proteína correspondente apenas a região repetitiva (TS-SAPA), figura 19. Apontando uma característica imunomodulatória das repetições SAPA. Os anticorpos da subclasse IgG2a estão relacionados com um perfil Th1 de resposta imune, que é o perfil sabidamente importante na imunidade protetora contra a doença de Chagas. Assim, a imunização com as repetições SAPA pode contribuir para o agravamento da infecção no hospedeiro, visto que a resposta Th1 está sendo de alguma forma inibida.

Os soros dos animais imunizados com as proteínas recombinantes também foram testados através de *western blot* contendo as diferentes proteínas: TS completa, TS sem SAPA e TS-SAPA e contra os extratos proteicos de formas epimastigotas e tripomastigotas da cepa CL-Brener (figura 20). Como esperado, o soro dos animais imunizados com a proteína TS completa é capaz de reconhecer todas as proteínas recombinantes, pois possui tanto anticorpos contra a porção catalítica, como contra as repetições SAPA. Nesse caso é importante notar que a porção repetitiva tem uma afinidade maior pelos anticorpos em relação a porção catalítica, corroborando os dados de ELISA que mostram que os anticorpos gerados contra a TS completa são direcionados exclusivamente para as repetições SAPA, o que mostra mais uma vez que as repetições SAPA exercem uma imunodominância em relação a porção catalítica da trans-sialidase. O soro dos animais imunizados com a TS sem SAPA foi capaz de reconhecer tanto a própria TS sem SAPA quanto a TS completa, visto que essa proteína também contém a porção catalítica e, como esperado, não houve reconhecimento da proteína TS-SAPA por esse soro, visto que as repetições SAPA são ausentes na proteína TS sem SAPA. Com relação aos soros dos animais imunizados com a TS-SAPA, houve reconhecimento da própria proteína TS-SAPA quanto da TS completa, visto que essa proteína também contém as repetições SAPA. A proteína TS sem SAPA não foi reconhecida por esses anticorpos, visto que essa proteína não contém nenhum segmento das repetições SAPA. Após testagem dos soros por *western blot* e de forma a identificar as proteínas da família das trans-sialidases no *T. cruzi*, o extrato proteico de formas epimastigotas e

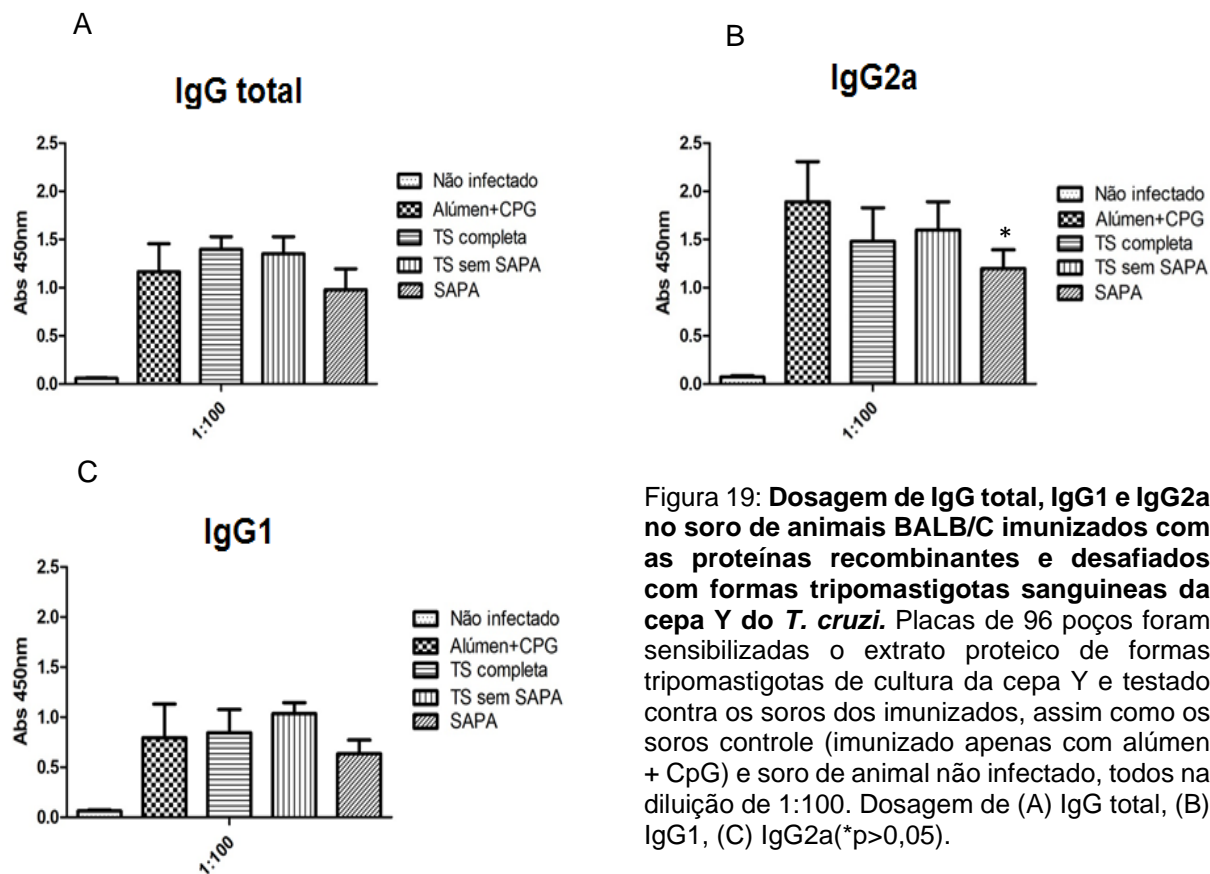


Figura 19: Dosagem de IgG total, IgG1 e IgG2a no soro de animais BALB/C imunizados com as proteínas recombinantes e desafiados com formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi*. Placas de 96 poços foram sensibilizadas o extrato proteico de formas tripomastigotas de cultura da cepa Y e testado contra os soros dos imunizados, assim como os soros controle (imunizado apenas com alúmen + CpG) e soro de animal não infectado, todos na diluição de 1:100. Dosagem de (A) IgG total, (B) IgG1, (C) IgG2a(* $p > 0,05$).

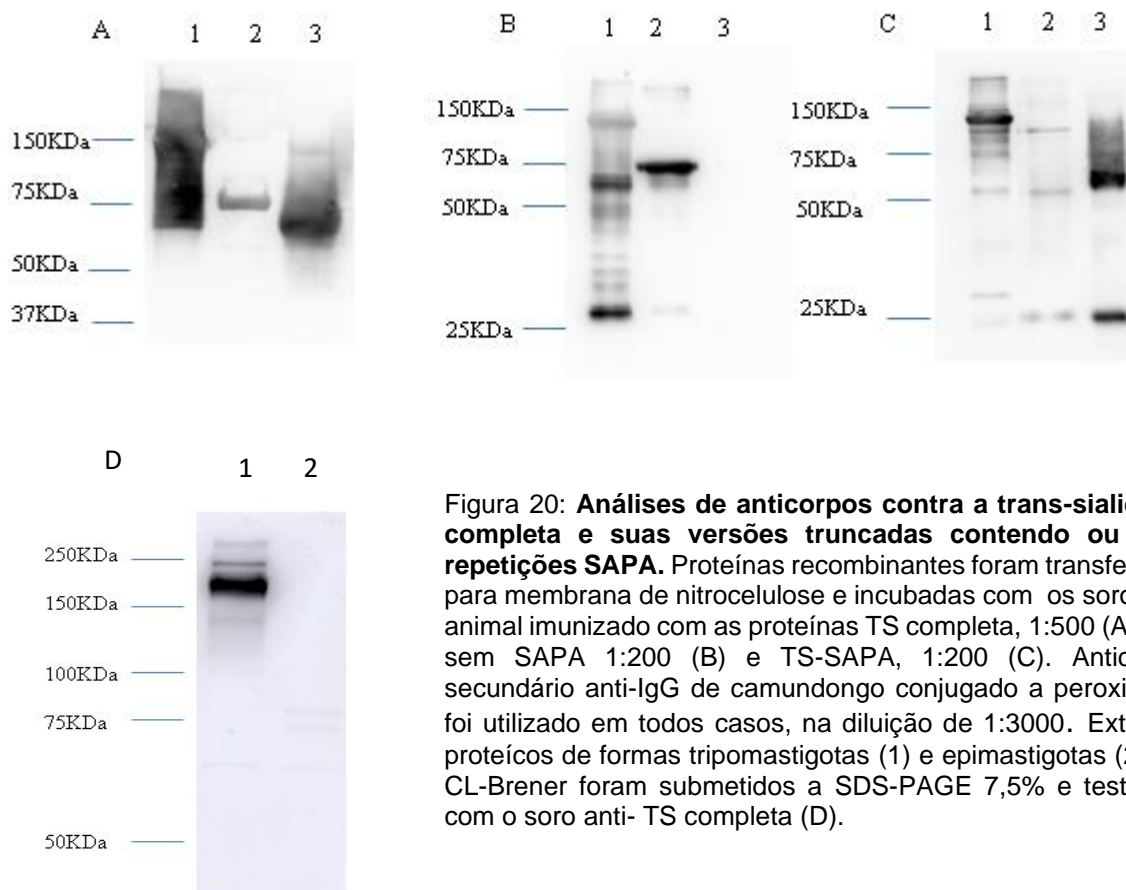


Figura 20: **Análises de anticorpos contra a trans-sialidase completa e suas versões truncadas contendo ou não repetições SAPA.** Proteínas recombinantes foram transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com os soros de animal imunizado com as proteínas TS completa, 1:500 (A), TS sem SAPA 1:200 (B) e TS-SAPA, 1:200 (C). Anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase foi utilizado em todos casos, na diluição de 1:3000. Extratos proteicos de formas tripomastigotas (1) e epimastigotas (2) de CL-Brener foram submetidos a SDS-PAGE 7,5% e testados com o soro anti- TS completa (D).

tripomastigotas da cepa CL-Brener do *T. cruzi* foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida, transferidos para membranas de nitrocelulose e incubados com o soro anti-TS completa. Como é possível observar na figura 20 (D), o soro anti-TS completa foi capaz de reconhecer proteínas de alto peso molecular no extrato de formas tripomastigotas do *T. cruzi*, mas nenhum reconhecimento foi observado em extrato de epimastigota.

4.4 Caracterização da família multigênica das trans-sialidases do *T. cruzi*

Dados obtidos em experimentos de imunização com membros da família das TS, descritos por vários grupos indicam que essas proteínas são capazes de induzir resposta protetora contra a doença de Chagas (Quijano-Hernandez & Dumonteil, 2011). Além de serem estudadas como um possível alvo da resposta imune protetora na doença de Chagas, as TS são proteínas com múltiplos papéis na infecção pelo *T. cruzi*. Entre os membros dessa família, as TS que possuem atividade catalítica, classificadas como TS do grupo I por Freitas *et al.* (2011) tem sido intensamente investigadas por serem consideradas fatores de virulência do parasito. O fato de existir um alto número de cópias de genes codificadores de TS no genoma do *T. cruzi* reforça esse importante papel como fatores de virulência. Entretanto, por conter um número elevado de cópias no genoma, até hoje não foi possível investigar o papel da família das TS e, particularmente as TS do grupo I, por meio da genética reversa, ou seja, por meio da deleção desses genes no genoma do parasito. Com advento da tecnologia de CRISPR/Cas9, tornou-se possível o estudo do papel de proteínas do parasito codificadas por famílias multigênicas (Burle *et al.* 2015). Assim, nesse segunda parte do nosso trabalho decidimos avaliar o efeito do nocaute dos genes codificadores de TS ativas do *T. cruzi* utilizando a metodologia de CRISPR/Cas9. A deleção gênica por CRISPR/Cas9 requer a formação na célula alvo de um complexo de RNA com a endonuclease Cas9, que se liga por complementaridade às sequências no DNA e causa uma quebra de dupla fita (DSB) sítio específica. Assim, para a realização do nocaute gênico de TS, é necessário que as sequências de todos os genes das TS ativas presentes no genoma do parasito sejam bem conhecidos.

O primeiro passo para esse estudo consistiu na realização de análises *in silico* buscando conhecer com maior precisão o número de genes codificadores de TS ativas no genoma do clone CL Brener e, entre esses, quais possuem sequências

codificadoras de repetições SAPA. Como descrito na literatura, utilizando as sequências disponíveis no banco de dados *TriTrypDB*, Freitas *et al.* 2011, realizou uma caracterização de todos os genes das TS do clone CL Brener, e classificaram em oito grupos os membros dessa família. Entretanto, os dados disponíveis no banco *tritrypdb* (www.tritrypdb.org) utilizados por Freitas e cols. não correspondem ao genoma completo do clone CL Brener, visto que a montagem desse genoma encontra-se ainda incompleta. Isso ocorre porque esse clone de *T. cruzi* é derivado de uma cepa híbrida e com um grande conteúdo de repetições o que impediu a montagem completa desse genoma (El-Sayed *et al.* 2005). Assim, de forma a obter uma caracterização do repertório completo de genes codificadores de TS ativas, dados de sequenciamento obtidos na plataforma PacBio, fornecidos gentilmente pelo grupo da Dra. Daniella Bartholomeu foram analisados. Sequências geradas pela plataforma PacBio são mais longas, com mais de 10.000 pares de bases e permitem a montagem de regiões que possuem muitos padrões de repetição, como ocorre com frequência no genoma do *T. cruzi*. Com base nas análises dessas sequências foram identificadas 18 genes codificando TS ativas, 3 a mais do que as sequências presentes no banco de dados *tritrypdb*, sendo que seis delas possuem o motivo repetitivo SAPA (tabela 1). Como para cada gene do parasito podemos identificar dois alelos (correspondente aos haplótipos esmeraldo-like e não esmeraldo), estimou-se a presença de 9 genes codificadores de TS ativas no genoma do clone CL Brener. Como mostrado na Tabela 1, quatro desses genes possuem códon prematuro de parada e são na realidade pseudogenes.

4.5 Caracterização de linhagens nocautes de TS ativas

Uma vez obtidas todas as sequências de TS ativas presentes no genoma do clone CL Brener foi possível determinar as sequências que devem fazer parte dos RNA guias ou sgRNAs para os experimentos de nocaute utilizando CRISPR/Cas9. Todas as etapas da geração de linhagens de *T. cruzi* nocautes para as TS ativas realizada pela Dr^a Gabriela Burle Caldas, encontram-se descritas no manuscrito anexado ao final dessa Tese. Inicialmente foi gerada uma linhagem de epimastigotas do clone CL Brener expressando constitutivamente a enzima Cas9 de *Streptococcus pyogenes*, em fusão com GFP, a qual foi transfectada com dois sgRNAs contendo sequências conservadas presentes somente nos genes codificadores de TS ativas.

TriTrypdb ID	PacBio ID	% Identity	Allele	Chromosome	SAPA repeats
TcCLB.509817.50	TcCBr004.g1991	100%	Esmeraldo-like	16	0
TcCLB.508089.10	TcCBr036.g11703	100%	Esmeraldo-like	11	0
TcCLB.505931.30	TcCBr103.g24598	100%	Esmeraldo-like	30	0
TcCLB.507979.30	TcCBr127.g27088	98.63%	Esmeraldo-like	17	9
TcCLB.511323.10	TcCBr028.g9710	100%	Non Esmeraldo	17	6
TcCLB.506975.80	TcCBr030.g10449	100%	Non Esmeraldo	16	0
TcCLB.503993.10	TcCBr199.g30831	100%	Non Esmeraldo	30	0
TcCLB.507085.30	TcCBr120.g26481	99.66%	Non Esmeraldo	33	15
TcCLB.510787.10	TcCBr120.g26526	95.58%	Non Esmeraldo	33	41
TcCLB.509495.30	TcCBr234.g31624	94.93%	Non Esmeraldo	33	19
TcCLB.508857.30	TcCBr090.g22670	99.86%	Non Esmeraldo	11	0
TcCLB.508913.10*	TcCBr143.g28246*	99.80%	Non Esmeraldo	17	0
TcCLB.507611.260*	TcCBr104.g24660*	100%	Esmeraldo-like	37	0
TcCLB.508501.320*	TcCBr120.g26526*	91.81%	Non Esmeraldo	33	0
TcCLB.508859.118*	TcCBr036.g11754*	99.46%	Non Esmeraldo	17	0
-	TcCBr278.g32284*				
-	TcCBr143.g28263*				
-	TcCBr014.g5552**				

Tabela 1: **TS ativas do grupo I das TS.** Na tabela são mostradas as sequências de genes de TS ativas presentes no genoma do clone CL Brener de acordo com o banco de dados TrytripDB e aquelas obtidas a partir dos dados de sequência de PacBio. Para cada sequência foi identificado o haplótipo ao qual pertence, o cromossomo onde se localiza e a presença ou não de repetições SAPA com o número de módulos repetitivos.

