

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

IZADORA VOLPATO ROSSI

MECANISMOS DE RESISTÊNCIA À LISE PELO SISTEMA COMPLEMENTO EM  
*TRYPANOSOMA CRUZI*: SELEÇÃO DE PARASITOS RESISTENTES E  
CARACTERIZAÇÃO DE SUAS VESÍCULAS EXTRACELULARES

CURITIBA

2019

IZADORA VOLPATO ROSSI

MECANISMOS DE RESISTÊNCIA À LISE PELO SISTEMA COMPLEMENTO EM  
*TRYPANOSOMA CRUZI*: SELEÇÃO DE PARASITOS RESISTENTES E  
CARACTERIZAÇÃO DE SUAS VESÍCULAS EXTRACELULARES

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Marcel Ivan Ramírez Araya

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Rossi, Izadora Volpato

Mecanismos de resistência à lise pelo sistema complemento em *Trypanosoma cruzi*: seleção de parasitos resistentes e caracterização de suas vesículas extracelulares. / Izadora Volpato Rossi. – Curitiba, 2019. 100 p.: il.

Orientador: Marcel Ivan Ramírez Araya

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. *Trypanosoma cruzi* 2. Chagas, Doença de. I. Título II. Araya, Marcel Ivan Ramírez III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (22. ed.) 571.994



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA - 40001016044P0

ATA N°187

### TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **IZADORA VOLPATO ROSSI** intitulada: "**Mecanismos de resistência à lise pelo sistema complemento em *Trypanosoma cruzi*: seleção de parasitos resistentes e caracterização de suas vesículas extracelulares**", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 15 de Fevereiro de 2019.

MARCEL IVAN RAMÍREZ ARAYA  
Presidente da Banca Examinadora (IOC-FIOCRUZ)

SHEILA MARIA BROCHADO WINNISCHOFER  
Avaliador Externo (UFPR)

AUGUSTO SAVIO PEIXOTO RAMOS  
Avaliador Externo (ICC)

Dedico essa dissertação à minha família  
por me incentivarem na busca do  
conhecimento e do entendimento do  
mundo.

## AGRADECIMENTOS

A realização da presente dissertação não seria possível sem o apoio de várias pessoas e instituições. Sou grata a todos os que me auxiliaram de alguma maneira durante esses dois anos de trabalho.

Devo gratidão às energias do universo que retribuíram minhas vibrações e me ajudaram a ter saúde, paciência e perseverança para enxergar o lado positivo das situações e ser forte durante este tempo.

Agradeço à Universidade Federal do Paraná, ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia e aos professores e servidores pela oportunidade de desenvolver o meu mestrado e pela disponibilidade e auxílio. Em especial, tenho enorme admiração pela Prof. Dra. Larissa Magalhães e Prof. Dra. Sheila Winnischofer que estiveram próximas durante esses dois anos e são exemplos de gentileza e dedicação. Também ao Prof. Dr. Wanderson Duarte da Rocha, chefe do laboratório de Genômica Funcional de Parasitos (GFP) pelo apoio prestado.

Sobretudo, sou grata ao meu orientador, Prof. Dr. Marcel Ivan Ramírez Araya, inicialmente por me aceitar como aluna mesmo sem me conhecer. Segundamente por ter desenvolvido um laço de confiança de ambas as partes durante este tempo juntos. Obrigada por toda orientação, científica, profissional, pessoal e cultural. Acima de tudo, obrigada por estimular o meu interesse pelo conhecimento e por nos fazer perceber que a pergunta é mais importante que a resposta, que a estratégia é mais importante que a técnica e que sempre devemos aprender algo dos erros.

Agradeço especialmente aos meus parceiros de trabalho em vesículas extracelulares, Bruno Gavinho, Isabella Jiacomini e Carolina Ribeiro, por estarem sempre dispostos, serem sempre um braço direito, e compartilharem momentos intensos de alegria, estresse e compreensão. Vocês me salvaram várias vezes e transformaram momentos de tensão em risada. Com vocês também vi que fazer pesquisa é resistir sem desânimo e que juntos vamos mais longe. Aos meus colegas de laboratório do grupo Genômica Funcional de Parasitos – Bioquímica – UFPR, sou

grata por me auxiliarem e serem sempre prestativos. Desejo sucesso a todos os alunos de pós-graduação com quem cruzei durante esse tempo e espero profundamente que todo esforço valha a pena e que possamos aprender a lidar com todas as pressões e dúvidas com resiliência e sabedoria.

Ao laboratório do Prof. Dr. Sílvio Zanata (laboratório de Neurobiologia – Patologia Básica – UFPR), por ceder o uso de sua ultracentrífuga para a execução deste trabalho.

Finalmente, dirijo agradecimentos a minha família, por me proporcionarem a oportunidade de me dedicar inteiramente aos estudos e me educarem com valores que me acompanham sempre. Obrigada por sempre acreditarem que eu posso mais do que penso e me estimularem a ser uma pessoa melhor nas pequenas ações, com empatia e bondade pelo próximo.

A todos, o meu mais sincero e carinhoso  
obrigada.

“Nature is a language, can't you read?”

Ask - The smiths



## RESUMO

O protozoário *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas, que inicialmente se restringia às Américas, porém tem se disseminado pelo mundo todo, atingindo milhões de indivíduos. O parasito *T. cruzi* é transmitido ao humano pela infecção da região da picada por fezes de insetos triatomíneos após o repasto sanguíneo. *T. cruzi* possui um ciclo biológico complexo onde precisa invadir células mamíferas para completar a infecção. Desta maneira, o parasito necessita evadir o sistema imune inato do hospedeiro. Um dos mecanismos mais eficazes na defesa imune inata contra patógenos é o sistema complemento, que consiste em um conjunto de proteínas que são ativadas em cascata e, que culmina na formação de um poro na membrana do microrganismo, provocando sua lise. Desse modo, para estabelecer a infecção, *T. cruzi* têm desenvolvido vários mecanismos de escape ao ataque do sistema complemento, como por exemplo a expressão de diferentes moléculas e a liberação de vesículas extracelulares, recentemente elucidada. As vesículas extracelulares (VEs) são pequenas vesículas compostas por uma bicamada lipídica, de tamanho, conteúdo e composição de membrana heterogêneos e dinâmicos. A classificação atual diferencia as VEs entre microvesículas e exossomos, conforme seu tamanho e biogênese. Vários grupos têm mostrado a liberação de VEs durante a interação entre o parasito e a célula hospedeira, como por exemplo, as VEs derivadas da interação *T. cruzi* - células monocíticas THP-1 que tem capacidade de inibição do sistema complemento e aumentam a invasão de formas metacíclicas de *T. cruzi* às células hospedeiras. Diante disso, o presente trabalho objetivou investigar as características de resistência à lise mediada pelo complemento e infectividade de parasitos à células eucarióticas selecionados por exposições à altas concentrações de soro normal humano. A população de parasitos selecionados apresentou maior resistência à lise pelo sistema complemento e também maior infectividade à células eucarióticas quando comparado ao parasito selvagem. Foi observado que o fenótipo de resistência se tornou instável e foi perdido ao longo do tempo, porém os parasitos permanecem mais infectivos.

**Palavras-chave:** *Trypanosoma cruzi*; vesículas extracelulares; microvesículas; exossomos; sistema complemento; invasão.

## ABSTRACT

The protozoan *Trypanosoma cruzi* is the etiologic agent of Chagas' disease, initially restricted to the Americas, but has spread throughout the world, reaching millions of individuals. The *T. cruzi* parasite is transmitted to the human by infection of the sting region by feces of triatomine insects after blood repast. *T. cruzi* has a complex biological cycle where it needs to invade mammalian cells to complete the infection. In this way, the parasite needs to evade the innate immune system of the host. One of the most effective mechanisms in innate immune defense against pathogens is the complement system, which consists of a set of proteins that are activated in cascade and which culminates in the formation of a pore in the membrane of the microorganism, causing its lysis. Thus, to establish the infection, *T. cruzi* have developed several mechanisms of escape to the attack of the complement system, as for example the expression of different molecules and the recently elucidated release of extracellular vesicles. Extracellular vesicles (VEs) are small vesicles composed of a lipid bilayer of heterogeneous and dynamic size, content and membrane composition. The current classification differentiates the VEs between microvesicles and exosomes, according to their size and biogenesis. Several groups have shown the release of VEs during the interaction between the parasite and the host cell, for example, the VEs derived from the interaction *T. cruzi* - THP-1 monocytic cells that have the ability to inhibit the complement system and increase the invasion of metacyclic forms of *T. cruzi* to host cells. Therefore, the present work aimed to investigate the behavior of resistance and infectivity of parasites selected by exposures to high concentrations of normal human serum. The population of selected parasites presented greater resistance to lysis by the complement system and also greater infectivity to eukaryotic cells when compared to the wild parasite. It was evaluated that the resistance phenotype became unstable and was lost over time, but the parasites remained more infective.

**Key words:** *Trypanosoma cruzi*, extracellular vesicles, microvesicles, exosomes, complement system, invasion.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Distribuição da doença de Chagas .....	19
FIGURA 2 - Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> .....	23
FIGURA 3 – Mecanismos de infecção de <i>T. cruzi</i> .....	28
FIGURA 4 - Ativação do Sistema Complemento.....	32
FIGURA 5 - Métodos de isolamento e caracterização de VEs.....	38
FIGURA 6 – Fluxo dinâmico de VEs .....	39
FIGURA 7 – Esquema de seleção de parasitos.....	55
FIGURA 8 - Cinética de lise de epimastigotas pelo sistema complemento e ação da Via Alternativa.....	55
FIGURA 9 - Curva de crescimento da epimastigotas e metaciclogênese de G WT e G 2R.....	56
FIGURA 10 - Ensaio de lise pelo complemento e infecção à células VERO de G WT e G 2R.....	57
FIGURA 11 - Lise pelo complemento de metacíclicos G WT e G 2R.....	58
FIGURA 12 – Quantificação de VEs e ensaio de Lise pelo complemento na presença de VEs.....	59
FIGURA 13 - Ensaio de infecção na presença de VEs em Time Lapse.....	31
FIGURA 14 Avaliação da sensibilidade de G WT e G 2R com ativação da via alternativa do sistema complemento.....	62
FIGURA 15 – Avaliação dos parasitos em três condições de carência nutricional durante a metaciclogênese.....	64
FIGURA 16 – Comparação da taxa de infecção de G WT e G 2R.....	66
FIGURA 17 – Western blotting de parasitos G WT e G 2R.....	69

FIGURA 18 – Análise da coexpressão de CD86 e MHC II por CDs estimuladas por VEs..... 70