Juntamente com os sgRNAs também foi fornecida uma sequência, denominada sequência doadora, de forma a induzir o reparo da quebra do DNA causada pela Cas9 através do processo de recombinação homóloga. Essa sequência doadora contém, junto às extremidades de homologia ao gene da TS, três sequências de parada de tradução (*stop códons*) que irão interromper a fase de leitura do genes alvos. Além disso a sequência doadora possui sítios de enzimas de restrição e sítios de anelamento de primers que permitem avaliar a interrupção dos genes da TS em diferentes clones transfectados por meio de PCR e digestão com a enzima *EcoRV* (Burle-Caldas, Aprigio-Santos, manuscrito em preparação, ver anexo I). Após a transfecção, a população transfectada foi clonada em placas de 96 poços e vários clones foram analisados por PCR. Após confirmação do nocaute dos genes das TS ativas por meio de PCR utilizando os primers M13 e digestão com *EcoRV* dois clones, clones TSKO3 e TSKO7 foram selecionados para serem caracterizados. Inicialmente *western blot* utilizando anticorpos gerados em camundongos contra a TS completa recombinante foi realizado. Como já mostrado anteriormente, os anticorpos gerados pela imunização com a proteína recombinante TS completa são direcionados contra as repetições SAPA, presentes somente em TS ativas. Assim, foi possível avaliar por meio de *western blot* utilizando esse anticorpo, os níveis de proteína correspondente as TS ativas contendo repetições SAPA expressas por dois clones derivados de linhagens nocautes. Como mostrado na figura 21, uma diminuição significativa (clone KO3) ou mesmo a ausência da proteína TS (clone KO7) é observada nos extratos proteico de tripomastigotas de linhagens nocautes para TS ativas em comparação aos extratos de formas tripomastigotas de parasitos WT e parasitos expressando Cas::GFP (e que não passaram pelo processo de nocaute gênico). Como esperado, a expressão de TS contendo repetições SAPA não foi observada nas formas epimastigotas. Extratos de parasitos *adback*, gerados a partir do clone KO3 (formas tripomastigotas) avaliados com o soro policlonal anti-TS também foram reconhecidos pelos anticorpos. A geração desses parasitos *adback* consistiu na transfecção do clone 3 nocaute para as TS com uma construção contendo o gene de uma TS ativa com 19 repetições SAPA (veja anexo 1). O mesmo anticorpo, gerado contra a TS completa recombinante, foi utilizado para avaliar a presença da TS ativa na superfície dos parasitos, por meio de imunofluorescência. Corroborando os dados da literatura

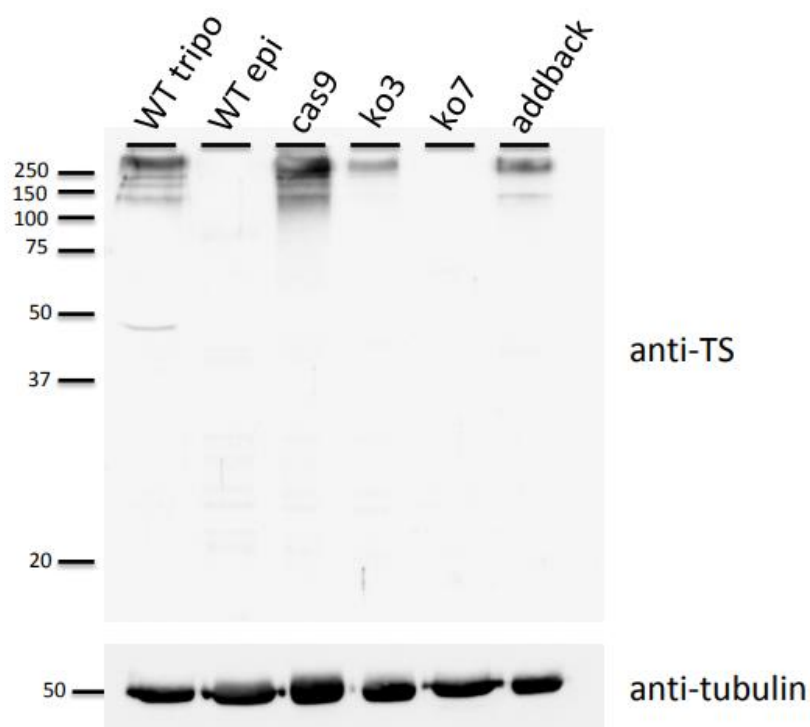


Figura 21: **Western blot** utilizando anticorpo anti-TS completa contra extrato proteico de parasitos CL Brener na forma tripomastigota e epimastigota, e formas tripomastigotas de parasitos expressando apenas a proteína cas9, dos nocautes para TS (clones 3 e clone 7), e dos parasitos *addback*. Extrato proteico de formas tripomastigotas e epimastigotas da cepa CL Brener do *T. cruzi* e de formas tripomastigotas dos parasitos *cas::GFP*, Clones 3 e 7 nocautes para as TS e parasitos *addback*, foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 7,5% e depois transferidos para membranas de nitrocelulose. Posteriormente foram incubados com soro policlonal anti TS completa na diluição de 1:500 overnight e secundário anti-IgG mouse na diluição de 1:1000 por 1h. A membrana foi revelada com reagente ECL.

e estando de acordo com os dados de *western blot* aqui apresentados, as formas tripomastigotas da cepa CL Brener do *T. cruzi* apresentam TS contendo repetições SAPA na sua superfície, não sendo observado o mesmo nas formas epimastigotas. Com relação aos parasitos nocautes para a TS (clone 7), não foi observada a presença da TS na superfície desses parasitos, o que está de acordo com dado de *western blot*. Por outro lado, os parasitos *adddback*, apesar de expressarem a TS, como demonstrado pelo *western blot*, não foram capazes de expressá-la em sua superfície, apesar de terem sido transfectados com uma construção contendo as sequências para peptídeo sinal e sinal para âncora de GPI, necessárias para expressão da TS na superfície (figura 22).

Visto que os parasitos nocautes não apresentam TS ativas em sua superfície, espera-se que o processo de transferência de ácido siálico para as mucinas também na superfície de formas tripomastigotas não ocorra, já que essas TS são as responsáveis por esse processo. Ensaios de imunofluorescência utilizando o anticorpo 3C9 que reconhecem mucina sialilada (Franchin *et al.*1997) (gentilmente cedido pelo Prof. Sérgio Schenkman, da UNIFESP) mostraram que as formas tripomastigotas selvagens (wt) e expressando apenas a proteína cas 9, apresentam mucinas sialiladas na sua superfície ao contrário das formas epimastigotas, que não foram marcadas pelo mesmo anticorpo. Assim como o dado da imunofluorescência utilizando os anticorpos anti TS-completa, os parasitos nocautes, os quais não foram reconhecidos pelos anticorpos anti-TS completa, também não foram marcados com os anticorpos contra mucina sialilada. Da mesma forma, os parasitos *adddback*, como já esperado em virtude de não expressam a TS na superfície, também não foram reconhecidos por esse anticorpo (figura 23). Assim, em conjunto, esses dados demonstram a relação direta entre presença de TS ativas na superfície do parasito e a capacidade de exercer função de transferência de ácido siálico para as mucinas.

4.6 Perfil da infecção *in vitro* e *in vivo* de linhagens nocautes de TS ativas

Para avaliar o efeito do nocaute das TS ativas no processo de infecção *in vitro*, formas tripomastigotas metacíclicas (obtidas de culturas de epimastigotas em fase estacionária de crescimento em meio LIT) dos parasitos expressando Cas9 e dois clones TS nocautes foram utilizadas para infectar células LLCMK2. Após a infecção, os números de amastigota/célula e de tripomastigota liberados no sobrenadante foram

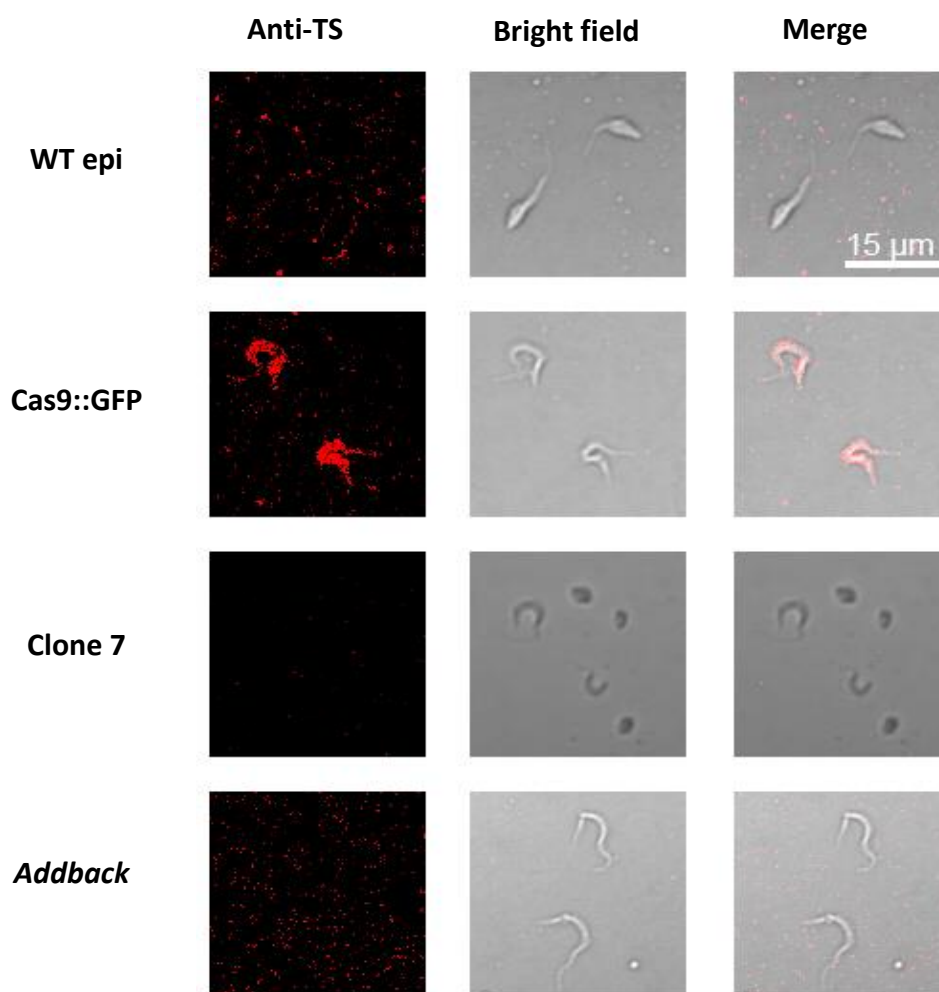


Figura 22: Imunofluorescência utilizando anticorpo anti-TS completa contra parasitos CL Brener na forma epimastigota, e formas tripomastigotas de parasitos expressando apenas a proteína Cas9, nocaute para TS (clone 7), e parasitos *addback*.

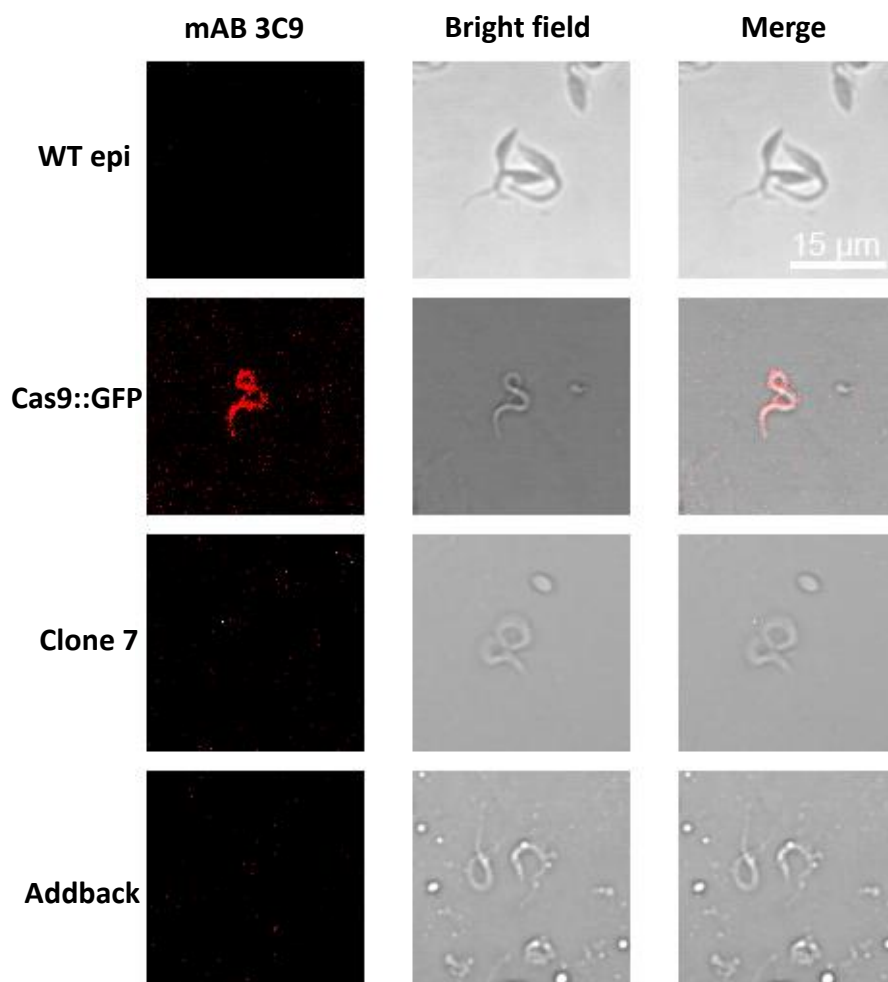


Figura 23: Imunofluorescência utilizando anticorpo anti-mucina sialilada contra parasitos CL Brener na forma epimastigota, e formas tripomastigotas de parasitos expressando apenas a proteína Cas9, dos nocautes para TS (clone 7), e dos parasitos *addback*.

avaliados. Enquanto que não foram observadas diferenças significativas no número de células infectadas 1 ou 2 horas após a infecção e somente uma pequena redução no número de amastigota/célula foi observada com 9 dias de infecção (Burle-Caldas, Aprigio-Santos *et al.* anexo I), diferenças significativas foram observadas no número de tripomastigotas liberadas no sobrenadante (figura 24). Uma diminuição significativa no número de tripomastigotas liberadas no sobrenadante das células infectadas com os dois clones TS nocautes, em comparação com os parasitos utilizados como controle, expressando apenas Cas9 foi observada (figura 24). Esses dados sugerem que o nocaute de genes das TS ativas não afeta a invasão das células mas reduz a capacidade de propagação da infecção por reduzir o número de tripomastigotas liberados por célula infectada.

De forma a avaliar se *in vivo* o mesmo fenótipo de atenuação pelos parasitos nocautes também seria observado, formas tripomastigotas dos clones 3 e 7 dos parasitos nocautes foram inoculadas em camundongos da linhagem BALB/c para avaliação da parasitemia. Como não foi observada parasitemia em nenhum momento após a infecção, decidimos inocular os mesmos grupos de parasitos em animais nocautes para IFN- γ . Como mostrado no gráfico de parasitemia (figura 25), diminuição e ausência de parasitemia foi observada quando os animais nocautes para IFN- γ foram injetados com os clones 3 e 7 dos parasitos nocautes para TS, respectivamente, em comparação com os animais injetados com os parasitos expressando apenas a proteína Cas 9. Assim, com esse experimento foi possível demonstrar o efeito do nocaute das TS ativas sobre a capacidade de infecção *in vitro* e *in vivo* do parasito e a importância desse grupo de proteínas para a virulência do *T. cruzi*.

4.7 Imunização com linhagens nocautes de TS e desafio com cepa virulenta

Uma vez demonstrado o fenótipo atenuado *in vitro* e *in vivo* dos parasitos nocautes de TS, decidimos verificar se o clone 7, o qual demonstrou praticamente ausência de parasitemia nos animais IFN- γ nocautes, poderia ser utilizado como uma cepa vacinal. Para isso, uma dose contendo 5000 formas tripomastigotas de cultura do clone 7, nocaute para TS ativa, foi inoculada intraperitonealmente em animais BALB/c. Trinta dias após a imunização foi realizado o desafio com 10000 formas tripomastigotas

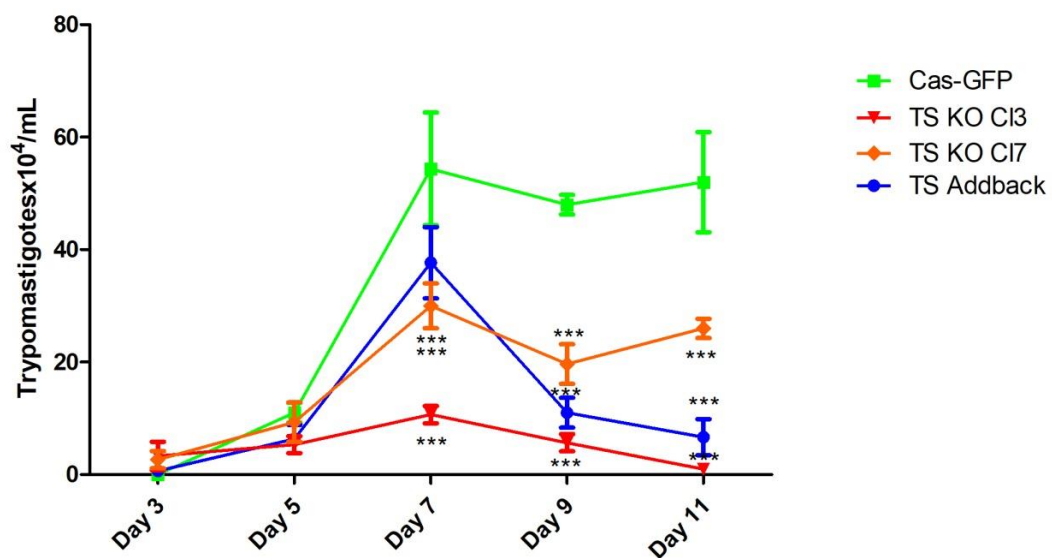


Figura 24: Liberação de tripomastigota no sobrenadante por células LLCMK2 infectadas com formas tripomastigotas metacíclicas dos parasitos nocautes (** $p < 0,001$).

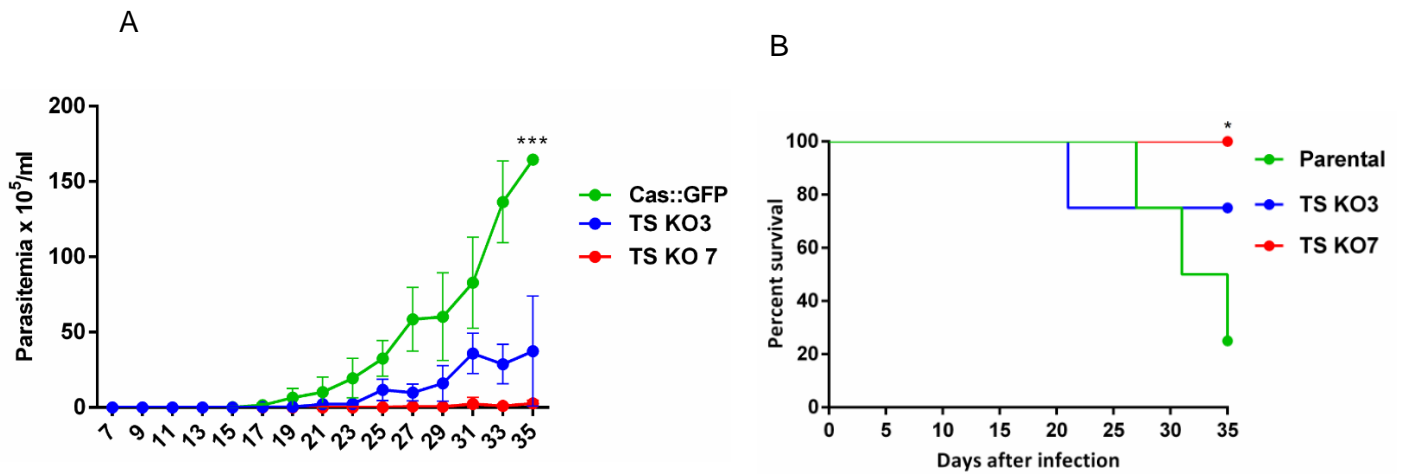


Figura 25: Parasitemia e sobrevivência dos animais C57/BL6 IFN- γ nocaute infectados com formas tripomastigotas obtidas de cultura dos parasitos expressando apenas cas9, e dos clones 3 e 7 nocautes para TS ativas. (** $p < 0,001$; * $p < 0,05$). Parasitemia (A) e sobrevivência (B) dos animais C57/BL6 IFN- γ nocaute.

sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi* e a parasitemia foi avaliada (figura 26). Como observado na figura 26B, não foi detectada de parasitemia quando os animais foram imunizados com o clone nocaute para TS ativa, em comparação aos animais controle inoculados apenas com PBS previamente ao desafio. Sobrevivência de 100% dos animais imunizados com os parasitos nocautes também foi observada, demonstrando a capacidade protetora da imunização com os parasitos atenuados (figura 26E).

De forma a avaliar o parasitismo tecidual nos animais que sobreviveram ao desafio pela cepa Y, músculo esquelético, coração e baço desses animais foram coletados. Como podemos observar na figura 26D, a imunização dos animais com o clone TS-KO7 reduziu a carga parasitária no coração, baço e no músculo a níveis não detectáveis, em comparação com os animais não imunizados. Com base nos resultados mostrando uma alta capacidade de proteção, os parasitos atenuados pelo nocaute dos genes das TS ativas estão sendo avaliados como uma possível estratégia para o desenvolvimento de vacinas contra a doença de Chagas.

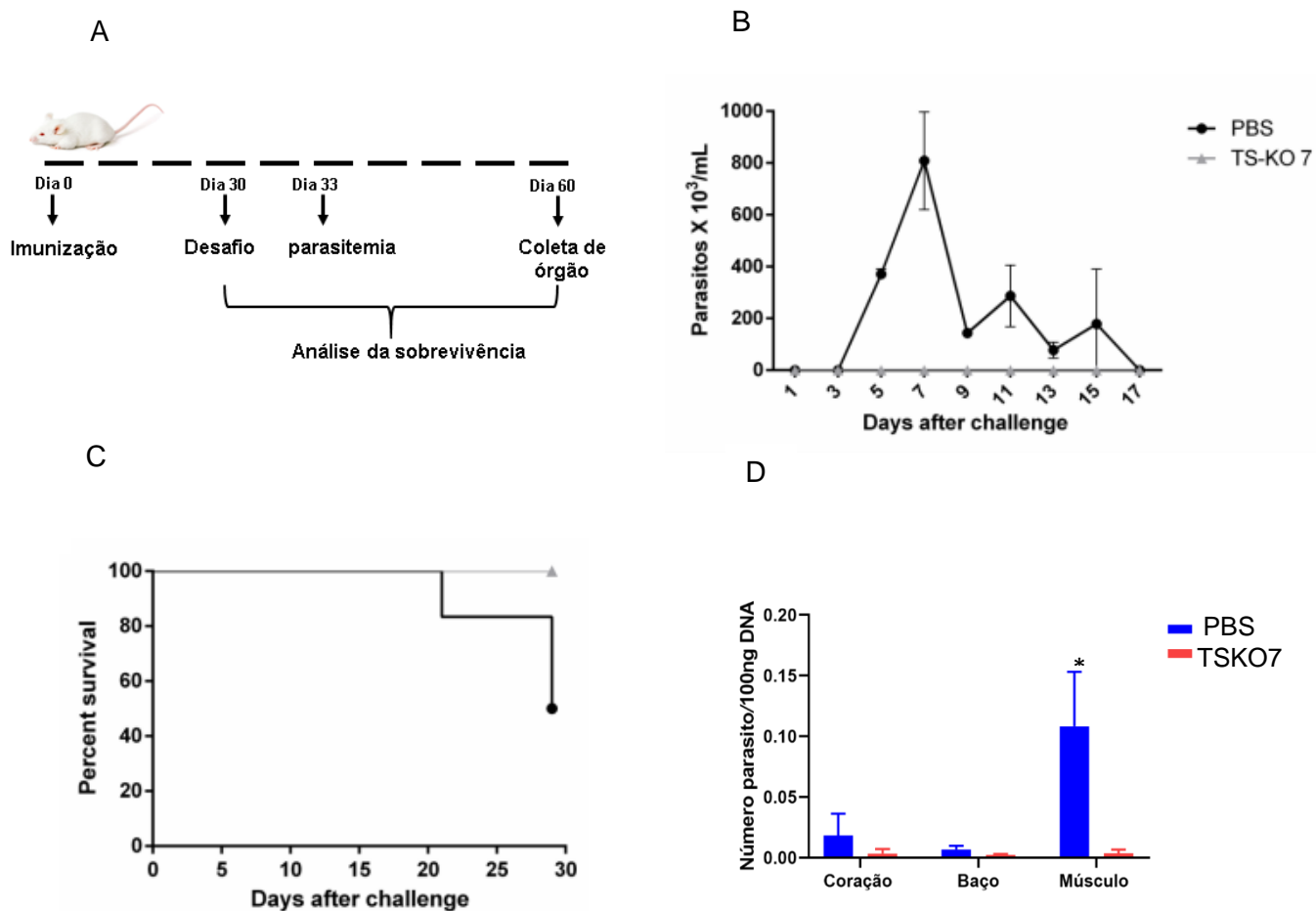


Figura 26: **Proteção de animais BALB/c imunizados com os parasitos TSK07.** Esquema de imunização(A), Parasitemia (B), sobrevivência (C) e parasitismo tecidual (D) dos animais BALB/c imunizados com 5000 formas tripomastigotas do clone 7 nocaute para TS ativa e o grupo controle (injetado apenas com PBS) e desafiados com 10000 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*. O parasitismo tecidual foi realizado do coração, baço e músculo esquelético de animais BALB/c imunizados; qPCR foi realizada com 100ng total de DNA e o kit *Power SYBR green PCR Master Mix*. Primers (Life Technologies) e primers TCZ 1 (CGAGCTCTTGCCACACGGGTGCT) e TCZ 2 (CCTCCAAGCAGCGGATAGTTC AGG). Como controle interno as amostras também foram amplificadas com os primers do gene de camundongo que codifica TNF (** $p > 0,01$).

5 Discussão

A trans-sialidases (TS) representam uma das mais importantes famílias de proteínas de superfície presentes no *T. cruzi*. Apesar de ter sido intensamente estudada, muito ainda é preciso descobrir acerca dos membros dessa família e sua importância para a infecção pelo *T. cruzi* e sua virulência. Um grande volume de dados existentes na literatura apontam para seu papel como fatores de virulência e como antígenos alvos do sistema imune. Análises de transcriptoma da família das TS, que apresenta mais de 1400 genes, avaliando a sua expressão em diferentes estágios do ciclo de vida de várias cepas do parasito demonstraram que a maioria dos transcritos de TS tem expressão elevada em tripomastigotas. Entretanto, uma análise mais detalhada realizada por nós a partir de dados de RNA-seq do clone CL Brener mostraram o aumento dos transcritos das TS do grupo I, que inclui aquelas com atividade enzimática, ainda no estágio amastigota com 96 horas pós infecção, quando estão próximos a diferenciação em tripomastigota (Burle-caldas e Aprigio-Santos, veja manuscrito em preparação no anexo 1). Esses dados sugerem portanto que o sub-grupo das TS que apresentam atividade enzimática possui um papel relacionado ao processo de diferenciação de amastigotas para formas tripomastigotas e na evasão da célula infectada (Burle-caldas e Aprigio-Santos, em preparação). Interessante observar a existência de diferenças na expressão, no estágio amastigotas com 96 hpi, das TS, assim como de outras famílias multigênicas codificadoras de proteínas de superfície como mucinas e MASPs quando avaliada através de análises comparativas do transcriptoma de dois clones diferentes do *T. cruzi* que apresentam importantes diferenças de infectividade, o clone CL Brener, com alta virulência e o clone CL-14, avirulento em modelos de infecção animal. No clone CL-14 observou-se um atraso na expressão desses genes comparação ao clone CL Brener, o que foi correlacionado com a menor capacidade de diferenciação amastigota para tripomastigotas do clone CL-14 e liberação reduzida de tripomastigotas no sobenadante da cultura (Belew *et al.*, 2017). Esses dados sugerem portanto que as TS assim como outras famílias de proteínas de superfície como as MASP e mucinas, são necessárias para a diferenciação entre o estágio replicativo intracelular e a forma infectiva relacionando-as portanto diretamente à virulência e à capacidade do parasito de disseminar a infecção.

Como descrito por Freitas *et al.* (2011), e confirmado pelas nossas análises utilizando dados de sequência do clone CL Brener gerados na plataforma PacBio, somente uma fração muito pequena da família das trans-sialidases possui atividade enzimática sendo a grande maioria das TS incapaz de exercer essa função. As trans-sialidases que possuem atividade catalítica tem o papel não apenas de remover ácido siálico da superfície da célula hospedeira, mas também transferem essas moléculas para a sua própria superfície. Cabe perguntar portanto qual o papel das TS inativas, as quais não exercem essa atividade, mas mantêm a capacidade de ligar à substratos, influenciando o processo de invasão, como revisado por DC- Rubin *et al.* (2012). Por serem uma família que apresenta sequências de aminoácidos altamente variáveis, especula-se também que as TS inativas possam ter um papel ligado à evasão do sistema imune, semelhante à proteínas variantes de superfície do *Trypanosoma brucei* (ou VSG) (Moreno *et al.* 2019). Apesar de não possuir um mecanismo de variação antígenica similar ao do *T. brucei*, a expressão simultânea de um grande número de proteínas com sequências variadas na superfície do tripomastigota é considerada também um mecanismo eficiente de evasão da resposta imune do hospedeiro.

A atividade de trans-sialidase do *T. cruzi*, assim como das neuraminidases de outros patógenos, representa um fator de virulência que foi associado à invasão da célula hospedeira e evasão do sistema imune. Schenckman *et al.* (1993) demonstram uma redução da invasão *in vitro* de células deficientes em ácido siálico em comparação as células parentais. Franchin e cols. (1997), observou que a administração de anticorpos monoclonais contra mucinas sialiladas (incapazes de lisar os parasitos) 1 a 2h antes de realizar o desafio de animais com formas tripomastigotas da cepa Y foi capaz de gerar uma diminuição no pico de parasitemia no parasitismo, em relação aos animais que do grupo controle, que não receberam previamente esses anticorpos. A influência da atividade das trans-sialidase sobre o sistema imune foi proposta também por Tomlinson *et al.* (1994) que observaram que o processo de sialilação da superfície do *T. cruzi* é capaz de conferir resistência ao sistema complemento. A aquisição do ácido siálico na superfície do *T. cruzi* também é capaz de camuflar antígenos importantes do parasito. As mucinas, que são as moléculas aceptoras do ácido siálico no *T. cruzi* possuem terminais de alfa galactosil na sua superfície, moléculas muito imunogênicas e capaz de induzir altos níveis de anticorpos lítico e protetores contra o *T. cruzi*. A ação das trans-sialidases recobre

essa importante molécula e seus terminais imunogênicos, diminuindo sua exposição ao sistema imune do hospedeiro, impedindo assim que uma resposta imune seja gerada e que ocorra a lise das formas extracelulares do parasito. De fato, Pereira-Chiocola *et al.* (2000) observou uma relação entre aumento da sialilação da superfície do parasito e redução da lise de parasitos com anticorpos anti alfa-gal. Portillo *et al.* (2019) também demonstrou ser possível obter proteção contra a infecção ao utilizar o epítopo contendo terminal alfa gal como vacina: a imunização com essa molécula foi capaz de gerar redução da parasitemia e inflamação de animais posteriormente desafiados com o *T. cruzi*. Os nossos dados com parasitos atenuados que mostram um fenótipo atenuado *in vitro* e *in vivo*, corroboram o papel das TS ativas como um fator de virulência e também os dados da literatura que demonstram a importância do ácido siálico no processo de invasão e evasão do sistema imune.

Contudo, os dados de infecção *in vitro* com os parasitos nocautes não mostram diferenças na invasão em relação aos parasitos WT, apesar dos parasitos nocautes não conseguirem transferir ácido siálico para sua superfície, como demonstrado pela imunofluorescência usando anticorpo anti-3C9, contra mucina sialilada. Ou seja, nossos dados indicam que as TS ativas não estão envolvidas na etapa de invasão da célula hospedeira, mas sim, na etapa de egresso da célula e liberação de tripomastigotas. Além disso, em ensaios de lise pelo sistema complemento realizados com tripomastigotas wt e KO7 (dados não mostrados) não observamos lise das formas tripomastigotas dos parasitos nocautes mas somente de epimastigotas. Esses dados contrastam mais uma vez com os dados existentes na literatura que apontam que a presença de ácido siálico na superfície de formas tripomastigotas do parasito confere resistência a lise pelo sistema complemento (Tomlinson *et al.* 1994).

Posto o papel das TS ativas como fatores de virulência, é possível supor que a ausência dessas proteínas ou a produção de anticorpos neutralizantes contra a porção catalítica dessa enzima seja importante no controle da infecção pelo parasito. Por outro lado, as repetições SAPA, presentes na porção C-terminal de algumas TS ativas, apesar de não serem essenciais para a atividade enzimática, devem ter também um papel relevante e que ainda não está esclarecido. Uma hipótese muito difundida na literatura acerca do papel dessas e de outras sequências repetitivas de aminoácidos em proteínas de parasitos é que elas atuem como uma “cortina de fumaça”. De acordo com essa hipótese a resposta imunológica contra antígenos contendo repetições, presentes em diferentes proteínas, desvia a resposta imune

contra alvos mais importantes de um determinado antígeno, impedindo assim uma resposta imune eficiente e permitindo a persistência do parasito no hospedeiro (Soto *et al.* 1995; Kemp *et al.* 1987). Assim, as repetições SAPA induziriam altos níveis de anticorpos contra elas direcionando grande número de células do sistema imune para esse alvo e atrasando a produção de anticorpos contra a porção catalítica da enzima. Esse seria um possível mecanismo de escape imunológico induzido pelas repetições SAPA. Um outro papel, proposto por Buscaglia e cols. (1999) seria o de aumentar a meia vida das proteínas que são liberadas na corrente sanguínea pelos tripomastigotas, o que favorecia não somente a sua exposição ao sistema imune mas também a capacidade de atuar sobre células do hospedeiro por um período maior.