FIGURA 19 – Dosagem da produção de citocinas estimuladas por VEs.....72

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - SOLUÇÕES UTILIZADAS E SUAS COMPOSIÇÕES .....	45
TABELA 2 - CLASSIFICAÇÃO DAS CEPAS DE <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	46
TABELA 3 – ESTRATÉGIAS DE SELEÇÃO DE PARASITOS RESISTENTES À LISE PELO SISTEMA COMPLEMENTO.....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ca <sup>2+</sup>	- Íon de cálcio
CaCl <sub>2</sub>	- Cloreto de cálcio
CO <sub>2</sub>	- Dióxido de carbono
DEAE	- Dietilaminoetil
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DTT	- do inglês, <i>Dithiothreitol</i>
DTU	- Unidade de Tipagem Discreta (do inglês, <i>Discrete Typing Unit</i> )
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA	- Ácido etileno glicol tetra-acético
EUA	- Estados Unidos de América
KCl	- Cloreto de potássio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	- Fosfato monobásico de potássio
HCl	- Ácido clorídrico
IFN-γ	- Interferon-gama
IL-1β	- Interleucina-1β
IL-6	- Interleucina-6
IL-10	- Interleucina-10
LIT	- Meio de cultivo com Infuso de fígado e triptose (do inglês, <i>Liver Infusion Tryptose</i> )
Mg <sup>2+</sup>	- Íon de magnésio
Na <sub>2</sub> EDTA	- Sal di-sódico de EDTA
NaHCO <sub>3</sub>	- Bicarbonato de sódio
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	- Fosfato de sódio dibásico
NaOH	- Hidróxido de sódio
PBS	- Tampão fosfato-salino (do inglês, <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PCR	- Reação em cadeia da polimerase (do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PMA	- 12-miristato 13-acetato de forbol
RPMI	- do inglês, <i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
TGF-β	- Fator de transformação do crescimento-β (do inglês, <i>Transforming Growth Factor-β</i> )

TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral- $\alpha$  (do inglês, *Tumour Necrosis Factor- $\alpha$* )

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>18</b>
2.1	A DOENÇA DE CHAGAS E O PARASITO <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	18
2.1.1	<i>Evolução clínica e tratamento da doença de Chagas</i> .....	19
2.1.2	<i>Ciclo biológico de Trypanosoma cruzi</i> .....	21
2.1.3	<i>Diversidade genética de Trypanosoma cruzi</i> .....	23
2.2	A INTERAÇÃO ENTRE <i>T. cruzi</i> E O HOSPEDEIRO .....	23
2.2.1	<i>Moléculas de T. cruzi envolvidas na interação parasito-hospedeiro</i> .....	24
2.2.2	<i>O processo de invasão de T. cruzi</i> .....	26
2.3	IMUNIDADE INATA E O SISTEMA COMPLEMENTO .....	28
2.3.1	O sistema complemento .....	29
2.4	O SISTEMA COMPLEMENTO E <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	2
2.5	AS VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	34
2.5.1	<i>Vesículas extracelulares derivadas de Trypanosoma cruzi</i> .....	38
2.5.2	Ativação do Sistema Imune por VEs.....	39
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS (GERAL E ESPECÍFICOS)</b> .....	<b>42</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	42
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>44</b>
4.1	MEIOS DE CULTURA .....	44



4.2	SOLUÇÕES .....	44
4.3	CULTURA DE CÉLULAS.....	45
4.4	DIFERENCIAÇÃO DE EPIMASTIGOTA PARA TRIPOMASTIGOTA METACÍCLICO (METACICLOGÊNESE) .....	45
4.5	PURIFICAÇÃO DAS FORMAS METACÍCLICAS DE <i>Trypanosoma cruzi</i> ...	46
4.6	SORO HUMANO NORMAL .....	46
4.7	INDUÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DA INTERAÇÃO <i>Trypanosoma cruzi</i> E CÉLULAS THP-1.....	46
4.7.1	<i>Determinação da concentração de proteína em VEs.....</i>	47
4.8	LISE MEDIADA PELO COMPLEMENTO .....	41
4.8.1	<i>Ativação das diferentes vias do sistema complemento.....</i>	47
4.8.2	<i>Efeito das VEs na resistência a lise mediada pelo complemento .....</i>	48
4.9	ENSAIO DE INVASÃO À CÉLULAS VERO.....	48
4.9.1	<i>Efeito das VEs na invasão de metacíclicos à células VERO .....</i>	48
4.10	ENSAIO DE WESTERN BLOTTING.....	49
4.10.1	<i>Obtenção de extrato proteico total de metacíclicos de Trypanosoma cruzi .</i>	49
4.10.2	<i>Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....</i>	49
4.10.3	<i>Western blot.....</i>	50
4.11	EFEITO DE VES NA INTERAÇÃO COM CÉLULAS DENDRÍTICAS .....	50
4.12	DOSAGEM DE CITOCINAS.....	51
4.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>52</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>74</b>

<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>81</b>
<b>8</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>82</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>83</b>
	<b>ANEXO A .....</b>	<b>99</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Doença de Chagas é considerada pela Organização Mundial da Saúde como uma doença tropical negligenciada e representa um dos maiores problemas de saúde pública, principalmente na América Latina (WHO, 2017). Esta doença é causada pelo parasito protozoário *Trypanosoma cruzi*, que possui um ciclo de vida complexo entre o hospedeiro vertebrado (mamífero) e um hospedeiro invertebrado (inseto triatomíneo), sofrendo alterações morfológicas e bioquímicas no processo. O ciclo inicia-se com a infecção do triatomíneo pelo parasito quando pela ingestão de formas tripomastigotas durante o repasto sanguíneo em hospedeiros mamíferos. No tubo digestivo do inseto, o parasito divide-se sob a forma epimastigota e se diferencia em tripomastigotas metacíclicas na ampola retal (GARCIA, 1999). O hospedeiro mamífero é então exposto ao parasito através da deposição de fezes após o repasto sanguíneo do triatomíneo infectado. A forma tripomastigota metacíclica penetra o hospedeiro por regiões descontínuas do epitélio derivadas de intenso prurido no local da picada ou através de membranas mucosas. No hospedeiro vertebrado, o ciclo do parasito envolve fenômenos de reconhecimento, adesão e interiorização em células do sítio de infecção (BRENER 1973; TEXEIRA, 1987), como macrófagos, células epiteliais e fibroblastos (SOUZA et al., 2010). Dentro das células infectadas, o parasito se diferencia a forma amastigota, forma replicativa intracelular, e ocorre posterior diferenciação em tripomastigotas sanguíneas, que são liberadas ao meio extracelular, quando a célula é rompida, podendo infectar demais células (NOGUEIRA et al., 2015, TYLER et al, 2001).

Durante os primeiros momentos da infecção, um dos mecanismos mais efetivos do sistema imune inato para a eliminação do parasito é o sistema do complemento, um conjunto de proteínas celulares e solúveis no soro que, devido à algum estímulo, são ativadas em cascata e resultam na formação de um poro na membrana de patógenos, levando à sua lise (CESTARI et al., 2013; DUNKELBERGER; SONG, 2009; EVANS-OSES et al., 2013; MERLE et al., 2015a, 2015b; WALPORT, 2001;).

O sistema complemento pode ser ativado por meio de três vias: a via clássica, das lectinas e a alternativa. A ativação de cada via culmina na formação de C3 convertase, que é o complexo proteico chave para a conclusão da ação do sistema complemento, pois a partir dele há o desencadeamento de uma série de clivagens e ativações de que levam a formação do complexo de ataque a membrana do patógeno. Além desse efeito, o processamento de proteínas do sistema complemento também gera moléculas de ação anafilatóxica e quimiotática para células de defesa, mediando a resposta inflamatória (JANEWAY et al, 2011; WALPORT, 2001).

Devido ao seu ciclo de vida parasitária intracelular obrigatória, *T. cruzi* tem desenvolvido vários mecanismos para evasão do sistema imunológico do hospedeiro, como a expressão de moléculas que conferem resistência à lise mediada pelo complemento (CESTARI et al, 2013). Outra possível estratégia de evasão do sistema imune utilizada por *T. cruzi* se dá mediante a liberação de vesículas extracelulares (VEs), entre elas principalmente microvesículas. As VEs são pequenas vesículas compostas por uma bicamada lipídica, de tamanho, conteúdo e composição de membrana heterogêneos e dinâmicos. Tem sido descrito recentemente a liberação de vesículas extracelulares durante a interação entre o parasito e células hospedeiras (BAYER- SANTOS et al, 2013 e 2014; CESTARI et al., 2012; LAI et al., 2014; MARCILLA, 2014; MANTEL, 2014;). Assim, este trabalho objetivo estudar as características de resistência à lise mediada pelo complemento e infectividade de parasitos selecionados por exposições à altas concentrações de soro normal humano durante curto período de tempo.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A DOENÇA DE CHAGAS E O PARASITO *Trypanosoma cruzi*

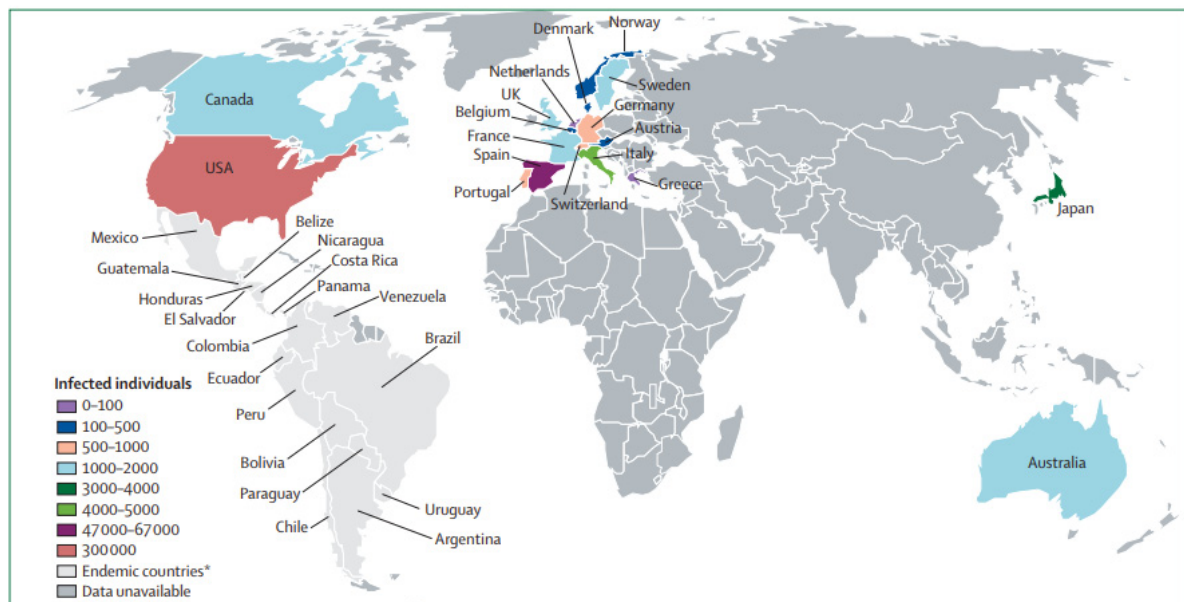
A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é uma infecção parasitária causada por *T. cruzi*, um protozoário hemoflagelado intracelular obrigatório da ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. A doença de Chagas foi descrita pela primeira vez em 1909, pelo médico e cientista brasileiro Carlos Chagas (CHAGAS, 1909).

Apesar de sua descoberta há mais de um século, a doença de Chagas é considerada endêmica em 21 países da América Latina. Segundo a OMS, e em comum com outras doenças tropicais negligenciadas, a doença de Chagas está relacionada a áreas de pobreza e desvantagem social: afeta populações com baixa visibilidade e pouca voz política, causa estigma e discriminação, e tem considerável impacto na morbidade e mortalidade (World Health Organization, WHO, 2010). Nas últimas décadas, principalmente devido ao fluxo migratório, a doença de Chagas tem sido cada vez mais detectada em outras áreas do globo, como Estados Unidos da América, Canadá, Europa, Austrália e Japão (BONNEY, 2014; WHO, 2016) (Fig. 1). Atualmente, esta doença acomete mais de 7 milhões de pessoas em todo o mundo (WHO, 2016). Além disso, estima-se que cerca de 65 milhões de pessoas nas Américas se encontram em áreas suscetíveis a infecção. Calcula-se que há cerca de 28.000 novos casos anuais e 12.000 mortes em todas as regiões endêmicas (Organização Panamericana de Saúde, PAHO, 2014). No Brasil, estima-se que a prevalência varia entre 1,0 a 2,4% da população, o equivalente a 1,9 a 4,6 milhões de pessoas infectadas por *T. cruzi*. Reflexo disso é a elevada carga de mortalidade por Doença de Chagas no país, representando uma das quatro maiores causas de mortes por doenças infecciosas e parasitárias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

O modo de transmissão natural da doença é vetorial, sendo os hospedeiros invertebrados os insetos-vetor hematófagos da família Reduviidae (subfamília Triatominae), popularmente conhecidos como “barbeiros”. *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* configuram entre os vetores mais

importantes da doença (RASSI *et al.*, 2010). Ainda existem outras formas de infecção: oral (ingestão de alimentos contaminados com parasitos provenientes de triatomíneos infectados), vertical (pela passagem de parasitos de mulheres infectadas para seus bebês durante a gravidez ou o parto), transfusão de sangue ou transplante de órgãos de doadores infectados a receptores saudáveis, ou acidental (pelo contato da pele ferida ou de mucosas com material contaminado durante manipulação em laboratório ou na manipulação de caça (COURA, 2015).

Figura 1. Distribuição da doença de Chagas e rota de migração da América do Sul para regiões não endêmicas do globo (em número total de indivíduos infectados)



Fonte: Rassi et al. (2010)

### 2.1.1 Evolução clínica e tratamento da doença de Chagas

O curso clínico da doença de Chagas geralmente compreende uma fase aguda e uma fase crônica. A fase aguda pode ser sintomática ou assintomática (de acordo com o estado imunológico do hospedeiro). Os sinais clínicos da fase aguda, quando aparente (isto é, no caso de 10-30% dos pacientes), são febre, dores

musculares e reação inflamatória no local da picada do inseto (chagoma) (RASSI *et al.*, 2010; BONNEY, 2014; WHO, 2016). A mortalidade na fase aguda pode chegar a até 10% dos indivíduos sintomáticos (RASSI *et al.*, 2010; BONNEY, 2014). Outra característica dessa fase, é que devido ao alto grau de multiplicação dos parasitos, a parasitemia chega a ser suficientemente alta que as formas sanguíneas do parasito podem ser facilmente detectadas no sangue através do exame microscópico do mesmo (BONNEY, 2014). A fase aguda se resolve espontaneamente e os pacientes permanecem infectados cronicamente, caso não tratados. A maioria dos pacientes não desenvolvem sinal patológico algum (apesar de serem soropositivos para *T. cruzi*) o que é chamado de forma indeterminada da doença de Chagas.

Cerca de 30-40% dos pacientes infectados cronicamente podem desenvolver um envolvimento de órgãos (principalmente cardiomiopatia ou megavisceras [megacólon ou megaesôfago]) cerca de 10-30 anos após a infecção aguda. Na fase crônica a parasitemia é baixa ou intermitente, o que dificulta o diagnóstico, recaindo em testes sorológicos (RASSI *et al.*, 2010; BONNEY, 2014; WHO, 2016; PÉREZ-MOLINA E MOLINA, 2018).

O controle do inseto vetor, a triagem das amostras de sangue antes de transfusões e transplantes e o tratamento dos pacientes infectados são as ferramentas atualmente disponíveis para controle da doença de Chagas. O tratamento com as drogas licenciadas até o momento (Benzonidazol e Nifurtimox) é recomendada para pacientes em fase aguda e congênita, infecções reativadas ou pacientes jovens (menores de 18 anos) apresentando a fase crônica da doença. Já para a fase crônica, o benefício do tratamento com essas drogas ainda é discutido por ter menor eficácia (PAES *et al.*, 2011; BERMUDEZ *et al.*, 2016; PINHEIRO *et al.*, 2017; PÉREZ-MOLINA E MOLINA, 2018). Além disso, o tratamento provoca efeitos colaterais indesejáveis como reações alérgicas, vômitos e náuseas, e existe uma sensibilidade variável a essas drogas dentre as diferentes cepas de *T. cruzi* (BERMUDEZ *et al.*, 2016). Devido ao alto custo do tratamento e o grande número de pacientes que morrem em idade produtiva, o impacto econômico causado pela doença é grande (STANAWAY; ROTH, 2015). Existe atualmente a necessidade de estudo de novas abordagens terapêuticas e maior entendimento da patogenia da doença.

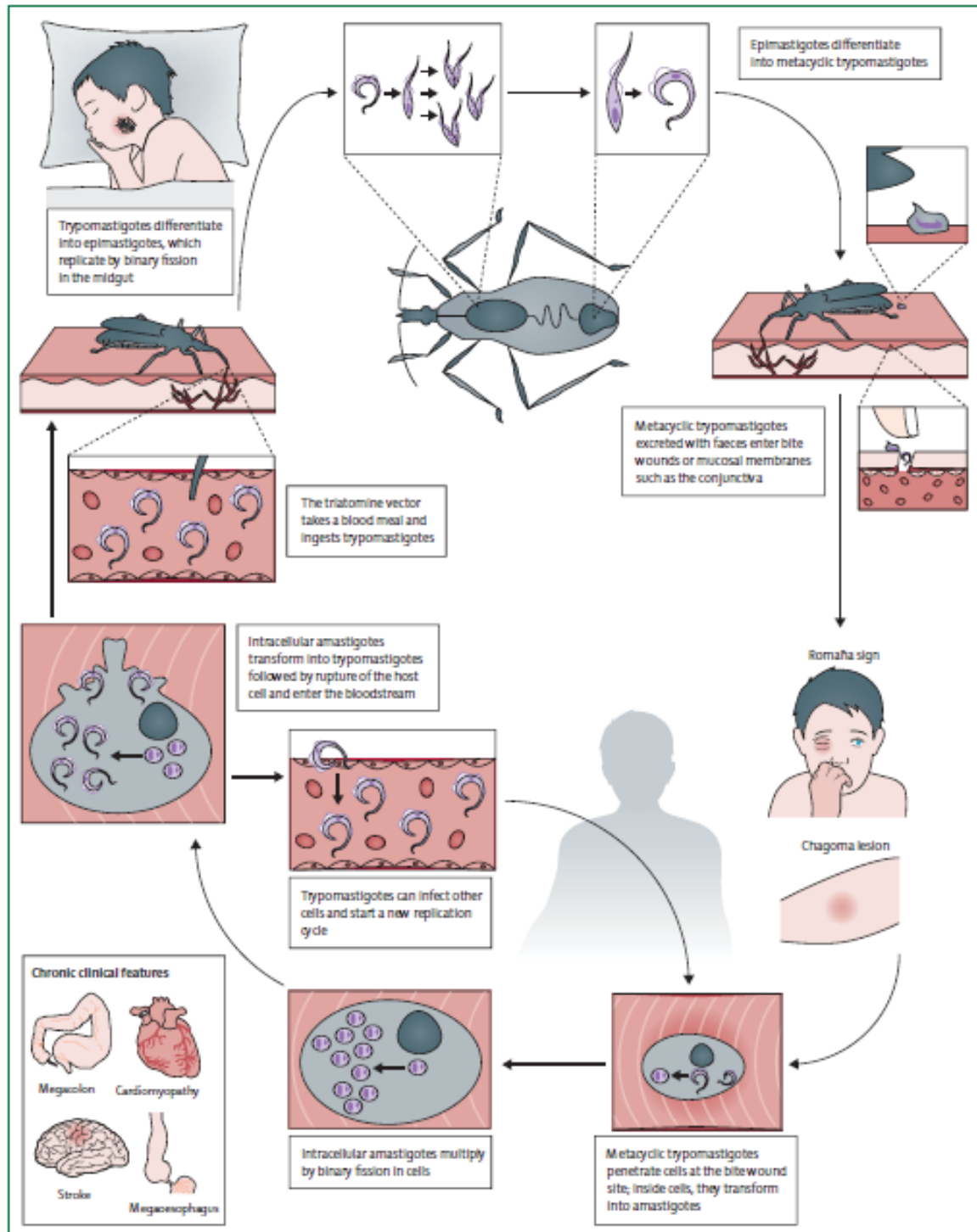
### 2.1.2 *Ciclo biológico de Trypanosoma cruzi*

Ao longo de seu ciclo biológico heteroxênico, *T. cruzi* apresenta três formas evolutivas que alternam entre hospedeiros invertebrados (o inseto-vetor) e hospedeiros vertebrados (marsupiais e mamíferos placentários, inclusive o homem): amastigota, epimastigota e tripomastigota (metacíclico ou sanguínea). Os tripomastigotas metacíclicos são liberados nas fezes ou urina do vetor triatomíneos após o repasto sanguíneo e infectam o hospedeiro mamífero pela membrana mucosa ou pelas regiões de descontinuidade no epitélio (comumente lesão cutânea devido ao prurido intenso no local da picada) (PAES *et al.*, 2011). Uma vez dentro do hospedeiro, o parasito invade rapidamente uma grande variedade de células nucleadas de mamíferos. Porém, já foi demonstrado que *T. cruzi* é capaz de invadir células enucleadas (células que possuem o núcleo removido experimentalmente) (COIMBRA *et al.*, 2007).

Quando o parasito invade células mamíferas, ocorre a formação de um compartimento endocítico, o vacúolo parasitóforo. Há acidificação do meio (pelos lisossomos), o que ativa mecanismos parasitários como a liberação de hemolisina levando à ruptura do vacúolo e subsequentemente à fuga do parasito ao citoplasma (ANDREWS *et al.*, 1990; ALBERTTI *et al.*, 2010). No citoplasma, os tripomastigotas metacíclicos se diferenciam para a forma amastigota. As amastigotas se multiplicam por divisão binária e se diferenciam em tripomastigotas sanguíneos.

Com o rompimento das células hospedeiras infectadas, ocorre a liberação de amastigotas e tripomastigotas sanguíneos, que podem invadir novas células ou entrar na corrente sanguínea. Durante a hematofagia do inseto vetor, ambas formas podem ser ingeridas porém somente os tripomastigotas sanguíneos se diferenciam na forma replicativa extracelular denominada epimastigotas no intestino do inseto. Os epimastigotas se replicam e se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas que vão reiniciar o ciclo (TYLER, 2001).