No presente trabalho, buscamos estudar o papel das repetições SAPA sobre o sistema imune, utilizando proteínas recombinantes correspondentes a diferentes partes de uma mesma TS. Assim, foram expressas em bactéria e purificadas através de coluna de níquel a TS completa, ou seja, contendo a região catalítica e as repetições SAPA; a TS sem SAPA, correspondente a porção catalítica, sem as repetições SAPA; e a TS-SAPA correspondente apenas ao motivo repetitivo SAPA. Essas foram então utilizadas para imunizar camundongos BALB/c juntamente com os adjuvantes alúmen e CpG, num protocolo de imunização de 3 doses com intervalo de 21 dias entre cada dose. De forma a avaliar a resposta humoral induzida por cada porção da TS, o sangue dos animais imunizados com as diferentes proteínas foi coletado 21 dias após a última imunização para dosagem de anticorpos por ELISA. Os dados da análise da resposta humoral mostram que anticorpos IgG total e IgG1 foram induzidos por todas as proteínas recombinantes, sendo importante ressaltar os altos níveis de IgG1 induzidos pela TS completa e TS-SAPA. Por outro lado, ausência de anticorpos da subclasse IgG2a foi observada em resposta à imunização com todas as proteínas, sendo esse um tipo de imunoglobulina importante para a resposta imune protetora contra o *T. cruzi*. É interessante observar que ao analisarmos a resposta imune com os soros de animais imunizados com a TS completa contra as duas partes da TS separadamente, observamos uma imunodominância das repetições SAPA em relação a porção catalítica da proteína, visto que o soro dos animais imunizados com a TS completa reconheceu exclusivamente a proteína TS-SAPA no ELISA e no *western blot*. Os nossos dados utilizando a TS-SAPA são bastante distintos dos resultados obtidos por Toro *et al.* (2017) que também avaliou a imunização com uma proteína do *T. cruzi* contendo repetições de aminoácidos denominada TcL7a. Toro *et*

al. observaram que a imunização com a proteína recombinante contendo apenas o motivo repetitivo da TcL7a foi incapaz de gerar anticorpos mas foi responsável pela exacerbação da parasitemia após os animais imunizados terem sido desafiados com uma cepa virulenta. Esses resultados sugerem que as diferentes repetições presentes em diferentes proteínas do parasito podem ter papéis variáveis na infecção.

Quando desafiemos os animais imunizados e avaliamos a parasitemia, observamos que a imunização com todas as porções da proteína foi capaz de gerar redução no pico de parasitemia em relação ao grupo controle mas entre todas as proteínas, a TS sem SAPA foi a que causou uma maior redução no pico. Isso pode ser explicado pela indução de uma resposta humoral específica contra a porção catalítica, na ausência da repetição SAPA na proteína e essa resposta possibilitou o controle das formas extracelulares do parasito. Os altos níveis de IgG1, associado ao perfil de resposta Th2, induzidos pela proteína TS completa podem explicar por que a imunização com essa proteína não causou uma redução significativa da parasitemia. A presença das repetições SAPA nessa proteína e alta indução de anticorpos anti-SAPA podem ter contribuído para gerar uma resposta protetora menos eficiente, visto que a presença de anticorpos anti-SAPA estão associados com um pior prognóstico da infecção (Fontanella *et al.* 2008). Contudo, uma redução importante da parasitemia foi observada quando os animais foram imunizados com TS-SAPA, correspondente apenas aos motivos repetitivos. Porém, mesmo com a redução da parasitemia observada, os dados de sobrevivência, mesmo não sendo estatisticamente diferentes em relação ao grupo que recebeu apenas os adjuvantes, sugerem que uma maior severidade da infecção pode estar acontecendo nos animais imunizados apenas com as repetições SAPA. Esses dados sugerem que esses motivos, além de serem importantes em desviar a resposta imune de epítomos importantes para a proteção na TS, exerceriam um papel modulatório importante, que leva ao agravamento da infecção. Experimentos de sobrevivência com uma dose letal de parasitos deve ser realizado para melhor avaliar esse dado e ainda seria necessário avaliar a resposta imune celular nos animais imunizados. Além disso, análises do parasitismo tecidual também precisam ser realizados para avaliar o comprometimento dos órgãos dos animais imunizados com as repetições SAPA e posteriormente desafiados.

Evidências de modulação do sistema imune por motivos contendo sequências repetitivas de aminoácidos foram obtidas por Toro e col. (2017), após a imunização de animais somente com a porção repetitiva da proteína TcL7a que provocou uma

exacerbação da parasitemia após desafio dos animais com uma cepa virulenta do *T. cruzi*. Nesse trabalho foi mostrado que motivo repetitivo da proteína TcL7a gerou uma modulação negativa da resposta imune ao causar uma redução nos níveis de anticorpos contra antígenos do *T. cruzi* e inibir a proliferação de células B estimuladas por ativadores policlonais. Além dos dados de sobrevivência dos animais imunizados com as repetições SAPA, resultado sugestivos de uma modulação negativa também foram observados em ELISA com os soros dos animais imunizados e desafiados, visto que houve uma redução na produção de IgG2a contra o extrato proteico de formas tripomastigotas do *T. cruzi* no soro de animais imunizados com a proteína SAPA e posteriormente desafiados (figura 19).

Assim como observado neste trabalho, outros estudos com as TS demonstraram o potencial da TS como antígeno para vacina. Giddings *et al.* (2010) demonstrou que a vacinação intranasal com o domínio catalítico de TS combinado com CpG induz forte resposta Th1 e proteção contra o desafio sistêmico e conjuntival com *T. cruzi*. Hoft *et al.* (2007) também observaram indução de resposta Th1 e proteção sistêmica e da mucosa de animais imunizados com TS ativas. Além das TS ativas, estudo com outros membros também demonstram importância dessa família de proteínas para a proteção. A proteína ASP-2 por exemplo é um tipo de trans-sialidase que já foi testada em vários trabalhos de imunização e induz resposta Th1 e confere proteção contra o *T. cruzi*, Araújo *et al.* (2005). Porém, em nenhum desses trabalhos utilizou-se antígenos contendo as repetições SAPA e nem foi avaliada a influência desses motivos na resposta imune.

Como já mencionado anteriormente, diferentes formulações já foram testadas como vacina para a doença de Chagas. Aqui também testamos, além da imunização com proteína recombinante, imunização com os parasitos vivos, nocautes para os genes das TS, gerados por meio da técnica de CRISPR-Cas9. Resumidamente, o nocaute gênico por meio do sistema de CRISPR-Cas9 ocorre da seguinte maneira: um pequeno RNA (*single guide* RNA, sgRNA) complementar a sequência alvo, que se deseja nocautear, direciona a nuclease Cas9 para promover uma quebra na dupla fita do DNA alvo. No *T. cruzi*, a quebra no DNA induzida pela Cas9 nuclease pode ser reparada pelo mecanismo de *microhomology-mediated end joining* (MMEJ), processo mutagênico que adiciona deleções no sítio do DNA onde correu a quebra ou por processo de recombinação homóloga (HR). A padronização dessa técnica para edição de genes do *T. cruzi* tornou possível não somente o estudo com muito mais rapidez

e eficiência de genes de cópia única no genoma mas principalmente o estudo por genética reversa de famílias multigênicas, como das trans-sialidases, os quais eram até então impossíveis de serem realizados no *T. cruzi* (Burle-Caldas *et al.* 2018).

Como já descrito, a atividade das trans-sialidases exerce importantes efeitos associados a virulência do parasito. Assim, é possível supor que a ausência dessas proteínas esteja relacionada a um fenótipo menos virulento. Como mostrados nos resultados, essas suposições foram confirmadas tanto *in vitro* quanto *in vivo* quando foram avaliados os parasitos nocautes para TS. Nos ensaios *in vitro* foi observada diminuição da quantidade de tripomastigota liberada pela célula. Porém essa diminuição na liberação de tripomastigotas no sobredante não foi associada com redução da invasão ou do número de amastigotas pelos parasitos nocautes, o que indica que a TS ativas não possuem um papel na etapa de invasão mas sim na etapa de liberação das formas tripomastigotas da célula hospedeira. Nas infecções *In vivo*, foi observada a ausência de parasitos no sangue de camundongos BALB/c e mesmo em animais IFN- γ nocaute o clone KO7 mostrou uma parasitemia muito reduzida somente nos estágios finais da infecção, i.e., com mais de 30 dias de infecção. É importante notar que os dois clones nocautes, TSKO3 e TSKO7 apresentaram diferenças na eficiência de nocaute, como mostrado nos ensaios de *western blot*, que correlacionam com a capacidade de estabelecer a infecção. O clone KO7 que possui níveis indetectáveis de TS e de atividade de TS foram aqueles que não causaram a menor parasitemia e sobrevivência de 100% dos animais infectados.

Experimentos com parasitos *adback* também foram realizados, porém a reversão do fenótipo virulento não foi observado tanto na infecção *in vitro* como *in vivo*, apesar de ter sido detectada novamente a expressão da proteína através de *western blot* nesse parasitos e níveis de atividade de trans-sialidase semelhantes ao parasito selvagem. Esse resultado pode ser explicado pelo fato da proteína gerada a partir do gene transfectado não estar presente na superfície, como demonstrado pelo ensaio de imunofluorescência utilizando anticorpos anti-TS. Novas construções onde procuraremos adicionar os sinais de endereçamento para a superfície (peptídeo sinal) estão sendo preparadas para obter novas linhagens *adback*.

Visto que os parasitos nocautes mostraram-se incapazes de estabelecer a infecção em animais, foi testado um protocolo de imunização onde foi administrada uma dose contendo 5000 formas tripomastigotas obtidas de cultura da linhagem nocautes TSKO7. Outros estudos utilizando parasitos vivos atenuados em teste de

imunização para a doença de Chagas como o descrito por Basombrío (1982) mostraram que a inoculação com a cepa atenuada TCC do *T. cruzi*, além de não induzir morte ou lesões significativas em camundongos, reduzem significativamente o pico de parasitemia e previne lesão no músculo esquelético dos animais posteriormente desafiados com uma cepa virulenta do *T. cruzi*. Resultados semelhantes foram observados com o clone CL-14 do *T. cruzi*, que não é capaz de gerar parasitemia nem mortalidade nos animais infectados. A infecção com CL-14 também não provoca parasitismo tecidual ou mudanças inflamatórias importantes em animais imunocompetentes (Lima *et al.* 1991) como também em não gera parasitemia em animais neonatos ou imunodeficientes como nocautes para MyD88, IL-12 (Junqueira *et al.* 2011). Como demonstrado após a administração de 2×10^6 tripomastigotas derivadas de cultura do clone CL-14, esse clone possui alta capacidade protetora contra a cepa virulenta Y do *T. cruzi* (Lima *et al.* 1995). Devido a seu caráter avirulento e imunogênico esse mesmo clone também foi testado como vetor vacinal para o tratamento do câncer, por meio da geração de parasitos transgênicos expressando um antígeno exógeno. O resultado desse teste demonstrou capacidade dos parasitos transgênicos de gerar resposta imune humoral e celular específica e proteger contra o desafio por células de melanoma expressando o antígeno NY-ISO, sendo capaz de levar a diminuição do tamanho do tumor e sobrevivência dos animais imunizados e desafiados (Junqueira *et al.* 2011). Os resultados com parasitos vivos atenuados são diferentes de experimentos utilizando parasitos mortos, os quais não se mostraram tão eficientes como antígenos proteicos (Basombrío 1990). Esses trabalhos, em conjunto com os nossos dados, indicam que parasitos atenuados, nocautes para as TS ativas, representam estratégias vacinais promissoras. O diferencial do nosso trabalho é o fato de que o clone atenuado TSKO7 foi obtido a partir de uma cepa muito bem estudada e a atenuação foi obtida por manipulação genética de regiões específicas do seu genoma. Além de grande redução na infectividade, a inoculação do clone TSKO foi capaz de gerar proteção contra o desafio com 10000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y. Essa proteção foi observada pela ausência de parasitemia nos animais imunizados e pela taxa de sobrevivência, que foi de 100% nesse grupo, em comparação com os animais do grupo controle, que receberam apenas PBS previamente ao desafio. Além disso, análises do parasitismo tecidual também foi realizada através de qPCR e demonstraram ausência de carga parasitária no coração,

baço e músculo esquelético dos animais imunizados. Essa alta proteção observada pode ser explicada pelo fato de parasitos vivos atenuados infectarem as células do hospedeiro, mas terem deficiência na liberação de formas trypomastigotas infectivas, levando à uma infecção subclínica que assegura múltiplos estímulos antigênicos. Isso torna possível a geração de uma resposta imune forte e duradoura capaz de controlar a forma extracelular presente no sangue e o parasitismo nos tecidos. Estudos mais detalhados capazes de mostrar como esses parasitos se disseminam pelo hospedeiro e por quanto tempo eles são viáveis nos tecidos infectados em modelos *in vivo* são importantes no momento para que possamos avaliar a segurança desse tipo de vacina. Ainda, é preciso que sejam feitas análises detalhadas da resposta imune celular por meio de cultura de esplenócito obtidas a partir dos animais vacinados com os parasitos nocautes. Esses ensaios estão sendo planejados utilizando protocolos de vacinação em diferentes linhagens nocautes de camundongos para que possamos avaliar com profundidade os componentes dessa resposta. Múltiplas passagens desses clones de parasitos TS nocautes estão também sendo realizadas para que possamos avaliar a estabilidade do processo de deleção gênica. Cabe ressaltar que ensaios de PCR com DNA extraído dos poucos tripomastigotas sanguíneos recuperados de animais IFN- γ nocaute após o dia 30 de infecção mostraram que esses parasitos presentes no sangue dos animais mantiveram o genótipo TS nocaute (dados não mostrados). Uma série de novos experimentos precisam ser realizados para que possamos entender com profundidade o processo de proteção observada com os clones TS nocautes. Entre eles, não podemos deixar de citar os estudos envolvendo o sequenciamento do genoma do clone TSKO7 e do seu transcriptoma nas vários estágios do ciclo de vida. Os dados descritos até aqui mostram contudo, o papel promissor dos parasitos nocautes para as TS ativas em formulações vacinais para a doença de Chagas.

6 Conclusões

As trans-sialidases são importantes fatores de virulência do *T. cruzi*, além de constituir um importante imunógeno, capaz de induzir respostas protetoras contra a infecção por este parasito. A imunização com a proteína com a ausência do motivo repetitivo SAPA deve ser explorada, visto que demonstrou uma quase que total

redução do pico de parasitemia. Além disso, a presença das repetições SAPA mostrou-se imunodominante e essa característica pode representar um mecanismo de evasão da resposta imune contra uma resposta protetora. Paralelamente, esse trabalho mostrou a viabilidade de utilização dos parasitos nocautes para as TS ativas tanto como uma ferramenta poderosa para estudos sobre o papel dessas proteínas como fatores de virulência do *T. cruzi* como também para estudos voltados para o desenvolvimento de uma vacina para a doença de Chagas baseada em cepas atenuadas, geneticamente modificadas, do parasito.

7 Referências bibliográficas

ARAÚJO, A. F.; DE ALENCAR, B. C.; VASCONCELOS, J. R.; HIYANE, M. I. *et al.* 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, n. 9, p. 6017-6025, Sep 2005.

BASOMBRIO, M. A. *Trypanosoma cruzi*: partial prevention of the natural infection of guinea pigs with a killed parasite vaccine. **Exp Parasitol**, 71, n. 1, p. 1-8, Jul 1990.

BASOMBRÍO, M. A.; BESUSCHIO, S. *Trypanosoma cruzi* culture used as vaccine to prevent chronic Chagas' disease in mice. **Infect Immun**, 36, n. 1, p. 351-356, Apr 1982.

BELEW, A. T.; JUNQUEIRA, C.; RODRIGUES-LUIZ, G. F.; VALENTE, B. M. *et al.* Comparative transcriptome profiling of virulent and non-virulent *Trypanosoma cruzi* underlines the role of surface proteins during infection. **PLoS Pathog**, 13, n. 12, p. e1006767, 12 2017.

BIVONA, A. E.; ALBERTI, A. S.; CERNY, N.; TRINITARIO, S. N. *et al.* Chagas disease vaccine design: the search for an efficient *Trypanosoma cruzi* immune-mediated control. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis**, 1866, n. 5, p. 165658, May 2020.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 4, p. 389-396, 1962 Nov-Dec 1962.

BURLE-CALDAS, G. A.; SOARES-SIMÕES, M.; LEMOS-PECHNICKI, L.; DAROCHA, W. D. *et al.* Assessment of two CRISPR-Cas9 genome editing protocols for rapid generation of *Trypanosoma cruzi* gene knockout mutants. **Int J Parasitol**, 48, n. 8, p. 591-596, 07 2018.

BURLE-CALDAS, G. E. A.; GRAZIELLE-SILVA, V.; LAIBIDA, L. A.; DAROCHA, W. D. *et al.* Expanding the tool box for genetic manipulation of *Trypanosoma cruzi*. **Mol**

Biochem Parasitol, 203, n. 1-2, p. 25-33, 2015 Sep-Oct 2015.

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

BUSCAGLIA, C. A.; CAMPO, V. A.; FRASCH, A. C.; DI NOIA, J. M. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. **Nat Rev Microbiol**, 4, n. 3, p. 229-236, Mar 2006.

CAMARGO, E. P. GROWTH AND DIFFERENTIATION IN *TRYPANOSOMA CRUZI*. I. ORIGIN OF METACYCLIC *TRYPANOSOMES* IN LIQUID MEDIA. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 6, p. 93-100, 1964 May-Jun 1964.

CANÇADO, J. R. Criteria of Chagas disease cure. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 94 Suppl 1, p. 331-335, 1999.

CASTRO, J. A.; DE MECCA, M. M.; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat

CHAGAS C 1909. Nova tripanozomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.gen. n.sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1: 159-218.

DAROCHA, W. D.; BARTHOLOMEU, D. C.; MACÊDO, C. D.; HORTA, M. F. *et al.* Characterization of cDNA clones encoding ribonucleoprotein antigens expressed in *Trypanosoma cruzi* amastigotes. **Parasitol Res**, 88, n. 4, p. 292-300, Apr 2002.