FIGURA 2 – CICLO DE VIDA DE *Trypanosoma cruzi*

Fonte: Pérez-Molina and Molina et al. (2018)

### 2.1.3 *Diversidade genética de Trypanosoma cruzi*

Desde os relatos iniciais por Chagas (1909), a variabilidade de *T. cruzi* já era descrita. Ao longo dos anos, houve um progresso no conhecimento sobre a diversidade genética desta espécie e hoje sabe-se que existe uma grande diversidade fenotípica e genética intraespecífica em *T. cruzi*. Os primeiros trabalhos relacionados ao assunto mostram que o conteúdo de DNA, tanto nuclear quanto do cinetoplasto, varia em aproximadamente 40% entre diferentes cepas. A grande diversidade genética em tripanosomatídeos pode se dar devido a sua alta plasticidade genética: a capacidade de expansão e contração de sequências específicas, eventos de fusão ou fissão cromossomal ou hibridização (DUJARDIN, et al., 2000; LEWIS et al., 2009; MESSENGER, MILES, 2015). Hoje sabe-se que a espécie *T. cruzi* é composta de várias subpopulações, que apresentam cepas que circulam em hospedeiros mamíferos domésticos e selvagens, e insetos vetores (ZINGALES et al., 2009). O parasito exibe um alto grau de variabilidade genética como foi revelado através de diferentes análises incluindo: perfis eletroforéticos de isoenzimas (MILES et al., 1977), polimorfismo de DNA (STEINDEL et al., 1993) e variabilidade de sequências de RNA ribossomal (SOUTO e ZINGALES, 1993).

O consenso para classificação e nomenclatura intraespecífica de *T. cruzi* foi proposta em 2009, admitindo-se a classificação entre seis linhagens genéticas ou Discrete Typing Units (DTUs), chamadas de TcI a TcVI, baseando-se nos padrões genéticos, bioquímicos ou marcadores biológicos (ZINGALES et al., 2009; ZINGALES et al., 2012). Existe ainda um sétimo DTU restrito aos morcegos (Tcbat) (Marcili, et al, 2009). Apesar das classificações em diferentes DTUs, ainda não é possível correlacionar completamente uma DTU a um padrão de manifestações clínicas ou a certos limites geográficos, o que torna complexo o estudo da espécie. Há um consenso de que as DTUs TcI e TcII são linhagens puras e que TcV e TcVI tem origem híbrida a partir de TcII e TcIII como linhagens parentais, porém, a origem e evolução de TcIII e TcIV ainda permanece em discussão (ZINGALES, 2017).

## 2.2. A INTERAÇÃO ENTRE *T. cruzi* E O HOSPEDEIRO

### 2.2.1. Moléculas de *T. cruzi* envolvidas na interação parasito-hospedeiro

Os estágios evolutivos de *T. cruzi* alternam entre as formas não infectivas e infectivas. Epimastigotas são formas não infectivas, mas replicativas, que estão no inseto vetor. Já as amastigotas são as formas que se replicam no interior de células mamíferas, e já foi demonstrado que elas podem ser infectivas (LEY et al., 1988; MORTARA et al., 1991). Já os tripomastigotas são infectivos mas não replicativos, e ainda podem ser diferenciados em dois estágios: tripomastigotas metacíclicos e tripomastigotas sanguíneos. Durante o ciclo de vida de *T. cruzi*, o parasito sofre diversas transformações morfológicas e na composição de sua membrana plasmática, apresentando moléculas importantes para interação entre o parasito e o hospedeiro (ATWOOD et al., 2005; PECH-CANUL, 2017). Algumas moléculas que participam na interação do parasito com células do hospedeiro são expressas tanto em tripomastigotas metacíclicos quanto em tripomastigotas derivados de cultura. É o exemplo da cruzipaina (MURTA et al., 1990; PAIVA et al., 1998) e de trans-sialidases (CIAVAGLIA et al., 1993; MING et al., 1993; SCHENKMAN et al., 1993). No entanto, são descritas algumas moléculas estágio específicas envolvidas no processo de invasão celular dos parasitos.

As moléculas gp35/50, gp82 e gp90 são utilizadas na interação dos metacíclicos com células hospedeiras e desencadeiam cascatas de sinalização bidirecional. A eficácia da infecção das células por metacíclicos depende principalmente de quais moléculas de superfícies são predominantemente empregadas na interação. Por exemplo, metacíclicos de cepas altamente invasivas, como a CL, utilizam gp82 para aderir e invadir células, molécula capaz de eficientemente disparar sinalização de  $Ca^{+2}$  em ambas células (RAMIREZ et al., 1993), enquanto os parasitos da cepa G (pouco invasiva) utilizam majoritariamente as moléculas gp35/50, menos eficientes na indução de sinais de  $Ca^{+2}$  (YOSHIDA et al., 1989; DORTA et al., 1995). Quando a molécula empregada na interação é a gp90, a taxa de infecção é reduzida, pois gp90 atua como um regulador negativo da invasão celular, não levando a sinalização de  $Ca^{+2}$  intracelular (MÁLAGA e YOSHIDA, 2001).

Na interação de tripomastigotas derivados de cultura com células mamíferas, as principais moléculas atuantes são Tc-85, mucinas e trans-sialidases. Entre os

membros da família Tc-85, o melhor caracterizado é a molécula que reconhece laminina e citoqueratina 18 de células hospedeiras. Outra molécula de tripomastigota derivado de cultura com afinidade para componentes da matriz extracelular é a penetrina, que reconhece heparina, heparan sulfato e colágeno (ORTEGA-BARRIA e PEREIRA, 1991).

As mucinas são glicoproteínas ancoradas com GPI (glicosilfosfatidilinositol) que contém uma ampla variedade de O-linked oligossacarídeos. A expressão sincronizada de um amplo repertório de mucinas contendo regiões variáveis nos estágios do parasito que estão no hospedeiro mamífero sugerem que as mucinas funcionem como artifícios para evadir à resposta imune, atuando na proteção do parasito e facilitando a invasão às células (SALAZAR et al., 1996; FREITAS et al., 1998; BUSCAGLIA et al., 2006; PEREIRA-CHIOCCOLA et al., 2000; SCHENKMAN et al., 1993). As mucinas de *T. cruzi* (TcMUC) são diversas e são codificadas por uma família complexa de genes semelhantes a mucinas, então classificados conforme eles se repetem ou não em TcMUC I e TcMUCII, respectivamente. Uma característica dos genes TcMUC II é que vários deles estão ligados no genoma a genes de trans-sialidases (TS), proteínas envolvidas no processo de invasão de células hospedeiras. A análise do genoma revelou que outra família gênica ligada aos genes TcMUC II é a de MASPs (proteínas de superfície associadas à mucina), que apresentam similaridade estrutural às proteínas TcMUC II e serão descritas adiante (SALAZAR et al., 1996; ALMEIDA et al., 1999; DI NOIA et al., 1998; VILLALTA et al., 2008).

As trans-sialidases (TS) e as moléculas TS-like desempenham uma função diretamente relacionada com as mucinas e pertencem a família GP85-trans-sialidase. Em *T. cruzi*, as TS suprem a falta de síntese *de novo* de ácido siálico, transferindo ácido siálico de glicoconjugados do hospedeiro para a membrana do parasito (SCHENKMAN et al., 1991). A sialilação de moléculas na superfície do parasito é crucial para a viabilidade e resistência do parasito ao sistema imune (PEREIRA-CHIOCCOLA et al., 2000), sendo que o principal acceptor de ácido siálico em *T. cruzi* são as mucinas. Além do seu papel no resgate de ácido siálico para proteção do parasito, as TS, ancoradas na membrana do parasita ou lançadas na corrente sanguínea, podem se ligar aos receptores de células de mamíferos para mediar a ligação e invasão dos parasitos às células (DE PABLOS e OSUNA, 2012).

As MASPs constituem outra família de proteínas de superfície de *T. cruzi* ancoradas com GPI. Esta família é altamente polimórfica e está ligada a proteção do parasito contra a ação do sistema imune do hospedeiro (EL-SAYED *et al.*, 2005; BARTHOLOMEU *et al.*, 2009; DE PABLOS e OSUNA, 2012).

### 2.2.2. O processo de invasão de *T. cruzi*

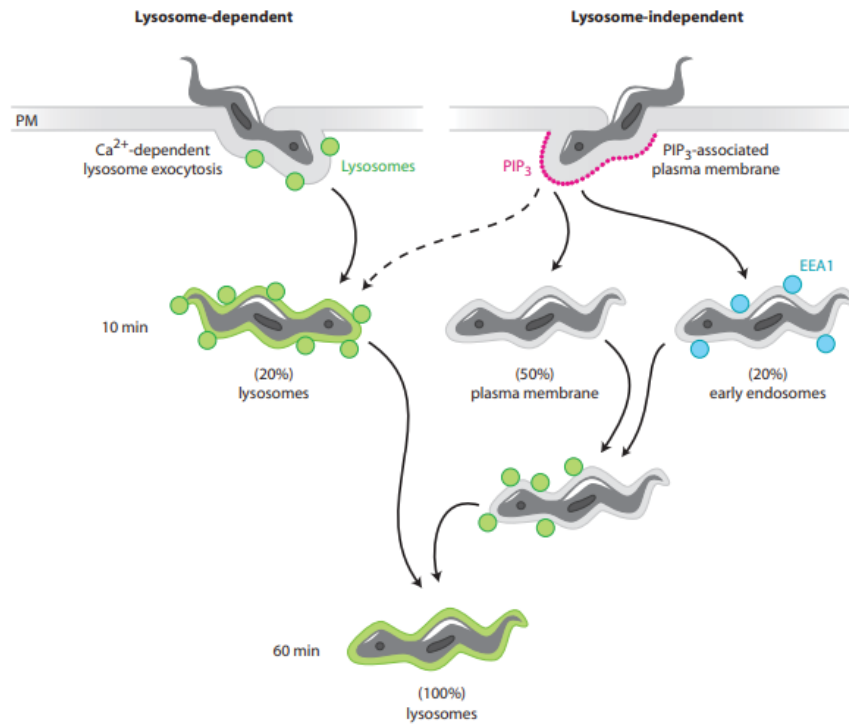
O *T. cruzi* é o único parasita entre os Trityps, três tripanossomos relacionados (*T. cruzi*, *T. brucei* e *Leishmania* sp.), que podem invadir ativamente quaisquer células hospedeiras nucleadas (BURLEIGH E ANDREWS, 1995; ALVES E COLLI 2007; YOSHIDA E CORTEZ 2008), já que *T. brucei* reside extracelularmente na corrente sanguínea e *L. major* é passivamente fagocitada por macrófagos. O processo de invasão de células hospedeiras pode ser estudada *in vitro* utilizando células fagocíticas não-profissionais, uma vez que a doença de Chagas crônica é caracterizada pela persistência de parasitas em tecidos. Em 1992 foi descrito que *T. cruzi* explora o recrutamento de lisossomos do hospedeiro para invasão de células eucarióticas (TARDIEUX, WEBSTER *et al.* 1992). A invasão tripomastigota de *T. cruzi* parece ser um processo ativo, uma vez que não foi encontrada evidência de polimerização de actina ou a formação de uma taça fagocitária ao redor do tripomastigota invasor. Além disso, o parasito foi capaz de invadir as células mesmo na presença de citocalasina D, um inibidor da polimerização por actina e da fagocitose (SCHENKMAN, 1998; SCHENKMAN *et al.* 1991; TARDIEUX, WEBSTER *et al.* 1992). Usando anticorpos que reconhecem a glicoproteína da membrana lisossomal (Lamp1), foi demonstrado que os lisossomos do hospedeiro são recrutados para o local de invasão do parasito (TARDIEUX, WEBSTER *et al.* 1992). A invasão do *T. cruzi* também foi significativamente reduzida após o tratamento com as drogas, colchicina e vinblastina, que interrompem a formação de microtúbulos (RODRIGUEZ, SAMOFF *et al.* 1996), presumivelmente pela inibição do recrutamento de lisossomos do hospedeiro à membrana plasmática onde os tripomastigotas penetram (TYLER *et al.*, 2005). Sugere-se também que os autofagossomos do hospedeiro podem substituir o papel dos lisossomos na invasão do parasito (ROMANO, ARBOIT *et al.* 2009).