DC-RUBIN, S. S.; SCHENKMAN, S. T *rypanosoma cruzi* trans-sialidase as a multifunctional enzyme in Chagas' disease. **Cell Microbiol**, 14, n. 10, p. 1522-1530, Oct 2012.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. **Int J Cell Biol**, 2010, 2010.

EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BARTHOLOMEU, D. C.; NILSSON, D. *et al.* The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, 309, n. 5733, p. 409-415, Jul 2005.

FATIMA, Ângelo de; BAPTISTELLA, Lúcia Helena Brito; PILLI, Ronaldo Aloise; MODOLO, Luzia Valentina. Ácidos siálicos: da compreensão do seu envolvimento em processos biológicos ao desenvolvimento de fármacos contra o agente etiológico da gripe. *Quím. Nova* [online]. 2005, vol.28, n.2, pp.306-316. ISSN 0100-4042.

FERNANDES, M. C.; ANDREWS, N. W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. **FEMS Microbiol Rev**, 36, n. 3, p. 734-747, May 2012.

FONTANELLA, G. H.; DE VUSSER, K.; LAROY, W.; DAURELIO, L. *et al.* Immunization with an engineered mutant trans-sialidase highly protects mice from experimental *Trypanosoma cruzi* infection: a vaccine candidate. **Vaccine**, 26, n. 19, p. 2322-2334, May 2008.

FRANCHIN, G.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; SCHENKMAN, S.; RODRIGUES, M. M. Passive transfer of a monoclonal antibody specific for a sialic acid-dependent epitope on the surface of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes reduces infection in mice. **Infect Immun**, 65, n. 7, p. 2548-2554, Jul 1997.

FRASCH, A. C.; CAZZULO, J. J.; ASLUND, L.; PETTERSSON, U. Comparison of genes encoding *Trypanosoma cruzi* antigens. **Parasitol Today**, 7, n. 6, p. 148-151, Jun 1991.

FREIRE-DE-LIMA, L.; FONSECA, L. M.; OELTMANN, T.; MENDONÇA-PREVIATO, L. *et al.* The trans-sialidase, the major *Trypanosoma cruzi* virulence factor: Three decades of studies. **Glycobiology**, 25, n. 11, p. 1142-1149, Nov 2015.

FREITAS, L. M.; DOS SANTOS, S. L.; RODRIGUES-LUIZ, G. F.; MENDES, T. A. *et al.* Genomic analyses, gene expression and antigenic profile of the trans-sialidase superfamily of *Trypanosoma cruzi* reveal an undetected level of complexity. **PLoS One**, 6, n. 10, p. e25914, 2011.

GAO, W.; WORTIS, H. H.; PEREIRA, M. A. The *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase is a T cell-independent B cell mitogen and an inducer of non-specific Ig secretion. **Int Immunol**, 14, n. 3, p. 299-308, Mar 2002.

GIDDINGS, O. K.; EICKHOFF, C. S.; SULLIVAN, N. L.; HOFT, D. F. Intranasal vaccinations with the trans-sialidase antigen plus CpG Adjuvant induce mucosal immunity protective against conjunctival *Trypanosoma cruzi* challenges. **Infect Immun**, 78, n. 3, p. 1333-1338, Mar 2010.

HOFT, D. F.; EICKHOFF, C. S.; GIDDINGS, O. K.; VASCONCELOS, J. R. *et al.* 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, n. 10, p. 6889-6900, Nov 2007.

JUNQUEIRA, C.; CAETANO, B.; BARTHOLOMEU, D. C.; MELO, M. B. *et al.* The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert Rev Mol Med**, 12, p. e29, 2010.

JUNQUEIRA, C.; GUERRERO, A. T.; GALVÃO-FILHO, B.; ANDRADE, W. A. *et al.* *Trypanosoma cruzi* adjuvants potentiate T cell-mediated immunity induced by a NY-ESO-1 based antitumor vaccine. **PLoS One**, 7, n. 5, p. e36245, 2012.

JUNQUEIRA, C.; SANTOS, L. I.; GALVÃO-FILHO, B.; TEIXEIRA, S. M. *et al.* *Trypanosoma cruzi* as an effective cancer antigen delivery vector. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 108, n. 49, p. 19695-19700, Dec 2011.

KEMP, D. J.; COPPEL, R. L.; ANDERS, R. F. Repetitive proteins and genes of malaria. **Annu Rev Microbiol**, 41, p. 181-208, 1987.

KNOTT, G. J.; DOUDNA, J. A. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering. **Science**, 361, n. 6405, p. 866-869, 08 2018.

KUMAR, S.; TARLETON, R. L. The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunol**, 20, n. 5, p. 207-216, May 1998.

LANDER, N.; LI, Z. H.; NIYOGI, S.; DOCAMPO, R. CRISPR/Cas9-Induced Disruption of Paraflagellar Rod Protein 1 and 2 Genes in *Trypanosoma cruzi* Reveals Their Role in Flagellar Attachment. **mBio**, 6, n. 4, p. e01012, Jul 2015.

LIMA, M. T.; JANSEN, A. M.; RONDINELLI, E.; GATTASS, C. R. *Trypanosoma cruzi*: properties of a clone isolated from CL strain. **Parasitol Res**, 77, n. 1, p. 77-81, 1991.

MALI, S. Delivery systems for gene therapy. **Indian J Hum Genet**, 19, n. 1, p. 3-8, Jan 2013.

MARTIN, D.; TARLETON, R. Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunol Rev**, 201, p. 304-317, Oct 2004.

MORENO, C. J. G.; TEMPORÃO, A.; TORRES, T.; SOUSA SILVA, M. Interaction with Host: Mechanism of VSG Release as Target for Drug Discovery for African Trypanosomiasis. **Int J Mol Sci**, 20, n. 6, Mar 2019.

MOSER, D. R.; KIRCHHOFF, L. V.; DONELSON, J. E. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol**, 27, n. 7, p. 1477-1482, Jul 1989.

NÓBREGA, A. A.; GARCIA, M. H.; TATTO, E.; OBARA, M. T. *et al.* Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. **Emerg Infect Dis**, 15, n. 4, p. 653-655, Apr 2009.

PARODI, A. J.; POLLEVICK, G. D.; MAUTNER, M.; BUSCHIAZZO, A. *et al.* Identification of the gene(s) coding for the trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi*. **EMBO J**, 11, n. 5, p. 1705-1710, May 1992.

PENG, D.; KURUP, S. P.; YAO, P. Y.; MINNING, T. A. *et al.* CRISPR-Cas9-mediated single-gene and gene family disruption in *Trypanosoma cruzi*. **mBio**, 6, n. 1, p. e02097-02014, Dec 2014.

PEREIRA, I. R.; VILAR-PEREIRA, G.; MARQUES, V.; DA SILVA, A. A. *et al.* A human type 5 adenovirus-based *Trypanosoma cruzi* therapeutic vaccine re-programs immune response and reverses chronic cardiomyopathy. **PLoS Pathog**, 11, n. 1, p. e1004594, Jan 2015.

PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; ACOSTA-SERRANO, A.; CORREIA DE ALMEIDA, I.; FERGUSON, M. A. *et al.* 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), p. 1299-1307, Apr 2000.

PORTILLO, S.; ZEPEDA, B. G.; INIGUEZ, E.; OLIVAS, J. J. *et al.* A prophylactic α -Gal-based glycovaccine effectively protects against murine acute Chagas disease. **NPJ Vaccines**, 4, p. 13, 2019.

QUIJANO-HERNANDEZ, I.; DUMONTEIL, E. Advances and challenges towards a vaccine against Chagas disease. **Hum Vaccin**, 7, n. 11, p. 1184-1191, Nov 2011.

RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, 375, n. 9723, p. 1388-1402, Apr 2010.

SCHENKMAN, R. P.; VANDEKERCKHOVE, F.; SCHENKMAN, S. Mammalian cell sialic acid enhances invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Infect Immun**, 61, n. 3, p. 898-902, Mar 1993.

SILVEIRA, E. L.; CLASER, C.; HAOLLA, F. A.; ZANELLA, L. G. *et al.* Novel protective antigens expressed by *Trypanosoma cruzi* amastigotes provide immunity to mice highly susceptible to Chagas' disease. **Clin Vaccine Immunol**, 15, n. 8, p. 1292-1300, Aug 2008.

SOTO, M.; REQUENA, J. M.; QUIJADA, L.; ANGEL, S. O. *et al.* During active viscerocutaneous leishmaniasis the anti-P2 humoral response is specifically triggered by the parasite P proteins. **Clin Exp Immunol**, 100, n. 2, p. 246-252, May 1995.

SÁNCHEZ-VALDÉZ, F. J.; PÉREZ BRANDÁN, C.; FERREIRA, A.; BASOMBRÍO, M. Gene-deleted live-attenuated *Trypanosoma cruzi* parasites as vaccines to protect against Chagas disease. **Expert Rev Vaccines**, 14, n. 5, p. 681-697, May 2015.

TARLETON, R. L.; KOLLER, B. H.; LATOUR, A.; POSTAN, M. Susceptibility of beta 2- μ globulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Nature**, 356, n. 6367, p. 338-340, Mar 1992.

TOMLINSON, S.; PONTES DE CARVALHO, L. C.; VANDEKERCKHOVE, F.; NUSSENZWEIG, V. Role of sialic acid in the resistance of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to complement. **J Immunol**, 153, n. 7, p. 3141-3147, Oct 1994.

TORO ACEVEDO, C. A.; VALENTE, B. M.; BURLE-CALDAS, G. A.; GALVÃO-FILHO, B. *et al.* Down Modulation of Host Immune Response by Amino Acid Repeats Present in a. **Front Microbiol**, 8, p. 2188, 2017.

VASCONCELOS, J. R.; HIYANE, M. I.; MARINHO, C. R.; CLASER, C. *et al.* Protective immunity against *trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible mouse strain after vaccination with genes encoding the amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. **Hum Gene Ther**, 15, n. 9, p. 878-886, Sep 2004.

Anexo I

Manuscrito em preparação: *Disruption of active trans-sialidase genes in Trypanosoma cruzi resulted in attenuated parasites that fully protect mice against challenge with a virulent strain.*

**Disruption of active trans-sialidase genes in *Trypanosoma cruzi* resulted
in attenuated parasites that fully protect mice against challenge
with a virulent strain**

Gabriela de A. Burle-Caldas¹, Nailma S. A. dos Santos¹, Júlia T. de Castro¹, Fernanda L. B. Mugge¹, Viviane Grazielle-Silva¹, Antônio Edson R. Oliveira¹, Milton C. A. Pereira², João Luís R. Cunha³, Daniela C. Bartholomeu³, Nilmar S. Moretti⁴, Sergio Schenkman⁴, Ricardo T. Gazzinelli^{1,2} and Santuza M. R. Teixeira^{1*}

¹Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, ²Centro de Pesquisa Rene Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, ³Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, ⁴Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo

Abstract

Trans-sialidases (TS) are unusual enzymes present on the surface of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. Despite being codified by the largest gene family in the *T. cruzi* genome, only few members of the TS family have catalytic activity. Active trans-sialidases (aTS) are responsible for the transfer of sialic acid from host glycoconjugates to mucins that are also present in the surface of the parasite. Thus, the presence of several copies of aTS genes dispersed in the genome represents a major challenge in the study of these proteins since it impaired until now the use of reverse genetics. Using a recent described CRISPR-Cas9 protocol, we were able to disrupt most aTS genes in the genome of the CL Brener strain, generating TS knockout cell lines displaying very low levels of TS expression as shown by quantitative PCR, western blot and immunofluorescence analyses with anti-TS antibodies. Low TS activity in these mutant cell lines have been shown by sialylation assays and labelling with antibodies that recognize sialic acid-containing epitopes. *In vitro* infection assays showed that the TS mutants do not have impaired capacity of invasion or to escape from the parasitophorous vacuole, but displayed impaired capacity to differentiate from amastigote to extracellular trypomastigotes that are released from the infected cell. When tested *in vivo*, mutant cell lines were unable to establish infection in BALB/c mice and one of them, named TSKO-7, which has undetectable levels of TS activity, was unable to infect the highly susceptible *IFN- γ* knockout mice. Importantly, BALB/c mice immunized with trypomastigotes of the TSKO-7 mutant were fully protected against a challenge infection with trypomastigotes from the virulent *T. cruzi* Y strain. Altogether, our results indicated that aTS play a major role during *T. cruzi* infection, particularly at late time points of the intracellular development and that TS knockout mutants can be used as a live attenuated vaccine to develop immunization protocols against Chagas disease.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, trans-sialidases, CRISPR/Cas9, attenuated parasites, vaccine

Introduction

Trypanosoma cruzi is the protozoan parasite that causes Chagas disease, a debilitating and often life-threatening disease that affects 6 to 7 million people worldwide. Endemic in many Latin America countries, Chagas disease has spread to places in Europe, Australia and south of United States, due to increased international migration ([https://www.who.int/en/news-room/factsheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/en/news-room/factsheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))). Vector-borne exposure occurs through contact of skin or mucous membranes with feces or urine from *T. cruzi* infected bloodsucking insect vectors. Non-vectorial routes of transmission include blood transfusion, congenital transmission, ingestion of contaminated food or even laboratory accident. Although curable if treatment is initiated soon after infection, during the chronic phase, in which about 30% of infected people develop cardiac or digestive alterations, drug treatment appears ineffective in most cases. Therefore, the search for better treatment protocols as well as for a vaccine that can prevent Chagas disease remains a goal that is pursued by a rather limited number of research groups.

T. cruzi has a complex life cycle in which three main forms that alternate between its invertebrate and vertebrate hosts. Epimastigotes multiply in the midgut of the insect vector and migrate to the posterior end of the insect digestive tract, where they differentiate into infective, non-dividing metacyclic trypomastigotes. Expelled together with the insect feces during a blood meal, trypomastigotes can be inoculated through skin cuts, mucosa or conjunctiva of a mammalian host, reached the bloodstream and actively invade a wide variety of non-phagocytic cell types. Inside the mammalian cell, trypomastigotes differentiate into replicative amastigotes, which, after multiplying for 3-5 days in the host cell cytoplasm, differentiate again into motile, infective trypomastigotes. After rupturing the cell membrane, trypomastigotes propagate the infection by invading other cells or by being taken up again by an insect vector (1).

One of the main characteristics of the infective trypomastigotes is the presence of large families of surface proteins, among them, the trans-sialidase (TS) family. Although the parasite is unable to synthesize sialic acid (SA), the surface of trypomastigotes is covered by this molecule thanks to the ability of TS to transfer SA from host glycoconjugates to β -galactopyranosyl residues of the mucin family of surface glycoproteins (2-4). Sialic acid is a class of sugar with nine carbon backbone that is present in the cell surface of vertebrates and higher invertebrates. Due to its ubiquitous distribution in the cells is not surprising that this glycan is involved in different processes, for example it can modulate the half-life of glycoproteins in the blood. In addition, the negative charge of human erythrocytes confer by the presence of SA and other cell types provides charge repulsion, preventing unwanted interactions of cells in the blood circulation. There are evidences that SA are also important in the development of immune response. They are key components of most ligands for the selectin family of cell adhesion molecules which mediate leucocyte rolling along endothelium, as well as other

interactions between immune cells. Furthermore, SA binds to Siglec family of cell adhesion molecules regulating the immune response. Another important role of SA has been described during the development of tumor cells which have increased levels of SA in their surface. The presence of SA lead to accelerate progression of cancer due to enhanced migration, docking to the vascular endothelium and invasion which facilitates the formation of metastases as well as resistance to apoptosis (5, 6). Sialic acid also mediates the binding of several pathogens like human influenza virus, *Helicobacter pylori* and *Plasmodium falciparum* (5). Several studies have provided strong evidence indicating that during *T. cruzi* infection SA not only contributes to trypomastigote invasion of mammalian tissues, but is also involved with mechanisms that allow the parasite to escape from the host immune response. Sialylation of mucins present at the surface of bloodstream trypomastigotes can mask parasite surface epitopes and confers a negative charge that prevents the binding and lysis by lytic antibodies. α -Gal terminals present in mucins are targets for anti α -Gal antibodies abundantly found in both the acute and chronic phases of Chagas disease which cause parasite lysis (7). Sialylation of host cell glycoconjugates by *T. cruzi* TS also modulates host immune responses, including the induction of thymocyte apoptosis and inhibiting CD8(+) T cell responses (7, 8). The activation of T lymphocytes is dependent on loss of SA residues in α -2,3 bonds from O-linked oligosaccharides, exposing free β -1,3 galactose (Gal) residues. Subversion of host cell sialylation is part of a sophisticated mechanism involving *T. cruzi* TS that re-sialylates CD8(+) T cell and attenuates interactions between parasite antigens and class I major histocompatibility molecules (9).

Trans-sialidases are encoded by the largest gene family present in the *T. cruzi* genome (10). With more than 1.400 members, TS sequences were divided into 8 different groups based on the presence of key TS motifs, chromosomal localization, expression profile and antigenic properties (11). Only members from group I have catalytic activity, which can be identified by the presence of a tyrosine on position 342 and conserved sequences at the N-terminal catalytic site (11, 12). Crystallographic analysis of an aTS from *T. rangeli*, which shares 70% amino acid identity with *T. cruzi* aTS, showed that the Tyr342 is positioned in the active site floor in such a way that may stabilizes intermediate reaction species (13). The large majority of TS genes, however, encodes inactive trans-sialidases (iTS) due to a naturally occurring mutation that changes Tyr342 into an histidine (12). Since there are more than 1000 copies encoding iTS, it has been proposed that a crucial function of this highly polymorphic protein family is to create a variable repertoire of surface epitopes. In agreement with this, co-expression of several members of the TS family has been described in the mammalian stages of the parasite. The majority of active trans-sialidases also have a 12 amino acid tandem repeats (DSSAH^S/₆TPSTP^V/_A) at the C- terminal portion, called SAPA repeats, which vary in size between aTS members. All TS that are expressed in trypomastigotes are GPI anchored to the parasite surface and can be shedded into the bloodstream of the mammal host by the action of the parasite

phosphatidylinositol-phospholipase C or by a mechanism involving releasing into microvesicles (4, 14). The presence of SAPA repeats in aTS increases the half-life of the protein in the bloodstream and causes enzyme oligomerization, which may also increase the persistence of aTS in the blood (15). Interestingly, aTS containing SAPA repeats are highly immunogenic but antibodies generated against the repeats, which are elicited early after infection, are not effective in blocking parasite survival. Instead, it has been proposed that anti-SAPA antibodies delay the development of inhibitory antibodies, favoring (16).

With the aim to develop preventive or prophylactic vaccines against Chagas disease, several groups have tried different vaccine formulations, including live attenuated vaccines (17), vaccines using killed parasites (18), recombinant proteins (19), DNA vaccines (20) and modified adenoviruses expressing *T. cruzi* proteins (21, 22). Since it is well known that TCD8+ cells developed during *T. cruzi* infection are mainly focused on epitopes present in trans-sialidases members (23), different groups have tried to produce efficient vaccines using trans-sialidases members in their formulation (24-26). Among the reports using TS as vaccine candidate, a study using engineered enzymatically deficient mutant TS containing the catalytic domain without the immunodominant SAPA repeats showed high protection rates, even though titers of circulating antibody against TS did not correlate with protection. Prominent results were also obtained using adenoviruses expressing the *T. cruzi* members of the TS family including the amastigote surface protein-2 (ASP2) (21), which resulted in reduced heart parasitism and cardiomyocyte damage after challenge with virulent strains. Importantly, it has been also shown that therapeutic immunization with the adenovirus expressing TS using a mouse model of chronic chagasic cardiomyopathy caused reduced cardiopathy progression and reversed electrical abnormalities and heart tissue injury (22).

In spite of all the efforts aimed to investigate the roles played by TS during *T. cruzi* infection, there are many gaps in our understanding of the sialylation process and its importance for the establishment of the complex equilibrium between host and parasite. The large number of copies present in the *T. cruzi* CL Brener genome (11), most of them present within repeated arrays in the genome, have prevented the use of reverse genetics to address the role of these parasite surface enzymes. The advent of the CRISPR/Cas9 technology brought a powerful new tool to allow gene functions studies in *T. cruzi* that can include large gene families (27-29). Here we re-analyzed the complete repertoire of aTS genes present in the *T. cruzi* genome using sequencing data based on long reads generated using PacBio technology. After confirming the full repertoire of sequences encoding aTS in the *T. cruzi* genome, we used the CRISPR/Cas9 technology to create mutant cell lines in which most aTS genes have been disrupted. After characterization of two aTS mutant cell lines, we tested these parasites as attenuated strains in infection/challenge protocols in mice. Our results indicate that TS knockout mutants have impaired capacity to infected cells both *in vitro* and *in vivo*. Most

importantly, disruption of aTS genes generates attenuated parasites that have the capacity to protect mice against a challenge with a virulent *T. cruzi* strain.

Results

The complete aTS repertoire and expression profile during the *T. cruzi* life cycle.

Previous analyses based on genome data described for the CL Brener clone, have identified a total of 11 sequences encoding aTS (11). Knowing that the current assembly of the CL Brener genome (www.tritrypdb.org) is still not complete, we complemented these analyses using PabBio sequences we have recently generated (Reis-Cunha et al, manuscript in preparation). Long reads obtained with the PacBio platform are particularly suitable to perform the assemble of genome fragments containing repetitive sequences without collapsing them. To accurately estimate the copy number and distribution of aTS genes in the *T. cruzi* CL Brener genome, we selected large contigs derived from PacBio sequencing data that contain sequences corresponding to amino acids present in the catalytic site of aTS, which are highly conserved and are crucial for TS activity (11). As shown in Table 1, we identified a total of 18 aTS coding sequences containing all key amino acid residues, including the Tyr342, which represents 7 additional sequences that are not present in the current genome assembly deposited in the tritrypdb database. Four of these sequences contain premature stop codons, confirmed by the PacBio sequencing and, therefore, are annotated as pseudogenes (TcCLB.508913.10, TcCLB.507611.260, TcCLB.508859.118 and TcCLB.508501.320). Among the 18 sequences, 6 contain SAPA repeats at their C-termini. Interestingly, the sizes of these repeats vary from 6 to 41 repeat modules and at least one of them have a divergent repetitive sequence. Bases on these analyses, we estimated that about 1% of the TS gene repertoire present in the CL Brener genome encodes active enzymes and only 1/3 of those active enzymes possess the SAPA repeats at their C-termini.

Recent work based on RNA-seq data reported by many groups have confirmed the studies showing increased expression of TS in the trypomastigote stage of the parasite. We have also evaluated the expression profile of all trans-sialidases genes using RNA-seq data generated from RNA extracted from epimastigotes, tissue cultured derived trypomastigotes (TCT) and intracellular amastigotes collected at 60 hours post infection (ama60) and 96 hours post infection (ama96) of human foreskin fibroblasts (HFF). As described by Belew et al. (30), up-regulation of TS, MASP and mucin genes occurred when ama60 and ama96 are compared and also when ama96 and trypomastigote are compared, an observation that reflects the roles played by these cell surface proteins during parasite development in the mammalian host. We have also extracted RNA from epimastigotes from the CL Brener strain cultured at exponential phase in LIT medium and compared the RNA-seq data with the data obtained from the mammalian stages of the parasite life cycle. As

shown in Figure 1B, expression of the large majority of TS genes are highly upregulated in the trypomastigote stage compared to epimastigotes, as previously described (31) and an increased expression in ama96 compared to ama60 was also observed as reported by Belew et al. (30). When we analysed the expression of only trans-sialidases belonging to group I, including all aTS genes, we observed that they are upregulated in ama96 compared to the other forms, i.e., expression of aTS initiates when the parasite is still inside the cell and is differentiating into trypomastigotes. The results shown in Fig 1B suggest that trans-sialidase activity might be important in the late stages of the *T. cruzi* intracellular development, which may be associated with events required for parasite egress from the infected cell. It is noteworthy that among the top seven TS that showed the highest levels of up-regulation in ama96, three are active trans-sialidases that contains SAPA repeats (TcCLB.509495.30, TcCLB.507085.30 and TcCLB.510787.10).

Design of sgRNAs targeting active trans-sialidases and the generation of TS mutant cell lines.

The presence of conserved sequences that include a tyrosine in the position 342 distinguishing genes encoding TS proteins with trans-sialidase activity from inactive TS, allowed us to select a region containing 210 nucleotides, spanning the sequencing encoding the conserved Tyr342, to design two sgRNAs that target 12 aTS sequences (SI Appendix, Fig.S2). To create the knockout cell lines, epimastigotes constitutively expressing Cas9 GFP tagged (Cas9::GFP) were transfected with the two sgRNAs together with a PCR fragment used as a repair template during homologous recombination repair, as describe previously (29). The repair template is composed of a single strand oligonucleotide containing the *EcoRV* restriction site, the M13 reverse primer and three stop codons flanked by 25 nucleotides of aTS sequences corresponding to the conserved catalytic domain (SI Appendix Fig. S3). After three rounds of transfection, parasites were cloned by serial dilution and genomic DNA (gDNA) was extracted. To screen for clones with disrupted aTS, gDNA was used in a PCR reaction with primers annealing in the coding sequence of aTS and in M13 primer present in the repair template (Fig. 2A primers P1 and P2). From a total of 16 clones analyzed, 69% showed to have the repair template disrupting aTS sequences and bands with the expected sizes (0.7 kb) were detected in all this clones (Fig. 2B). Following, in an attempt to measure how many aTS sequences were disrupted, gDNA from two different mutant clones named TS KO3 and TS KO7, were PCR amplified with primers annealing in the coding sequence of aTS (Figure 2A, primers P1 and P3). Following the PCR products were digested with *EcoRV*, and bands with the expected sizes, (0.60 kb and 0.16 kb) were observed at the same range in the two clones analyzed (Fig. 2C). Next the aTS sequences from TS KO7 mutant cell line were amplified using primers annealing in the coding sequence (Primers P1 and P3 from Fig. 2A) and cloned in TOPO plasmid. To screen for positive colonies, a PCR colony screening was performed using M13 primers. Evaluation of PCRs products in agarose gel showed that clones containing disrupted aTS

showed a pattern of two bands (Fig. 2D and E). This result is due to the annealing of the M13 primers in the sequences present in the TOPO plasmid (higher band) and also in the M13 sequence present in the plasmid and in the repair template (Fig. 2D). From a total of 18 colonies screened, 55% showed to have disrupted aTS (Figure 2E). To validate the data, plasmid DNA from six different transformants were sequenced, confirming integration of the repair template disrupting aTS sequences (Fig. 2F). To generate addback parasites, the mutant cell line TS KO3 was transfected with plasmid pROCKHigro containing the gene that encode one aTS (TcCLB.509495.30) which contain 19 SAPA repeats (30, 32).

Molecular characterization of aTS mutants cell lines.

To evaluate the expression of aTS in the mutant cell lines, we performed qPCR analysis, using primers annealing only in aTS coding sequences. The mRNA levels of the two mutant cell lines analyzed were strongly reduced in comparison with WT parasites and addback parasites (Fig. 4A). Western blot with anti-TS antibodies also indicated a strong reduction in protein levels of aTS in the mutant cell line TS KO3 and the completely absence of aTS in mutant cell line TS KO7 (Fig. 4B). Most importantly, TS activity assays using different amounts of parasite lysate, demonstrated that TS activity was also reduced in TS KO3 mutant cell line and completely abolish in the TS KO7 cell line. The parental cell line (parasites expressing Cas9) showed a similar level of TS activity than WT parasites as well as addback parasites. To confirm loss of TS activity in mutant cell line TS KO7, immunofluorescence using anti-TS antibody was performed. Figure 4D shows that trypomastigotes from the parental cell line are expressing aTS in their surface. In contrast, is not possible to observed expression of aTS at the surface of trypomastigotes from the mutant cell line TS KO7. Surprisingly addback parasites were not labeled for aTS expression at their surface either. Our hypothesis to explain that result is that, even though parasites are expressing the aTS copy that was supplied using pROCK plasmid, and this was showed by western blot (figure 4B) and by TS activity assay (Figure 4C), the protein are not being GPI anchored at the parasite surface. Next we decided to check if the mucins at the surface of the parasite were being sialylated, using the 3C9 antibody which recognizes an epitope that is exposed when mucins are sialylated (33, 34). The parental cell line showed a clear labelling indicating that mucins are sialylated in these parasites, however the mutant cell line TS KO7 did not show any labeling for sialylated mucins. In addition, as expected, addback parasites did not show labeling for sialylated mucins. Flow cytometry analyses using 3C9 antibody also indicated that the mucins from the mutant cell line TS KO7 are not sialylated. No difference was observed in the binding of the isolectin IB4 from *Bandeiraea (Griffonia) simplicifolia*, which has a high specificity to nonreducing α -Gal residues (34, 35), indicating that the number of α -Gal epitopes are not being altered, i.e. the number of mucins are not being altered in the mutant cells lines.

Evaluation of *in vitro* infection capacity of aTS mutant cell lines. Considering that parental cell line showed the same levels of TS activity than WT parasites, we decided to proceed with the next experiments using the parental cell line as a control. To evaluate the infectivity of mutant cell lines, LLCMK2 cells were infected with parental cell line or the two mutant cell lines. We first evaluate the number of trypomastigotes released in the medium supernatant. The release of trypomastigotes was followed during 9 days after infection, starting 3 days post-infection, when cells started to release parasites. The number of trypomastigotes released in the supernatant was lower in cells infected with mutant cell lines TS KO3 and TS KO7 on days 7 and 9 post-infection compared to cells infected with the parental cell line. The number of cells infected in different time points post-infection was also evaluated as showed in figure 6B. We observed a more significant difference in the number of cells infected in cells infected with mutant cell line TS KO7 on days 9 post infection compared to cells infected with the parental cell line, or TS KO3 mutant cell line. On days 4 and 7 post infection we observed a small difference in the number of cells infected in cells infected with TS KO7 compared to cells infected with parental cell line or TS KO3, and no difference 2 days after infection (see supplementary figure S4). We also observed a small difference in the number of amastigotes inside the cells, in cells infected with TS KO7 mutant cell line, but no difference was observed in the other time points (Supplementary Figure S5). Considering this result we decided to check if the knockout of aTS may impact in the scape of the parasite from the vacuole parasitophorous as described by Rubinde-Celis et al, 2006 (31) and to evaluate that Hella cells were infected with the parental cell line or with TS KO7 mutant cell line for 1 or 2 hours. No difference in the percentage of cells infected with WT parasites or TS KO7 were observed (Figure 5C) and most importantly, no differences in the colocalization of LAMP-1 and DAP1 were observed between cells infected with WT or TS KO7 parasites (Figure 5D), indicating that the knockout of aTs does not influence in the escape of the parasite from parasitophorous vacuole.

Knockout of aTs generates attenuated parasites. To evaluate the infectivity of the KO mutant cell lines *in vivo*, IFN-KO mice were infected with the parental cell line, and with the two mutant KO cell lines (TS KO3 and TS KO7). The parasitemia of these animals were then followed during 35 days. Mice infected with mutant cell line TS KO3 showed decrease parasitemia levels compared to mice infected with parental cell line (Fig. 6A). Most important, mice infected with mutant cell line TS KO7 showed a strong decrease in parasitemia levels compared to mice infected with parental cell line and TS KO3 with almost undetectable levels of parasites. Survival levels of mice infected with mutant cell line TS KO7 were also higher than survival levels of mice infected with the parental cell line and mice infected with mutant cell line TS KO3. To date, mice infected with addback parasites showed the same pattern of infection than mice infected with mutant cell line TS KO3 (data not show), emphasizing that

addback generated here are not able to reestablish the WT phenotype. In addition, it is important to point out that Balb/c mice infected with mutant cell line TS KO7 did not show detectable levels of parasitemia (data not showed). In an attempt to evaluate if blood trypomastigotes remained knockout for aTS, or if a wild type parasite for aTS that might be mixed with the KO population, were selected in the mice bloodstream, we performed a western blot using blood trypomastigotes collected from mice infected with mutant cell line TS KO7 cell line (SI Appendix Fig.S6). Our data showed that blood trypomastigotes circulating in mice bloodstream remained KO to aTS. Based in these results that indicates that knockout of aTS generates attenuated parasites to verify whether these mutant cell lines can be used in immunization protocols to protect mice against a challenge with virulent *T. cruzi* strains, we inoculated two groups of BALB/c mice with 5,000 trypomastigotes from the mutant cell line TS KO7 or only with PBS. Thirty days after infection mice were challenged with 10,000 trypomastigotes of the highly virulent Y strain of *T. cruzi*. As shown in Figure 6, mice inoculated with TS KO7 cell line were fully protect against the challenge with the Y strain, while control mice that received only PBS showed high levels of parasitemia (Fig. 6D) and higher mortality rates compared to mice immunized with TS KO7 (Figure 6E). These results thus not only confirm that the aTS mutants are unable to cause infection, further indicating that aTS acts as an important virulence factor for the parasite, but also showed that an attenuated strain with disrupted aTS genes may be used as a vaccine that induces high protection rates in the host. Evaluation of mice tissue by quantitative PCR also indicates the absence of parasites in tissue of mice immunized with TS KO7 mutant cell line, in contrast with mice immunized only with PBS which showed higher levels of parasites, mainly in the skeletal muscle (Figure 6F).

Discussion

The study of the roles of trans-sialidases in the *T. cruzi* infection has been impaired by the lack of genetic tools that allowed the knockout of genes present in the parasite genome in several copies. The recent advances obtained by different groups with gene editing in several organisms including *T. cruzi* and *Leishmania* spp., using the CRISPR/Cas9 technology, showed the potential of this tool to improve studies that requires genome editing. Here we use the CRISPR/Cas9 technology to disrupt the genes encoding active trans-sialidases. We first attempt to confirm the number of active trans-sialidases sequences contained in the genome of the parasite, using sequences generated in the PacBio platform. Our analysis showed that from the four genes, that have high conserved sequence similarity with aTS and are annotated as pseudogenes, one (TcCLB.506923.10) is actually an active trans-sialidase. To design the sgRNAs to target the aTS gene sequences, we used a small region close to the codon that encodes the conserved Tyr³⁴², that have been describe as a crucial amino acid residue for catalytic activity. It's important to point out that different from most of CRISPR/Cas9 technology strategies that are being used, our strategy does not require selection of parasites with a selectable

marker. Here we used a repair template containing three stop codons, flanked by small homology arms (25 nucleotides) to disrupt genes encoding aTS. In total the two sgRNAs designed target a total of 15 sequences and from these, 12 are aTS and 3 are pseudogenes with high conserved sequence similarity with aTS. Our data showed that most of aTS sequences were disrupted in the TS KO3 mutant cell line and that all aTS sequences were disrupted in TS KO7 mutant cell line. In the TS KO3 mutant cell line is possible to observe a small level of aTS mRNA compared to WT parasites, and an even more reduced level of aTS mRNA in TSKO7 mutant cell line. These results corroborates with the level of protein showed in western blot using anti-TS antibody and most important with the trans-sialidase activity assay that showed a strong reduction in trans-sialidase activity in TS KO3 mutant cell line and the abolishment of trans-sialidase activity in TS KO7 mutant cell line.