Foi visto que, durante a interação com a célula mamífera, os tripomastigotas de *T. cruzi* desencadeiam um aumento transitório do cálcio intracelular, levando à

subsequente exocitose lisossomal dependente de cálcio (TARDIEUX, NATHANSON et al. 1994). Além disso, a depleção de cálcio reduziu o recrutamento do lisossomo hospedeiro para a membrana plasmática e, portanto, a taxa de invasão do *T. cruzi*, mostrando que o cálcio possuía importante atuação no cenário de infecção (TARDIEUX, NATHANSON et al. 1994). Posteriormente, outros ensaios mostraram que os parasitos foram capazes de invadir células tratadas com Wortmannina, um inibidor de fosfoinositide 3-quinases (PI3Ks), que bloqueava a via dependente de lisossomos, apontando para a existência de outro mecanismo de invasão (WOOLSEY, SUNWOO et al. 2003) que seria independente de lisossomos. O *T. cruzi* também pode invadir as células hospedeiras ao ser englobado pela membrana plasmática invaginada e posteriormente fundindo-se com os lisossomos. Esta via parece ser independente da actina da célula hospedeira, outra característica que a diferencia da fagocitose tradicional (WOOLSEY, SUNWOO et al. 2003). Curiosamente, outro trabalho mostrou que o parasito reside em vacúolos parasitóforos derivados de lisossomos, independentemente dos mecanismos de invasão da célula hospedeira (ANDRADE e ANDREWS, 2004). Observou-se então que a fusão do lisossomo hospedeiro seria necessária para a infecção viável de tripomastigotas de *T. cruzi*. O pH ácido do vacúolo parasitóforo parece favorecer a secreção de TcTox pelo parasito, uma hemolisina que forma um poro na membrana vacuolar (ANDREWS 1990; ANDREWS, ABRAMS et al. 1990). Ao romper o vacúolo parasitóforo, os amastigotas intracelulares se dividem várias vezes até se rediferenciarem para tripomastigotas.

Além do tripomastigota como forma infectiva, foi visto também que as amastigotas podem ser infecciosas às células, com observações de que amastigotas poderiam ser “englobados” por monócitos e por células fagocíticas não profissionais, onde poderá se replicar no citoplasma (LEY, ANDREWS et al. 1988; MORTARA et al., 2008).

Figura 3. Mecanismos propostos para infecção de *T. cruzi* à células eucarióticas.



Fonte: Burleigh (2005)

### 2.3. IMUNIDADE INATA E O SISTEMA COMPLEMENTO

Uma vez dentro do hospedeiro, *T. cruzi* necessita evadir a resposta imune inata do hospedeiro mamífero e rapidamente invadir as células para progredir na infecção. Do mesmo modo, a liberação de tripomastigotas pelas células infectadas coloca os parasitos em situação crítica como alvo do sistema imune.

Durante os momentos iniciais da infecção, os mecanismos do sistema imune mais relevantes contra os parasitos seriam a imunidade inata humoral (sistema complemento) e a celular (células *natural killer* e macrófagos, por exemplo). Ao detectar a presença de patógenos, estas células liberam citocinas para ativação da resposta imune adaptativa (CARRERA-SILVA *et al.*, 2011). As citocinas desencadeiam diferentes respostas conforme são ativadas na presença do patógeno, sendo que as principais citocinas envolvidas na infecção por *T. cruzi* são



IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, TGF- $\beta$  e MCP-1/CCL2 (ROMAN-CAMPOS *et al.*, 2009; ABRAHAMSOHN, 1998).

### 2.3.1 O sistema complemento

O sistema complemento é o principal mecanismo de defesa inata humoral dos vertebrados contra microorganismos invasores (MAYILYAN *et al.*, 2008). O sistema complemento de mamíferos consiste em um conjunto de proteínas solúveis (produzidas principalmente no fígado) e proteínas da membrana plasmática (geralmente atuam como receptores e reguladores). As proteínas do sistema complemento se encontram majoritariamente em sua forma inativa e são ativadas em cascata na presença de um estímulo, resultando na formação de um poro na membrana de patógenos, provocando sua lise (JANEWAY *et al.*, 2001).

O sistema complemento pode ser ativado por meio de três vias (FIGURA 4) (WALPORT, 2001; NESARGIKAR *et al.*, 2012; CESTARI *et al.*, 2013; EVANS-OSSSES *et al.*, 2013; MERLE *et al.*, 2015a, 2015b).

a. A via clássica: é iniciada quando complexos imunes são formados após a ligação de IgG ou IgM à superfície de patógenos ou a outros antígenos. O complexo C1, um complexo multimérico consistindo de moléculas C1q, C1r e C1s, liga-se então à porção Fc do complexo imune IgG ou IgM. A ativação de C1s e C1r ocorre como consequência da ligação de C1q à porção Fc exposta de IgG ou IgM. C1s então cliva C4 e C2 para formar a C3 convertase, C4bC2a. Além de reconhecer porções Fc de IgG e IgM, a molécula C1q também é capaz de reconhecer mais de 100 outras moléculas, incluindo padrões moleculares associados a patógenos, como lipopolissacarídeos; Assim, diz-se que a via clássica pode ser ativada de uma maneira independente do complexo antígeno-anticorpo (MERLE *et al.*, 2015a).

b. A via das lectinas: é ativada quando lectinas ligadoras de manose (MBL) ou ficolinas se ligam a porções de carboidratos nas superfícies de agentes patogênicos. Tanto MBLs como Ficolinas circulam no soro associadas à serino-proteases MASP<sub>s</sub> (*MBL-Associated Serine Proteases*) por um processo dependente de Ca<sup>2+</sup>. As lectinas possuem uma afinidade para glicoses, manoses e N-acetil-glucosaminas, enquanto que ficolinas ligam-se aos resíduos de galactoses e N-acetil-glucosaminas. A ligação de MBLs ou Ficolinas aos carboidratos de patógenos induz alterações

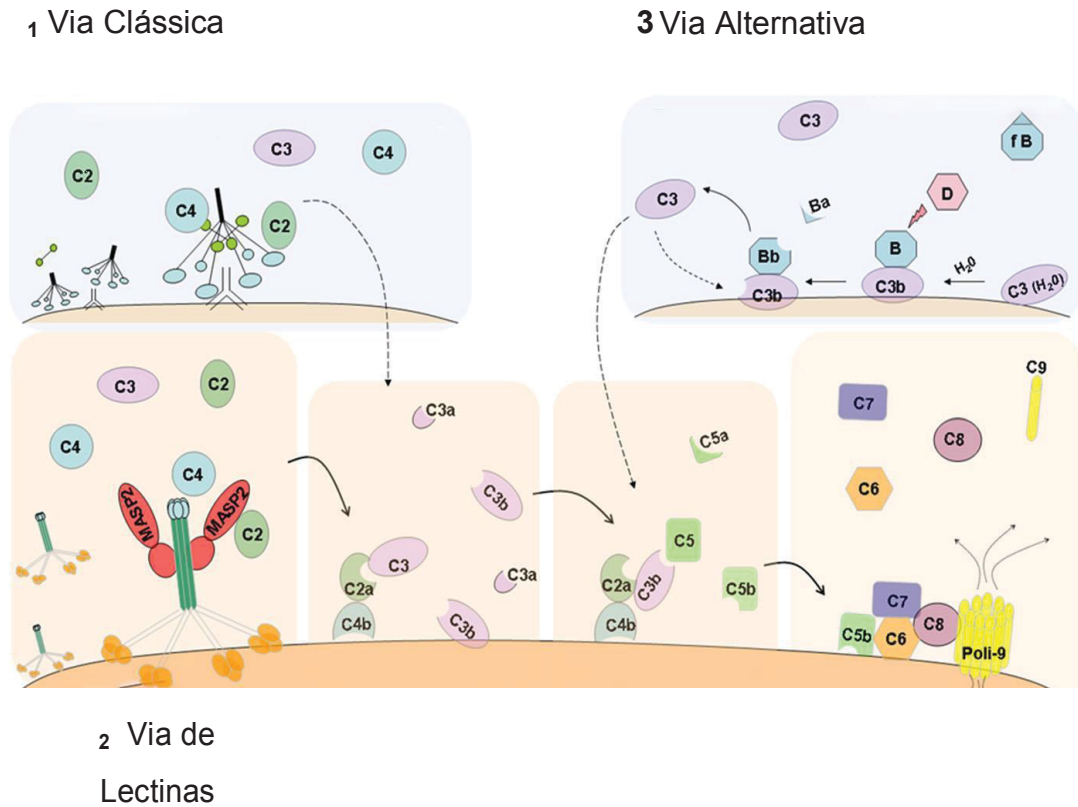


conformacionais neste complexo, resultando na auto-ativação de MASPs, que clivam C4 para formar C4a e C4b. C4b liga-se à superfície dos patógenos que induzem C2 a se ligar, que por sua vez é clivado por MASP2 para formar C2b e C2a. C4b juntamente com o C2a ligado tem atividade enzimática e forma a C3 convertase da via das lectinas, a C4bC2a.

c. A via alternativa, que é desencadeada por carboidratos, lipídios e proteínas encontrados em superfícies estranhas e não próprias. C3 é constantemente hidrolisado em um nível baixo para formar C3b, que se liga a superfícies não próprias. O fator B é então recrutado para o C3b ligado, um processo dependente de  $Mg^{2+}$ , seguido pelo Fator D que cliva o Fator B para formar o C3bBb (a C3 convertase da Via Alternativa). Esta C3 convertase é estabilizada pela properdina plasmática, uma proteína liberada por células imune ativadas. Moléculas de C3b provenientes das outras vias também podem ativar a via alternativa.

A ativação de todas as vias converge para a formação de C3 convertase. A C3 convertase primeiramente gera C3b, que se une para formação da C5 convertase (C4b2a3b ou C3bBb3b). A C5 convertase cliva C5 em C5a e C5b. O fragmento C5b se insere na membrana formando uma âncora junto aos componentes C6, C7 e C8. Essa âncora permite a formação de um poro na membrana formado por um conjunto de componentes C9 (poli-9). Este poro permite a passagem de água e íons livremente resultando no desequilíbrio osmótico e ruptura das células (WALPORT, 2001; CESTARI *et al.*, 2013; EVANS-OSES *et al.*, 2013; MERLE *et al.*, 2015a, 2015b).