Infection of cells with the mutant cell lines showed that, disruption of trans-sialidase impaired in vitro infections, since cells infected with the mutant cell lines showed a reduced number of trypomastigotes being released in the supernatant. Considering the data showing that disruption of aTS did not affect the number of amastigotes inside cells and the percentage of cells infected 2 days after infection and also, we believe that knockout of aTS might impair the capacity of amastigotes to differentiate into amastigotes. This can explain the small number of trypomastigotes being released in the supernatant in cells infect with mutant cells lines. It is important to point out that we did not observe any difference in the escape of vacuole parasitophorous between the mutant cell lines compare with the parental cell line. It is also interesting to point out that the upregulation of some aTS from group I in amastigotes 96 hours post-infection, might also be an indicative that aTS are important for the differentiation of amastigotes in trypomastigotes. We also observe that although addback parasites showed higher levels of TS activity compare to WT parasites and the parental cell line, this was not sufficient to restore WT phenotype. Cells infected with addback parasites and also mice infected with addback parasites showed similar patterns of infection than TS KO3 mutant parasites.

Surprisingly, IFN-KO mice which are highly susceptible to *T. cruzi* infection, showed low levels of parasitemia when infected with mutant KO cell lines compared with mice infected with the parental cell line. This difference was more evident in mice infected with parasites TS KO7, which showed to have all copies of aTS disrupted compared to clone TS KO3, which still remains with some wild type aTS copies. It is noteworthy that besides the low levels of parasitemia, mice infected with the mutant KO cell lines also showed a strong delay in parasitemia peaks. While mice infected with *T. cruzi* parental cell line displayed parasitemia peaks with 33-35 days post-infection, mice infected with mutant TS KO cell lines displayed parasitemia peaks with 43-49 days after infection (data not shown). Survival rates of mice infected with parasites with disrupted aTS were higher compared to mice infected with *T. cruzi* parental cell line. Our data correlates with data obtained by Franchin *et al*, 1997, which demonstrates that the passive transfer of a monoclonal antibody specific for an sialic acid-dependent epitope on the

surface of the parasite reduces infection in mice (33). The results that we observe in mice might be related with the ability of the trans-sialidase to transfer sialic acid between molecules in the mammalian host. An important mechanism utilized by the parasite to modulate host immune response is the sialylation of CD8⁺ T cells. It was already shown that sialylation of CD8⁺ T cells by the aTS that are shed by the parasite in the host blood serum compromise ag-specific T cell responses during *T. cruzi* infection (36).

In the last twenty years many efforts were made in an attempt to find a vaccine that protects against Chagas Disease. Many different vaccine formulations were tested and some of them have trans-sialidases in their composition, since these proteins recruit a strong immune response that protects mice against the challenge with *T. cruzi* (24, 26, 37). Recent data from our group showed that mice immunized with one aTS without SAPA repeats and associated with alum and CpG, are able to protect against a challenge with *T. cruzi* (Aprigio et al, manuscript in progress). Considering that aTS have been shown to be an important virulence factor from *T. cruzi* and that there are no related proteins present in the mammalian host, the development of drugs that can target this enzyme seems to be a reasonable alternative in the combat of the disease. However, up to date, no inhibitors that have the capacity to reduce the catalytic activity of the enzyme were developed (38). Here we hypothesized that the knockout of aTS might generate attenuated parasites that have the capacity to confer protection against a challenge with *T. cruzi*. To test this hypothesis, we decide to use the attenuated parasites generated here to immunized immune competent mice. We observe a high level of protection, since we could not detect parasites in the blood of mice immunized with parasites lacking aTS. In the next steps is important to evaluate the type of immune response that immunization with attenuated parasites are recruiting. Moreover, our data showed that, as indicated by previously data, aTS are an important virulence factor from *T. cruzi*.

Material and Methods

Expression profile of trans-sialidases. The RNA-Seq data from *T. cruzi* CL Brener strain during the different life cycle stages, including epimastigotes, trypomastigotes and amastigotes at 60 and 96 hours post-infection, were obtained from previous data published by Belew *et al*, 2017. The raw counts were normalized to counts per million (cpm) and converted in log₂ (cpm). The data related to trans-sialidases's coding genes were selected and the expression values were obtained by the subtraction of log₂ (cpm) of each specific gene/sample from the gene's average across all samples and plotted as a heatmap according to Love *et al*, 2015 (39). The TS genes were organized in 8 different groups according to Freitas *et al*, 2012.

Design of single guide RNAs. To design sgRNAs that target only aTS a region close to the codon that encodes Tyr342 were select and the Eukaryotic Pathogen CRISPR guide RNA/DNA design tool available in <http://grna.ctegd.uga.edu/> was used. The sgRNAs RNAs with best scores and targeting all aTS were chosen.

Synthesis of sgRNA. To amplify sgRNAs that target aTS primers containing the T7 promotor sequence, the 20 nucleotides complementary to the target aTS and part of the sgRNA scaffold were used in a PCR reaction together with a primer that anneals in the scaffold of sgRNA, as described before (29). All sequences of primers used in this work are available in S1 Appendix table S1. As a template in this PCR reaction an plasmid containing the complete sequence of the scaffold of sgRNA was used (40). The resulting PCRs were purified (PCR clean up kit, MACHEREY-NAGEL) and 2 µg of PCR product approximately was used in an *in vitro* transcription reaction following the fabricant instructions (MEGAscriptTM Kit – Thermo Fisher). The reactions were incubated at 37°C during 16 hours and then purified with phenol-chloroform and analyzed in 2% agarose gel under desnaturing conditions.

Generation of mutant cell lines. A total of 4×10^7 epimastigotes from CL Brener clone in logarithmic growing phase ($0.5 - 2 \times 10^7$) and constitutively expressing Cas9 from *Streptococcus pyogenes* (40) were centrifuge at 1400 g for 10 minutes. Following parasites were resuspended in 80 µL Tb-BSF buffer (41) transferred to a 1.5 microtube and 20 µg of sgRNA92 or sgRNA110 and 20 µg of a single stranded oligonucleotide synthesized by IDT (repair template 92 or 110) were mixed to this reaction. A total of 100 µL (parasites + sgRNAs + repair templates) were transferred to a 0.2 cuvette (Biorad) and one pulse was applied in Amaxa Nucleofector electroporator (Lonza) using the U033 program. In total, parasites were transfected two times with sgRNA110 plus repair template 110 and one time with sgRNA92 plus repair template 92. The transfections were carry out with a interval of 3 - 4 days and after three rounds of transfection parasites were selected by serial dilution in 96 well plates.

PCRs, digestions and sequence analyses of mutant cell lines. Parasites were washed once with PBS and their gDNA were extracted (illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit-GE Helthcare, GE Healthcare). To evaluate the integration of the repair template disrupting aTS gene sequences primers aTS F and M13 R were used. To estimate how many copies of aTS were disrupted by the repair template, gDNA were used in a PCR reaction with primers aTS F and aTS R. Following 20 µL of PCR reactions were used in a digestion reaction with *EcoRV*. The PCR product resulted from PCR reactions with primers aTS F and aTS R using mutant cell line TS KO7 was cloned in TOPO 2.1 plasmid. PCR screening using primers M13 F and M13 R were performed. Colonies showing to have disrupted aTS sequences were sequence in ABI (3730 Analyzer, Applied Biosciences).

Quantitative PCR and Western blots. Total RNA was extracted from tissue culture derived trypomastigotes released in the supernatants of infected LLC-MK2 cells using the Trizol reagent (Invitrogen, CA, USA). After DNase treatment (following manufactures instructions; Invitrogen, CA, USA), RNA was quantified using Qubit HS RNA assay (Thermo Fisher) and 200 ng of total RNA was used in cDNA synthesis using SuperScript IV reverse transcriptase (following instructions; Invitrogen, CA, USA). For qPCR, cDNA samples were diluted 1:10 in DNase free water and reactions were done using SsoAdvanced Universal SYBR Green Mastermix (BioRad) in a 7900HT Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher). For amplification of aTS transcripts, primers were designed to anneal in a high conserved region that includes the tyrosine residue that distinguishes active and inactive members of the family. Relative gene expression was calculated from normalization to Ct values obtained for the constitutive gene 60S ribosomal protein L9 (TcCLB.504181.10). All primers sequences can be found in the S1 Appendix table S1. For Western blots parasites were washed once in PBS and lysed in RIPA buffer 1X (for 10X buffer: 50 mM Tris-HCl pH 8.0; 150 mM NaCl; 1% NP-40; 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS). Protein extracts were separated in acrilamide gel 7.5%, transferred to nitrocellulose membrane and incubated with anti-TS antibody (1:1000). As a loading control the membrane was also incubated with anti-tubulin antibody (1:5000, Sigma). To evaluate the expression on aTS in blood trypomastigotes, blood from IFN-KO mice infected with TS KO7 mutant parasites were collected and transfer to culture flasks with Vero cells adhered in DMEN medium. Culture derived trypomastigotes released from this culture were then used were lysate in lysis buffer and used in Western blots.

Trans-sialidases activity assay. A total of 2×10^7 TCTs were lysed in appropriate buffer (50mM Tris HCl, 0.1 M NaCl, 1% triton and protease inhibitor) and different amounts of sample (1 μ L, 2.5 μ L, 5.0 μ L and 10.0 μ L) were incubated with fetal bovine serum, BSA 1%, hepes and [D-glucose-1-4C]lactose (Sigma) for 30 minutes, at room temperature. Following, the reactions were purified using a QAE-Sephadex column and the activity of purified reactions were measure in counts per minute in a scintillation counter (Tri-Carb 2810 TR – PerkinElmer).

Immunofluorescence assays. Culture derived trypomastigotes were fixed with 4% paraformaldehyde in glass slides and incubated in blocking solution (PBS 1X, BSA1%) for 1 hour. Fixed cells were incubated for 1 hour with anti-TS antibody produced in mice by us, diluted 1:50 or with 3C9 antibody (42) diluted 1:10, followed by incubation for 1 hour with Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG diluted 1:600 (Goat Anti-Mouse IgG H&L Alexa Fluor 594). Slides were mounted with ProLong Gold antifade reagent. For the invasion assays mouse embryonic fibroblasts (MEF) were seeded at 50% confluency in a 8-well chamber slide (Thermo Fisher) and maintained for 16 hours at 37°C and 5% CO₂.

Then, MEFs were infected with *T. cruzi* Cas9 and TS KO7 at a multiplicity of infection (MOI) of 100 for one and two hours. After infection, the cells were washed five times with PBS to remove parasites that failed to enter the MEFs, and, fixed with 4% paraformaldehyde for 30 minutes at room temperature. After successive washes with PBS, cells were incubated for 20 minutes at room temperature with blocking buffer (PBS containing 2% bovine serum albumin and 0.5% saponin). Next, the cells were treated with anti-LAMP-1 (1D4B, Invitrogen, #14-1071-82) primary antibody diluted in blocking buffer (1:50) for 45 minutes at room temperature and, after successive washes with blocking buffer, incubated with anti-rat Alexa594 (Life Technologies, #A32740, 1:250 dilution). DAPI (1 µg/mL) was then used to stain nuclei (15 minutes, room temperature) and the slides were mounted after successive washes with PBS. The samples were then visualized in an epifluorescence microscope. Around 500 cells were considered for each individual experiment.

Flow cytometry assays. Trypomastigotes culture derived were centrifuge once at 1000g washed once on PBS 1X and fixed with 4% paraformaldehyde. Following parasites were centrifuge as previously and washed once with PBS and incubated in 200 µL of incubation solution (for mAb 3C9: 1X PBS; BSA 5%; mAb 3C9 supernatant; for IB4 isolectin: PBS 1X; BSA 5%; 0,01 M MgCl₂; 0,01 M CaCl₂; 0,01 M MnCl₂; biotinylated IB4) for hour. Parasite were then centrifuge at 1000g and resuspended in wash solution (for mAb 3C9: PBS 1X; BSA 0,1%; 0,02 azide, for biotinylated IB4: PBS 1X; BSA 0,1%; 0,01 MgCl₂; 0,001 M CaCl₂; 0,01 M MnCl₂). Parasites where centrifuged at 1000g for 5 minutes and incubated for 30 minutes in 200 µL incubation solution with Alexa 488 anti-mouse 1/200 for mab 3C9 or streptavidin phycoerythrin 1/200 for IB4. Next parasites were centrifuge at 1000g for 5 minutes and fixed again with 4% paraformaldehyde. Parasites were then centrifuge at 1000g for 5 minutes, resuspended in 500 µL PBS 1X and analyzed on BD Accuri Flow Cytometer using FL1 filter for mAb 3C9 and FL2 for IB4 isolectin.

In vitro infections using LLCMK2 cells. To generate culture derived trypomastigotes (TCTs), epimastigotes were submitted to nutritional stress. To do so, epimastigotes in logarithmic growth phase were incubated in 30 mL of LIT medium during 12 days. Following 15 mL of epimastigotes culture containing metacyclic trypomastigotes were centrifuged at 1400 g for 10 minutes and resuspended in DMEM supplemented 2% SFB. These suspensions were then added to culture flasks containing LLCMK2 cell monolayers for 24 hours at 37°C. In the next day, cells were washed once with PBS and incubated for more 24 hours with 10% of non heat inactivated horse serum (Gibco), in order to kill epimastigotes. Next the cultures were washed once with PBS and incubated at 34°C with DMEM supplemented with 2% of heat inactivate bovine serum. After periods from seven to ten days post-infection, culture supernatant containing TCTs was collected, centrifuged at 600 g and incubated at

37° for 4 hours. This allowed TCTs to swim away from the cell pellet. TCTs were then collected, counted and used to RNA extraction, protein extraction, mice infection or to reinfect subconfluent cell monolayers in culture plates, at a density of 10 trypomastigotes per cell (LLC-MK2). Two types of experiments were done: (1) trypomastigote release, in which TCTs remained in the culture media for 24 hours; (2) intracellular amastigotes counting, in which cells were exposed to TCTs for 3 hours. After these periods cells were rinsed with PBS 3-5 times to remove extracellular parasites and fresh DMEM supplemented with 2% SFB was added. In (1) monolayers were observed under the microscope for the next 11 days and released trypomastigotes were counted on days 3, 5, 7, 9 and 11 in a Neubauer chamber. In (2) cells were cultured on glass slides and after 24 hours, 48 hours, 4, 7 and 9 days culture media was removed, cells were fixed with ice-cold methanol and stained with quick panoptic dyes. After washing, slides were mounted with Entellan (Merck Millipore).

Mice experiments. Twelve female IFN-KO mice were divided in three groups, with 4 animals per group and intraperitoneally injected with 10.000 TCTs resuspended in PBS solution. Mice parasitemia was counted in microscopy slides with 5 μ L of blood take it from the mice tail and followed during 49 days, as described by Brenner (43). For the immunization protocols, eight female BALB/c mice with 6-8 weeks were separated in two groups with 4 animals per group and intraperitoneally injected with 5.000 culture derived trypomastigotes (TS KO7 parasites). Thirty days after injection, mice were challenge with 10.0000 blood trypomastigotes from Y strain. Mice parasitemia was followed during 13 days, as described for IFN-KO mice.

References

1. Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol.* 1973;27:347-82.
2. Schenkman S, Ferguson MA, Heise N, de Almeida ML, Mortara RA, Yoshida N. Mucin-like glycoproteins linked to the membrane by glycosylphosphatidylinositol anchor are the major acceptors of sialic acid in a reaction catalyzed by trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and biochemical parasitology.* 1993;59(2):293-303.
3. Acosta A, Schenkman RP, Schenkman S. Sialic acid acceptors of different stages of *Trypanosoma cruzi* are mucin-like glycoproteins linked to the parasite membrane by GPI anchors. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas.* 1994;27(2):439-42.
4. Lantos AB, Carlevaro G, Araoz B, Ruiz Diaz P, Camara Mde L, Buscaglia CA, et al. Sialic Acid Glycobiology Unveils *Trypanosoma cruzi* Trypomastigote Membrane Physiology. *PLoS pathogens.* 2016;12(4):e1005559.
5. Varki A. Sialic acids in human health and disease. *Trends Mol Med.* 2008;14(8):351-60.
6. Schauer R, Kamerling JP. Exploration of the Sialic Acid World. *Adv Carbohydr Chem Biochem.* 2018;75:1-213.
7. Pereira-Chioccola VL, Acosta-Serrano A, Correia de Almeida I, Ferguson MA, Souto-Padron T, Rodrigues MM, et al. Mucin-like molecules form a negatively charged coat that protects *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes from killing by human anti- α -galactosyl antibodies. *J Cell Sci.* 2000;113 (Pt 7):1299-307.

8. Buscaglia CA, Campo VA, Frasch AC, Di Noia JM. Trypanosoma cruzi surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nature reviews Microbiology*. 2006;4(3):229-36.
9. da Fonseca LM, da Costa KM, Chaves VS, Freire-de-Lima CG, Morrot A, Mendonca-Previato L, et al. Theft and Reception of Host Cell's Sialic Acid: Dynamics of Trypanosoma Cruzi Trans-sialidases and Mucin-Like Molecules on Chagas' Disease Immunomodulation. *Front Immunol*. 2019;10:164.
10. El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, et al. The genome sequence of Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. 2005;309(5733):409-15.
11. Freitas LM, dos Santos SL, Rodrigues-Luiz GF, Mendes TA, Rodrigues TS, Gazzinelli RT, et al. Genomic analyses, gene expression and antigenic profile of the trans-sialidase superfamily of Trypanosoma cruzi reveal an undetected level of complexity. *PLoS One*. 2011;6(10):e25914.
12. Cremona ML, Sanchez DO, Frasch AC, Competella O. A single tyrosine differentiates active and inactive Trypanosoma cruzi trans-sialidases. *Gene*. 1995;160(1):123-8.
13. Buschiazio A, Amaya MF, Cremona ML, Frasch AC, Alzari PM. The crystal structure and mode of action of trans-sialidase, a key enzyme in Trypanosoma cruzi pathogenesis. *Molecular cell*. 2002;10(4):757-68.
14. Schenkman S, Pontes de Carvalho L, Nussenzweig V. Trypanosoma cruzi trans-sialidase and neuraminidase activities can be mediated by the same enzymes. *The Journal of experimental medicine*. 1992;175(2):567-75.
15. Buscaglia CA, Competella O, Leguizamón MS, Frasch AC. The repetitive domain of Trypanosoma cruzi trans-sialidase enhances the immune response against the catalytic domain. *J Infect Dis*. 1998;177(2):431-6.
16. Nardy AF, Freire-de-Lima CG, Perez AR, Morrot A. Role of Trypanosoma cruzi Trans-sialidase on the Escape from Host Immune Surveillance. *Frontiers in microbiology*. 2016;7:348.
17. Perez Brandan C, Basombrio MA. Genetically attenuated Trypanosoma cruzi parasites as a potential vaccination tool. *Bioengineered*. 2012;3(4):242-6.
18. Basombrio MA. Trypanosoma cruzi: partial prevention of the natural infection of guinea pigs with a killed parasite vaccine. *Exp Parasitol*. 1990;71(1):1-8.
19. Toro Acevedo CA, Valente BM, Burle-Caldas GA, Galvao-Filho B, Santiago HDC, Esteves Arantes RM, et al. Down Modulation of Host Immune Response by Amino Acid Repeats Present in a Trypanosoma cruzi Ribosomal Antigen. *Front Microbiol*. 2017;8:2188.
20. Vasconcelos JR, Hiyane MI, Marinho CR, Claser C, Machado AM, Gazzinelli RT, et al. Protective immunity against trypanosoma cruzi infection in a highly susceptible mouse strain after vaccination with genes encoding the amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. *Hum Gene Ther*. 2004;15(9):878-86.
21. Machado AV, Cardoso JE, Claser C, Rodrigues MM, Gazzinelli RT, Bruna-Romero O. Long-term protective immunity induced against Trypanosoma cruzi infection after vaccination with recombinant adenoviruses encoding amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. *Hum Gene Ther*. 2006;17(9):898-908.
22. Pereira IR, Vilar-Pereira G, Marques V, da Silva AA, Caetano B, Moreira OC, et al. A human type 5 adenovirus-based Trypanosoma cruzi therapeutic vaccine re-programs immune response and reverses chronic cardiomyopathy. *PLoS Pathog*. 2015;11(1):e1004594.
23. Martin DL, Weatherly DB, Laucella SA, Cabinian MA, Crim MT, Sullivan S, et al. CD8+ T-Cell responses to Trypanosoma cruzi are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes. *PLoS Pathog*. 2006;2(8):e77.
24. Prochetto E, Roldan C, Bontempi IA, Bertona D, Peverengo L, Vicco MH, et al. Trans-sialidase-based vaccine candidate protects against Trypanosoma cruzi infection, not only inducing an effector immune response but also affecting cells with regulatory/suppressor phenotype. *Oncotarget*. 2017;8(35):58003-20.
25. Bontempi I, Fleitas P, Poato A, Vicco M, Rodeles L, Prochetto E, et al. Trans-sialidase overcomes many antigens to be used as a vaccine candidate against Trypanosoma cruzi. *Immunotherapy*. 2017;9(7):555-65.

26. Fontanella GH, De Vusser K, Laroy W, Daurelio L, Nocito AL, Revelli S, et al. Immunization with an engineered mutant trans-sialidase highly protects mice from experimental *Trypanosoma cruzi* infection: a vaccine candidate. *Vaccine*. 2008;26(19):2322-34.
27. Peng D, Kurup SP, Yao PY, Minning TA, Tarleton RL. CRISPR-Cas9-mediated single-gene and gene family disruption in *Trypanosoma cruzi*. *mBio*. 2014;6(1):e02097-14.
28. Lander N, Li ZH, Niyogi S, Docampo R. CRISPR/Cas9-Induced Disruption of Paraflagellar Rod Protein 1 and 2 Genes in *Trypanosoma cruzi* Reveals Their Role in Flagellar Attachment. *MBio*. 2015;6(4):e01012.
29. Burle-Caldas GA, Grazielle-Silva V, Soares-Simoes M, Schumann Burkard G, Roditi I, DaRocha WD, et al. Editing the *Trypanosoma cruzi* genome with zinc finger nucleases. *Molecular and biochemical parasitology*. 2017;212:28-32.
30. Belew AT, Junqueira C, Rodrigues-Luiz GF, Valente BM, Oliveira AER, Polidoro RB, et al. Comparative transcriptome profiling of virulent and non-virulent *Trypanosoma cruzi* underlines the role of surface proteins during infection. *PLoS pathogens*. 2017;13(12):e1006767.
31. Rubin-de-Celis SS, Uemura H, Yoshida N, Schenkman S. Expression of trypomastigote trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* increases parasite escape from its parasitophorous vacuole. *Cellular microbiology*. 2006;8(12):1888-98.
32. DaRocha WD, Silva RA, Bartholomeu DC, Pires SF, Freitas JM, Macedo AM, et al. Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. *Parasitology research*. 2004;92(2):113-20.
33. Franchin G, Pereira-Chiocola VL, Schenkman S, Rodrigues MM. Passive transfer of a monoclonal antibody specific for a sialic acid-dependent epitope on the surface of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes reduces infection in mice. *Infection and immunity*. 1997;65(7):2548-54.
34. Andrews NW, Hong KS, Robbins ES, Nussenzweig V. Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol*. 1987;64(3):474-84.
35. Portillo S, Zepeda BG, Iniguez E, Olivas JJ, Karimi NH, Moreira OC, et al. A prophylactic alpha-Gal-based glycovaccine effectively protects against murine acute Chagas disease. *NPJ Vaccines*. 2019;4:13.
36. Freire-de-Lima L, Alisson-Silva F, Carvalho ST, Takiya CM, Rodrigues MM, DosReis GA, et al. *Trypanosoma cruzi* subverts host cell sialylation and may compromise antigen-specific CD8+ T cell responses. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(18):13388-96.
37. Haolla FA, Claser C, de Alencar BC, Tzelepis F, de Vasconcelos JR, de Oliveira G, et al. Strain-specific protective immunity following vaccination against experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine*. 2009;27(41):5644-53.
38. Kashif M, Moreno-Herrera A, Lara-Ramirez EE, Ramirez-Moreno E, Bocanegra-Garcia V, Ashfaq M, et al. Recent developments in trans-sialidase inhibitors of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of drug targeting*. 2017;25(6):485-98.
39. Love MI, Anders S, Kim V, Huber W. RNA-Seq workflow: gene-level exploratory analysis and differential expression. *F1000Research*. 2015;4:1070.
40. Burle-Caldas GA, Soares-Simoes M, Lemos-Pechnicki L, DaRocha WD, Teixeira SMR. Assessment of two CRISPR-Cas9 genome editing protocols for rapid generation of *Trypanosoma cruzi* gene knockout mutants. *International journal for parasitology*. 2018.
41. Schumann Burkard G, Jutzi P, Roditi I. Genome-wide RNAi screens in bloodstream form trypanosomes identify drug transporters. *Molecular and biochemical parasitology*. 2011;175(1):91-4.
42. Schenkman S, Jiang MS, Hart GW, Nussenzweig V. A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. *Cell*. 1991;65(7):1117-25.
43. Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 1962;4:389-96.

Figure Legends

Figure 1. Expression profile of Trans-sialidases in CL Brener. Heatmap representing the expression values of 506 genes coding trans-sialidases (TS) of all groups (A) and 20 TS belonging to group I (B) in different stages of the life cycle of *T. cruzi* (CL Brener cloned strain). Rows represent each gene and columns represent samples. The expression values are represented in a color grade scale, where red represents up-regulation and blue represents down-regulation. The genes were clustered according to the expression values across all samples. The *T. cruzi* life stages and TS groups are represented in different colors in x and y axis, respectively.

Table 1. Trans-sialidases from group I. Trans-sialidases were grouped in 8 different groups according to sequence similarity and the presence of amino acid motifs importantly for catalytic activity by Freitas et al, 2011 (11). The table shows all TS from group I, including the inactive members (highlight in grey). Bold letters show sequences annotated as pseudogenes in TriTrypDB. Asterisk indicate one sequence that although was annotated as a pseudogene in TriTrypDB due to the presence of premature stop codons, sequence generated in PacBio platform showed that this sequence is complete and is an active trans-sialidase containing SAPA repeats. For all sequences the table indicated the presence of the conserved Tyr342 and SAPA repeats. The table also indicates which ID is annotated on TriTrypDB, the allele correlated with each ID (when available), and the chromosome where the sequences are located (when available).

Figure 2. Screening of transfected parasites with disrupted aTS genes. Genomic DNA from transfected parasites were extracted and used as template in a PCR reaction with primers annealing in aTS coding sequences and in the M13 sequence present in the donor template (A). Analyses of the PCR reactions using primers P1 and P2 in agarose gel (B). From a total of 16 clones analyzed, 69% showed to have the repair template disrupting aTS sequences. Parental – parasites expressing Cas9::GFP, expressing Cas::GFP, TS KO3- Mutant cell line clone 3, TS KO7 - Mutant cell line clone 7. Two mutant cloned cell lines were analyzed by PCR using primers P1 and P3 (A) and the resultant 0.859 kb PCR products were digest with *EcoRV* enzyme (C). Parental – gDNA from parental cell line not digested, Parental Eco – gDNA from parental cell line digested with *EcoR* I, TS KO3 – gDNA from TS KO3 not digested, TS KO3 Eco – gDNA from TS KO3 digested with *EcoRV*, TS KO7 – gDNA from TS KO7 not digested, TS KO7 Eco – gDNA from TS KO7 digested with *EcoRV*. Red arrows indicated the bands that should be release after digestion, in the case of aTS sequences disrupted by donor.

Figure 3. Sequence analyses of disrupted aTS derived from mutant cell line TS KO7. Genomic DNA from mutant cell line TS KO7 was used as template in a PCR reaction with primers annealing in aTS sequences, as describe in figure 2 (primers P1 and P3). The PCR products were cloned in TOPO 2.1 plasmid and competent cell bacteria were transformed. Following PCR colony screening with M13 primer were performed (A). Colonies containing TOPO plasmid with disrupted aTS showed a pattern

of two bands as described in the scheme (A) while colonies containing TOPO with WT aTS showed a pattern of one band (B). Plasmid DNA from colonies containing disrupted aTS were extracted and sequenced. Sequences generated were align with WT aTS sequences as a reference (C).

Figure 4. Analysis of the expression of aTS in mutant KO cell lines. Total RNA from trypomastigotes culture derived were extracted and the mRNA levels of aTS were measure by qPCR, using primers annealing only in aTS sequences (A). Total extract from TCTs were separated in acrylamide gel 7.5%, transfer to a nitrocellulose membrane and incubated with anti-trans-sialidase antibody (B). The bottom panel shows incubation of the membrane with anti-tubulin antibody, for loading control. Trans-sialidase activity assay using ^{14}C -siallyllactose and the supernatant of lysate TCTs (C). Culture derived trypomastigotes, or epimastigotes were fixed with 4% paraformaldehyde and incubated with anti-TS antibody or with 3C9 antibody. Following incubation with Alexa labelled secondary antibody imagens were taken at Nikon microscope using 40X magnificence objective (D). Wild type trypomastigotes, the parental cell line and TS KO7 mutant parasites were fixed and treated with 3C9 antibody (upper panel) or with biotinylated IB4 isolectin (lower panel). Control parasites were treated only with PBS (E).

Figure 5. *In vitro* infectivity of TS KO mutant cell lines. LLC-MK2 cells were infected with TCTs from parental cell line or the mutant TS KO cells lines and the release of trypomastigotes in the supernatant were measured three, five, seven and nine days after infection (A). The number of cells infected were also evaluate by infecting LLC-MK2 cells previously attached to coverslips and stained with panoptic dye, nine days after infection (B). Mouse embryonic fibroblasts cell were infected with parental cell line or TS KO7 mutant cell line for 1 or 2 hours, fixed and incubated with anti-Lamp1.

Figure 6. Infection and immunization of mice with mutant cell lines. IFN-KO mice were infected with 5.000 TCTs of the parental cell line, the mutant cell line TS KO3 or TS KO7 and parasitemia (A) and survival rates (B) were followed for 35 days. BALB/c mice were injected with 5.000 TCTs of the mutant cell line TS KO7 or only with PBS. Thirty days after infection mice were challenged with 10.000 blood trypomastigotes from Y strain and the parasitemia (C) and survival rates (D) were followed during 7 days.

Supplementary Figures

Fig.S1. Alignment of sequences annotated as pseudogenes on TriTrypDB with sequences generated on PacBio. Sequences annotated as pseudogenes on TriTrypDB (TcCLB.506923.10, TcCLB.507611.260, TcCLB.508859.118, TcCLB.508913.10) with high sequence similarity with aTS sequences were aligned with sequences generated in PacBio sequence platform.

Fig. S2. Coding sequence of one aTS showing sequences of sgRNAs. Coding sequence of an aTS from group I with 19 SAPA repeats (TcCLB.509495.30) showing the region used to design sgRNAs

(bold letters) and nucleotides that encodes Tyr342 (lower case letters). Highlight in grey sgRNA92; underlined sgRNA110; highlight in pink SAPA repeats.

Fig. S3. Schematic representation of the repair templates used to disrupt active trans-sialidases coding sequences. As a repair template a single stranded oligonucleotide with three stop codons (lower case letters), the sequence of the M13 reverse universal primer (grey letters) and the restriction site of the *EcoRV* enzyme was used. To allow homologous recombination, 25 nucleotides of aTS coding sequences, were used as homology arms.

Fig.S4 Number of cells infected. LLC-MK2 cells were infected with TCTs from the parental cell line (parental) or mutant cell line TS KO3 or TS KO7. The number of cells infected were measure two, four, seven days after infection.

Fig. S5 Number of amastigotes per cell infected. LLC-MK2 cells were infected with TCTs from the parental cell line (parental) or mutant cell line TS KO3 or TS KO7. The number of amastigotes per cell infected were measure two, four, seven and nine days after infection.

Fig. S6 Expression of aTS in blood trypomastigotes isolated from IFN-KO mice. Blood from four IFN-KO mice infected with mutant cell line TS KO7 were isolated and used to infect LLC-MK2 cells. The resultant TCTs were used for protein extraction and these were separated in acrylamide gel 7.5%, transfer to nitrocellulose membranes and incubated with anti-TS antibody (upper panel). As a loading control, the same membrane was also incubated with anti-tubulin antibody (bottom panel). As a negative control WT type epimastigotes as used.

Table I

TriTrypdb ID	PacBio ID	% Identity	Allele	Chromosome	S APA repeats
TcCLB.509817.50	TcCBr004.g1991	100%	Esmeraldo-like	16	0
TcCLB.508089.10	TcCBr036.g11703	100%	Esmeraldo-like	11	0
TcCLB.505931.30	TcCBr103.g24598	100%	Esmeraldo-like	30	0
TcCLB.507979.30	TcCBr127.g27088	98.63%	Esmeraldo-like	17	9*
TcCLB.511323.10	TcCBr028.g9710	100%	Non Esmeraldo	17	6
TcCLB.506975.80	TcCBr030.g10449	100%	Non Esmeraldo	16	0
TcCLB.503993.10	TcCBr199.g30831	100%	Non Esmeraldo	30	0
TcCLB.507085.30	TcCBr120.g26481	99.66%	Non Esmeraldo	33	15
TcCLB.510787.10	TcCBr120.g26526	95.58%	Non Esmeraldo	33	41
TcCLB.509495.30	TcCBr234.g31624	94.93%	Non Esmeraldo	33	19
TcCLB.508857.30	TcCBr090.g22670	99.86%	Non Esmeraldo	11	0
TcCLB.508913.10**	TcCBr143.g28246**	99.80%	Non Esmeraldo	17	0
TcCLB.507611.260**	TcCBr104.g24660**	100%	Esmeraldo-like	37	0
TcCLB.508501.320**	TcCBr120.g26526**	91.81%	Non Esmeraldo	33	0
TcCLB.508859.118**	TcCBr036.g11754**	99.46%	Non Esmeraldo	17	0
-	TcCBr278.g32284***				
-	TcCBr143.g28263***				
-	TcCBr014.g5552 ***				

*This sequence has a divergent 12 amino acid repeat (GSGAKSTSTPV) compared to the SAPA repeat (DSSAHGTPSIPV)

** Pseudogenes

*** no Tritrypdb sequence could be assigned