Figura 4 – Ativação do sistema complemento



Fonte: Adaptado de CESTARI *et al.* (2013).

Durante a cascata de clivagens proteicas do complemento, ocorre a geração de C3a e C5a, que atuam como anafilatoxinas e na quimiotaxia de células imunes, mediando a resposta inflamatória e imune.

Em condições fisiológicas normais, o sistema complemento precisa ser controlado para que não haja resposta contra moléculas próprias. Para evitar que as moléculas de C3b provenientes da hidrólise espontânea de C3 se depositem em células saudáveis, existe uma série de proteínas reguladoras do complemento. Assim, células apoptóticas ou que possuam alterações na membrana não possuem tais reguladores e, portanto, são eliminadas (MERLE *et al.*, 2015a, 2015b). As proteínas reguladoras desempenham importante papel no controle da ativação do sistema complemento, e por isso, a sua desregulação pode levar ao desenvolvimento de várias patologias (LAMBRIS *et al.*, 2008).

#### 2.4. O SISTEMA COMPLEMENTO E *Trypanosoma cruzi*

Evitar o ataque do sistema imunológico é um fator determinante para a sobrevivência de patógenos em seus hospedeiros. Para a coexistência e coevolução de humanos e microorganismos, foi necessário que eles tenham produzido uma série de mecanismos para atenuar ou escapar desses ataques. Como uma primeira linha de defesa contra intrusos patogênicos e um mediador entre as respostas imunes inatas e adaptativas, o sistema do complemento é um dos focos dessas estratégias de evasão (LAMBRIS, 2008). Ao contrário do que se tem como um “paradigma” científico, já foi mostrado que o sistema complemento é capaz de matar formas tripomastigotas de *T. cruzi* e que existe uma grande variação no grau de suscetibilidade ou resistência entre diferentes cepas de *T. cruzi* (CESTARI; RAMÍREZ 2010). Estudos experimentais mostraram que o complemento pode ser ativado por formas amastigotas (IIDA et al., 1989), epimastigotas (NOGUEIRA et al., 1975) e tripomastigotas (KIPNIS et al., 1985). Os primeiros trabalhos de ativação das vias do complemento com *T. cruzi* mostraram que a forma epimastigota é lisada por meio da via alternativa (NOGUEIRA et al., 1975; JACOBSON et al., 1992) e soro não imune (soro normal) é capaz de lisar tanto epimastigotas quanto tripomastigotas metacíclicos (SCHENKMAN et al., 1986; YOSHIDA e ARAGUTH, 1987).

Como nos momentos iniciais da infecção ainda não há a produção de anticorpos contra *T. cruzi*, as principais vias do complemento ativas são a via alternativa e a via das lectinas, contudo, as três vias são capazes de lisar o parasito. Foi demonstrado que as MBL e ficolinas são capazes de se ligar à superfície dos epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos, fornecendo evidências de que a via das lectinas é ativada no soro não imune na presença de *T. cruzi*. Uma ampla gama de carboidratos (como GalNAc e GlcNAc) ancorados por glicosilfosfatidilinositol na membrana plasmática de *T. cruzi* pode ser reconhecida pelas moléculas de sensor de PAMP, como as MBLs e ficolinas (CESTARI et al., 2009; CESTARI; RAMIREZ, 2010) levando à ativação das MASPs. Foi observada que esta via é responsável por quase 70% da lise parasitária mediada pelo complemento durante a infecção e que a via alternativa é ativada por uma baixa taxa de conversão espontânea de C3 a C3b

ou por C3b gerada a partir das outras vias do complemento (CESTARI *et al.*, 2009; CESTARI; RAMIREZ, 2010).

Almeida e colaboradores (1991 e 1994) observaram que o soro de pacientes com doença de Chagas em estágio crônico tinham um nível elevado de anticorpos anti- $\alpha$ -galactosil, um anticorpo presente em estado fisiológico também (representa ~1% das imunoglobulinas IgG). Esses anticorpos reconhecem epítomos  $\alpha$ -galactosil, que são abundantes em glicolipídeos e glicoproteínas na superfície de patógenos como *T. cruzi*. Os anticorpos anti- $\alpha$ -galactosil, obtidos de pacientes com doença de Chagas em estágio crônico foram capazes de reconhecer antígenos de superfície ancorados ao GPI de tripomastigotas, sendo capazes de promover sua lise (ALMEIDA *et al.*, 1991; ALMEIDA *et al.*, 1994). Foi visto também que os anticorpos anti- $\alpha$ -galactosil do soro humano normal conseguem reconhecer a superfície de tripomastigotas, porém com menor afinidade (ALMEIDA *et al.*, 1991; ALMEIDA *et al.*, 1994). Portanto, o soro humano normal contém anticorpos naturais que são capazes de reconhecer epítomos na superfície de *T. cruzi*, embora em baixas quantidades. Naturalmente, com a progressão da infecção há o aumento da produção de anticorpos específicos contra antígenos de *T. cruzi*, que contribuirão para a ativação da via clássica (CARDOSO *et al.*, 2016).

Embora durante a infecção por *T. cruzi* o complemento seja ativado por essas três vias, o processo é parcialmente interrompido devido a presença de proteínas reguladoras do complemento do parasito, reduzindo sua lise (revisada por CESTARI *et al.*, 2013 e LIDANI *et al.*, 2017). Algumas destas moléculas são:

a. A calreticulina: é uma proteína de 45 kDa que é primariamente expressa na membrana de tripomastigotas. O TcCRT expresso na superfície do tripomastigota do *T. cruzi* interage com C1 e com moléculas de MBL e ficolinas presentes no soro (FERREIRA *et al.*, 2004b; RAMÍREZ *et al.*, 2011; SOSONIUK *et al.*, 2014), interferindo na ativação das vias clássica e das lectinas. O TcCRT está presente próximo ao flagelo (FERREIRA *et al.*, 2004a, b; GONZÁLEZ *et al.*, 2015), área que parece fazer o contato inicial com a membrana plasmática do hospedeiro (GONZÁLEZ *et al.*, 2015). Foi sugerido que o TcCRT também contribua durante o processo de infecção de *T. cruzi* em células hospedeiras (RAMÍREZ *et al.*, 2011, 2012).

b. O T-DAF (*Trypomastigote-Decay Accelerating Factor*) é uma glicoproteína de superfície de 87-93 kDa presente em tripomastigotas. Ela mimetiza a atividade da

proteína humana DAF (fator de aceleração de decaimento). O T-DAF interfere na eficiência de montagem de C3 convertase, afetando, portanto, as três vias do complemento (TAMBOURGI *et al.*, 1993).

c. O CRP (*Complement Regulatory Protein*), também chamada GP160, está presente em tripomastigotas e é uma glicoproteína de superfície ancorada por GPI. O CRP se liga a C3b e C4b, inibindo a formação de C3 convertase das vias clássica e alternativa (NORRIS, 1998).

d. O CRIT (*Complement C2 Receptor Inhibitor Trispanning*), é uma proteína transmembrana de tripomastigotas que apresenta uma homologia de sequência com a cadeia beta de C4, o sítio de ligação de C2. Assim, o CRIT bloqueia a clivagem de C2 em C2a, impedindo a formação de C3 convertase das vias clássica e das lectinas (INAL; SCHIFFERLI, 2002; CESTARI *et al.*, 2012, CESTARI *et al.*, 2008).

e. Gp58/68: é uma glicoproteína que faz parte de um receptor de *T. cruzi* para fibronectina/colágeno, desempenhando um papel importante na interação do parasito com células de mamíferos. Foi visto que a gp58/68 atua inibindo a formação de C3 convertase da via alternativa (FISCHER *et al.*, 1988).

Além das moléculas e fatores de virulência intrínsecos dos microrganismos, uma outra estratégia tem sido descrita para evadir ao sistema imune e promover a propagação da infecção: a liberação de vesículas extracelulares (VEs). No contexto de *T. cruzi*, as vesículas extracelulares parecem desempenhar um papel importante na biologia dos parasitos e sua relação com o hospedeiro. Desse modo, as vesículas extracelulares e a sua liberação por *T. cruzi* serão descritas nas próximas seções.

## 2.5. AS VESÍCULAS EXTRACELULARES

Entre os vários mecanismos de comunicação celular já descritos, está a liberação de vesículas extracelulares (VEs). Descritas inicialmente como pequenas vesículas pelas quais os reticulócitos de ovinos em maturação descartavam componentes celulares obsoletos (JOHNSTONE *et al.*, 1987, PAN e JOHNSTONE, 1983, TRAMS *et al.*, 1981), exossomos e outras vesículas extracelulares (VEs) atualmente são consideradas uma forma universal de comunicação célula-célula presente em diversos organismos: Proteobacteria, Achaea, procariotos e eucariotos

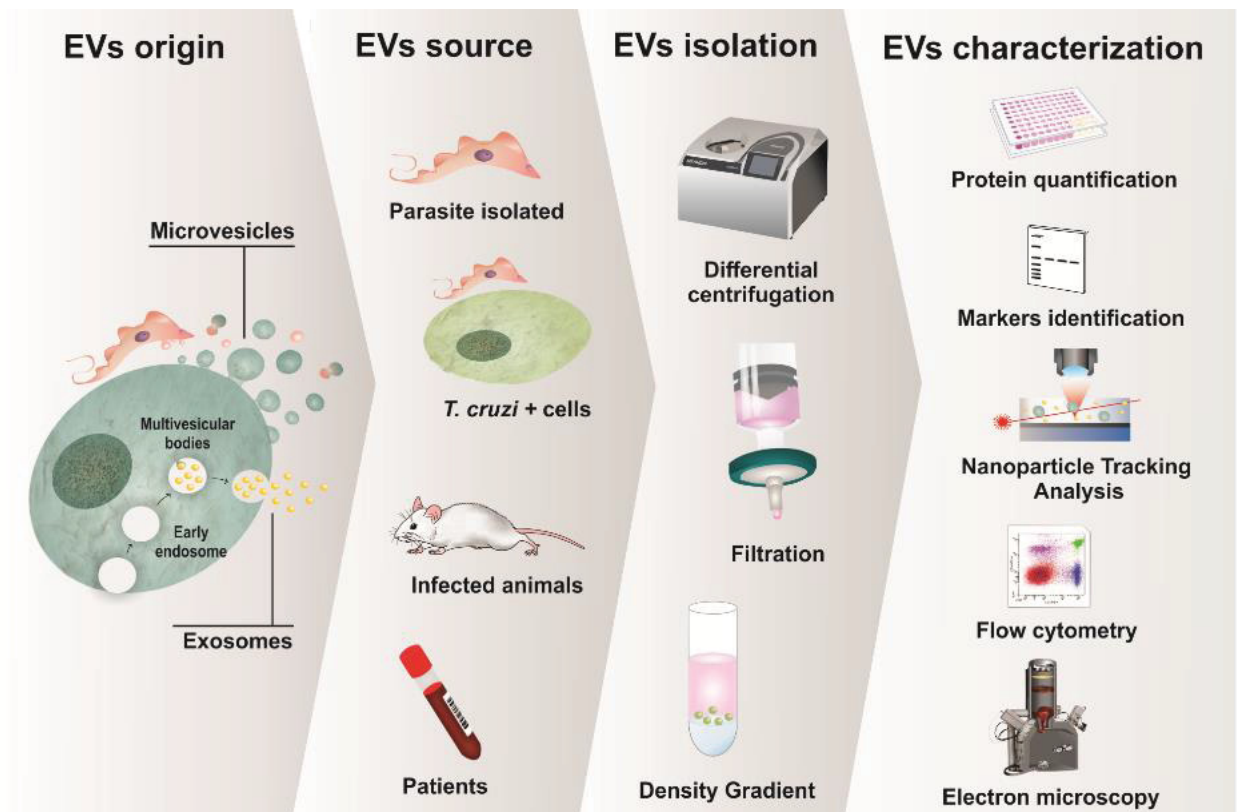
(BARTENEVA, 2013; YÁÑEZ-MÓ *et al.*, 2015). As VEs são compostas por bicamada lipídica, podendo ter diferentes origens e composições. Baseando-se em sua biogênese, atualmente as VEs são classificadas entre exossomos e microvesículas. Os exossomos são formados a partir da fusão de corpos multivesiculares com a membrana plasmática e subsequente liberação de vesículas intraluminais para o meio exterior à célula. Os exossomos medem, de forma geral, entre 30 a 100 nm e sua liberação parece ser contínua (revisado por BARILE e VASSALLI, 2017 e por HARDING *et al.*, 2013). Já as microvesículas, que por vezes recebe as denominações de micropartículas ou ectossomos, tem origem a partir de “blebbing” ou brotações diretamente da membrana plasmática com um diâmetro que varia entre 100 a 1000 nm. Acredita-se que formação de microvesículas é estimulada pelo aumento intracelular de  $Ca^{2+}$ . Com isso, há o aumento da ativação da escramblase, uma enzima envolvida na alteração da assimetria dos fosfolipídeos da membrana plasmática e ao mesmo tempo, inativa-se a enzima translocase que também é responsável por manter fosfatidilserina (PS) e fosfatidiletanolamina (PE) no lado interno da membrana. Como consequência, os fosfolipídeos PS e PE são translocados para a superfície externa da membrana (extracelular), o que pode ser, em alguns casos, um marcador para as microvesículas (utilizando-se Anexina V) (COCUCCI *et al.*, 2009; CONNOR *et al.*, 2010; GYÖRGY *et al.*, 2011). Com as modificações dos componentes proteicos e lipídicos da membrana plasmática que modulam as alterações na curvatura e rigidez da membrana, ocorre também uma redistribuição dos componentes que serão carregados pelas microvesículas, levando a um enriquecimento seletivo do cargo das microvesículas (revisado por TRICARICO *et al.*, 2017). Existe um esforço geral da comunidade científica em postular marcadores específicos de microvesículas ou exossomos. Em geral, a membrana de microvesículas contém moléculas típicas da membrana da célula de origem, incluindo lipídios, proteínas e glicoconjugados. Já foi mostrado que alguns "marcadores de exossomo", tais como flotilina-1, proteínas de choque térmico de 70-kDa (HSC70 / HSP73, HSP70 / HSP72) ou complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe I e classe II estão presentes também em VEs maiores (KOWAL *et al.*, 2016). Desse modo, as investigações para orientar a correta diferenciação entre microvesículas e exossomos continuam. Parte dos pesquisadores ainda considera os corpos apoptóticos (que são frações celulares provenientes de células em apoptose) como uma classe de vesículas extracelulares, porém há uma

tendência em incluir somente microvesículas e exossomos como VEs (TETTA et al, 2013; NIEL et al,2018).

As VEs contém todos os tipos de biomoléculas, incluindo proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucleicos, que sofrem variações conforme o tipo celular de origem. Sua composição tem sido estudada sob diferentes técnicas, como Western Blotting, citometria de fluxo, microscopia eletrônica, espectrometria de massa, ômicas em geral (proteômica, lipidômica) e etc. Algumas das técnicas mais utilizadas para caracterização de VEs constam na figura 5. No contexto patológico, o carreamento e difusão de determinadas moléculas é de crucial importância para progressão da doença. Agentes patogênicos usam VEs para transferir fatores de virulência ao hospedeiro, modulação da resposta imune, alterar fenótipo de células do hospedeiro, entre outros, como foi visto nas infecções virais, infecções bacterianas e infecções provocadas por protozoários parasitas (TROCILHAS et al., 2012; LAI et al., 2014; MANTEL e MARTI, 2015). As funções que as VEs desempenham no contexto de protozoários foi revisado por Gavinho et al., 2018.

Figura 5. Representação esquemática das possíveis fontes de VEs e métodos mais comumente utilizados para obtenção e caracterização de VEs relacionadas a parasitos.



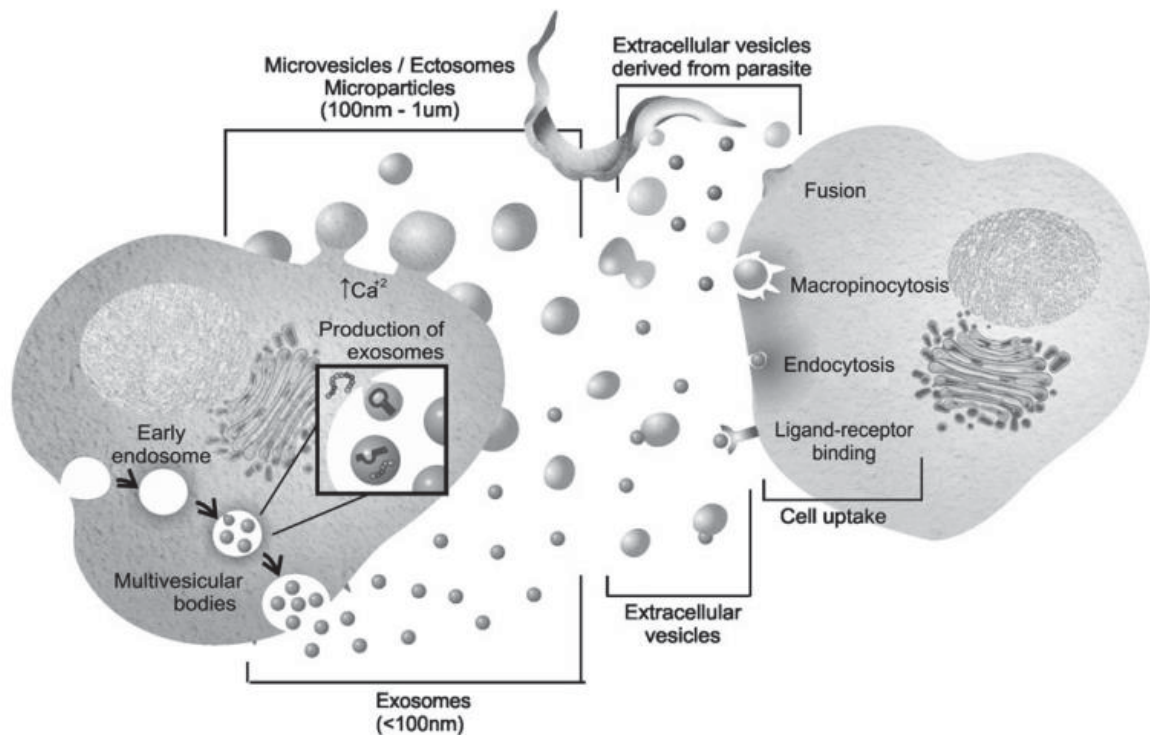


Fonte: Rossi et al., 2019 (em impressão)

Após sua liberação, as VEs podem ser degradadas liberando seu conteúdo no espaço extracelular (DOLO *et. al.*, 1998) ou interagir com células vizinhas (PLUSKOTA *et al.*, 2008). Na interação com células alvo, as VEs podem se ligar à membrana plasmática e ocorrer a fusão de membranas (VE – célula alvo); as VEs podem conter ligantes que sejam reconhecidos por receptores das células alvo; pode ocorrer endocitose ou macropinocitose. O dinâmico fluxo de liberação de VEs e recebimento de VEs por células no contexto parasitário está representado na figura 6.



Figura 6 – Representação esquemática do fluxo dinâmico de vesículas extracelulares entre o patógeno e o hospedeiro



Fonte: GAVINHO et al., 2018

### 2.5.1 Vesículas extracelulares derivadas de *Trypanosoma cruzi*

As VEs derivadas de *T. cruzi* começaram a ser explorados em 1979, mostrando que elas possuíam propriedades antigênicas, e continuam a serem estudadas até o presente (SILVEIRA et al., 1979).

Diversos estudos sugerem que as VEs desempenham um papel importante na dinâmica das células parasitas-hospedeiras e na fisiopatologia da doença de Chagas. Nos estágios iniciais da infecção, o contato de *T. cruzi* com as células do hospedeiro na corrente sanguínea promove a liberação de VEs capazes de inibir o ataque do sistema complemento (CESTARI et al., 2012) e aumentar a infecção de parasitas às células do hospedeiro (NEVES e FERNANDES, 2014; RAMIREZ et al., 2017). Foi visto que a inoculação prévia com vesículas liberadas por *T. cruzi* acelerou e aumentou a taxa de mortalidade dos camundongos infectados; e que os

camundongos infectados com vesículas desenvolveram uma patologia cardíaca grave com uma reação inflamatória intensa e um maior número de ninhos de amastigotas (TROCOLI-TORRECILHAS *et al.*, 2009). Alguns trabalhos apresentam resultados contraditórios a respeito da especificidade das VEs: Wyllie e Ramirez (2017) mostraram que os fenômenos de resistência à lise pelo complemento e invasão em células eucariótica são cepa-específico (WYLLIE e RAMIREZ, 2017) enquanto Ribeiro *et al* (2018) demonstraram que VEs derivadas de uma cepa podem afetar a taxa de infectividade de outra cepa de *T. cruzi*.

Análises transcriptômicas e proteômicas mostraram que as VEs de *T. cruzi* são enriquecidas em proteínas envolvidas no metabolismo, sinalização, ligação de ácidos nucleicos e sobrevivência do parasito e virulência, sendo o conteúdo de exossomos e microvesículas diferentes (RIBEIRO *et al*, 2018; BAYER-SANTOS *et al.*, 2013; GAUR e CHATURVEDI, 2016). De fato, foi encontrada uma imunorreatividade de soros de pacientes chagásicos com proteínas presentes nas VEs (RAMIREZ *et al*, 2017; BAUTISTA-LÓPEZ *et al*, 2017). A avaliação do conteúdo de ácidos nucléicos presentes nas VEs de *T. cruzi* mostraram que os RNAs presentes nas VEs das diferentes formas de parasitas são diferentes e que também se diferem dos encontrados em sua célula de origem (BAUTISTA-LÓPEZ *et al*, 2017; BAYER-SANTOS *et al.*, 2014), indicando um direcionamento específico desses RNAs (FERNANDEZ-CALERO *et al.*, 2015). Além disso, destaca-se para o fato de que VEs do parasito foram capazes de alterar a expressão gênica em células de mamíferos (GARCIA-SILVA *et al.*, 2014) e induzir a produção de citocinas (NOGUEIRA *et al.*, 2015; CHOWDHURY *et al.*, 2017).

### 2.5.2 Ativação do Sistema Imune por VEs

Em diferentes modelos, foi demonstrado que as VEs tem um potencial de interação com o sistema imune, seja pela possibilidade de apresentação direta de antígenos por MHC classe II à células T ou por carrearem antígenos para células apresentadoras de antígenos, como células dendríticas (CDs), por exemplo (revisado por ROBBINS e MORELLI, 2014). Vários trabalhos demonstram a capacidade de protozoários parasitos liberarem VEs que interagem fortemente com células hospedeiras resultando na modulação da resposta imune do hospedeiro

(TORRECILHAS et al, 2012; MARCILLA et al., 2014; CAMPOS et al., 2015, EVANS-OSSES et al., 2015; RAMIREZ et al, 2016).

Eritrócitos infectados por *Plasmodium* spp. liberam VEs contendo múltiplas proteínas hospedeiras e parasitárias, em particular de antígenos parasitários e proteínas envolvidas na invasão dos parasitos às células. Essas VEs demonstraram propriedades imunomoduladoras em macrófagos primários humanos e neutrófilos (MANTEL et al., 2013). Martin-Jaular e colaboradores (2011) imunizaram camundongos com exossomos produzidos por reticulócitos infectados (exPy) e não infectados (exC) por *P. yoelii*, e os animais que receberam exPy produziram anticorpos IgG, que reconheceram especificamente eritrócitos infectados por *P. yoelii*. Este trabalho demonstrou que imunização de camundongos com exPy foi capaz de induzir uma resposta específica contra à infecção pelo parasito, mostrando um potencial de atuação das VEs como uma vacina. Foi demonstrado também que vesículas derivadas de eritrócitos infectados por *Plasmodium falciparum* são capazes de ativar citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-12, IL-1b, assim como a citocina anti-inflamatória IL-10 (MANTEL et al. 2013).

Quando CDs derivadas de monócitos foram tratadas com exossomos provenientes de *Leishmania* sp., foi detectado um perfil inibitório na liberação de citocinas, sendo que os exossomos inibiram a produção de IL-12p70 e IL-10. Além disso, foi observado que não ocorreu o aumento da expressão dos marcadores HLA-DR, CD80, CD86 na superfície das CDs imaturas quando incubadas com exossomos. Entretanto, CDs maduras pré-tratadas com exossomos apresentaram uma modesta redução na expressão de HLA-DR, CD80, CD86 (SILVERMAN et al, 2010).



### 3 OBJETIVOS (GERAL E ESPECÍFICOS)

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o comportamento de resistência e infectividade de parasitos de *Trypanosoma cruzi* selecionados por exposições à altas concentrações de soro normal humano e caracterizar vesículas extracelulares derivadas da interação de formas metacíclicas de *T. cruzi* com células monocíticas.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Avaliar estratégias de seleção de populações de parasitos de *T. cruzi* mais resistentes à lise pelo sistema complemento.
2. Caracterizar o fenótipo da população de parasitos selecionados quanto à resistência à lise pelo sistema complemento e à infectividade de células eucarióticas.
3. Avaliar o envolvimento de VEs derivadas dos parasitos selecionados sobre a resistência do parasito durante à exposição ao soro normal humano e no processo de invasão celular.
4. Comparar o efeito de VEs derivadas de parasitos de *T. cruzi* de cepas polares (cepa G e Y) na indução de resposta imune por meio da liberação de citocinas e ativação de células dendríticas.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MEIOS DE CULTURA

- o Meio LIT (infusão de fígado): extrato de levedura 15 g/L; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 11,56 g/L; glicose 2,2 g/L; hemina 0,02 g/L; infuso de fígado 5 g/L; KCl 0,4 g/L; NaCl 4,4 g/L; triptose 5 g/L e pH 7,2 ajustado com HCl 1M, suplementado com soro fetal bovino inativado 10% (Cultilab, Brasil) (v/v) e uma de solução de penicilina (100 IU/ml) e estreptomicina (100 µg/ml) (Pen-Strep, Sigma, EUA).

### 4.2 SOLUÇÕES

TABELA 1 - SOLUÇÕES UTILIZADAS E SUAS COMPOSIÇÕES

SOLUÇÃO	COMPOSIÇÃO
Tampão HEPES	Hepes 10 mM; NaCl 140 mM, pH 7,4
Tampão PBS1X (solução de uso)	NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 10,0 mM; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,8 mM, pH 7,4.
Tampão PBSG	PBS1X e glicose 2% (v/v), pH 8,0.

### 4.3 CULTURA DE CÉLULAS

**Parasitas:** Foram utilizados neste trabalho parasitos da espécie *T. cruzi* das seguintes linhagens: cepas G e Y (TABELA 2). As culturas axênicas das formas epimastigotas desses parasitos foram mantidas em fase logarítmica de crescimento (com densidade celular entre 1 e  $2 \times 10^7$  parasitos/ml) em meio LIT completo a temperatura de 28°C (CAMARGO *et al.*, 1964).

TABELA 2 - CLASSIFICAÇÃO DAS CEPAS DE *Trypanosoma cruzi*

CEPA/CLONE	CLASSIFICAÇÃO	PAÍS	HOSPEDEIRO/VE TOR
G	<i>T. cruzi</i> I	Amazonas, Brasil	Opossum/Gambá
Y	<i>T. cruzi</i> II	São Paulo, Brasil	<i>Homo sapiens</i>

FONTE: Adaptado de ZINGALES *et al.* (2009).

**Células:** As linhagens celulares de rim do macaco verde africano (Vero) e de monócito humano (THP-1) foram mantidas em meio RPMI 1640 (Sigma, EUA – com adição de NaHCO<sub>3</sub> 2 g/L; HEPES 4,8 g/L; pH 7,4 ajustado com NaOH 5M) suplementado com 10% soro fetal bovino inativado, penicilina (100 IU/ml) e estreptomicina (100 µg/ml), em estufa umidificada a 37°C sob atmosfera controlada de 5% CO<sub>2</sub>.

### 4.4 DIFERENCIAÇÃO DE EPIMASTIGOTA PARA TRIPOMASTIGOTA METACÍCLICO (METACICLOGÊNESE)

Para a metaciclogênese *in vitro*, epimastigotas no início da fase estacionária ou seja, no quinto dia de cultivo com densidade celular de aproximadamente  $5$  e  $7 \times 10^7$  parasitos/ml foram usados.

Uma alíquota de 10 µl da suspensão do epimastigotas foi diluída com 90 µl de tampão PBS, ou seja fator de diluição=10, e a contagem foi feita a partir de uma alíquota de 10 µl na câmara de Neubauer (Boeco, Alemanha) sob o microscópio



ótico com a objetiva de 40X. O cálculo do número de parasitos por ml foi determinado (número de parasitos contados x fator de diluição x  $10^4$ ). Depois disso, o volume do cultivo parasitário que contém aproximadamente  $1 \times 10^8$  epimastigotas foi coletado e centrifugado a 2.000xg por 10 minutos a 4°C. Os epimastigotas ( $\sim 1 \times 10^8$ ) foram ressuspensos em 5 ml de meio LIT completo juntamente com 15 ml de meio Tc100 (Vitrocell) em garrafas médias (75 cm<sup>2</sup>), incubados a 28°C por 6-8 dias.

#### 4.5 PURIFICAÇÃO DAS FORMAS METACÍCLICAS DE *Trypanosoma cruzi*

Os tripomastigotas metacíclicos foram obtidos da cultura por purificação por coluna de troca iônica DEAE celulose (SIGMA), equilibrada com tampão PSB G (pH 8,0). Os parasitos foram colhidos por centrifugação a 4.000xg a 4°C e ressuspensos em 3 ml de tampão PBS G a 4°C. Em seguida a suspensão foi inoculada em uma coluna contendo lã de vidro na base e acima aproximadamente 3 ml de DEAE celulose. As formas tripomastigotas metacíclicos passam pela coluna enquanto que as formas epimastigotas ficam retidas (TEIXEIRA e YOSHIDA, 1986). Os tripomastigotas foram usados imediatamente após a purificação.

#### 4.6 SORO NORMAL HUMANO

Foi utilizado soro normal humano (SNH) (Sigma-Aldrich) aliqotado e armazenado a -80° C até a utilização.

#### 4.7 INDUÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DA INTERAÇÃO *Trypanosoma cruzi* E CÉLULAS THP-1

Tripomastigotas metacíclicos, purificados através de coluna DEAE, foram incubados em uma relação 10:1 com células THP-1 ( $1 \times 10^7$  parasitos/ml e  $1 \times 10^6$  células/ml). As células foram pré-incubadas durante 1 h em meio RPMI 1640 sem soro, lavadas e ressuspensas em RPMI 1640/CaCl<sub>2</sub> (1 mM). Durante o estímulo, as células juntamente com os parasitos foram incubados a 37°C durante 1 h. VEs foram obtidas por centrifugação diferencial de 5 min a 1000xg para remover as células, uma centrifugação de 4.000xg durante 30 min para remover células residuais e debris celulares, e logo ultracentrifugação a 100.000xg por 1h e 30 min (CESTARI *et al.*, 2012). Para a ultracentrifugação utilizou-se a ultracentrífuga Beckman Coulter

Optima MAX-XP com o rotor de oscilação de alumínio MLS-50. O sobrenadante foi descartado e o precipitado (*pellet*) foi ressuspensão em PBS 1x.

#### 4.7.1 Determinação da concentração de proteína em VEs

As concentrações de proteína nas VEs foram determinadas utilizando o *kit* de ensaio de proteína Micro-BCA (Thermo Scientific, EUA) conforme descrito pelo fabricante.

### 4.8 LISE MEDIADA PELO COMPLEMENTO

Este ensaio mede a capacidade do soro normal humano de lisar os parasitos pela ação do sistema complemento. As concentrações de soro foram escolhidas experimentalmente antes da realização de qualquer experimento, com base na diluição limite que avalia a lise dos parasitos em diferentes concentrações de SNH em determinado tempo e na determinação da IC50, ou seja, foi utilizada a diluição de soro que lisasse aproximadamente 50% dos parasitos nos tempos preestabelecidos. Para fazer isso, foram feitos ensaios de lise mediado pelo complemento por diluição seriada do SHN.

O SNH foi diluído em RPMI em várias concentrações (50%, 25%, 12,5%, 6,25% e 3,12%). Formas epimastigotas ou tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* foram centrifugadas a 1.000xg por 10 minutos, 4°C, lavadas e suspensas em RPMI na concentração de  $5 \times 10^6$ /ml. Os parasitos ( $5 \times 10^5$  em 100  $\mu$ l) foram incubados juntamente com 100  $\mu$ l de SHN diluído, em diferentes tempos (10, 15, 30 ou 60min) a 37° C. Como controle negativo foi utilizado 25% de SNH inativado por calor (56°C por 1 h). As reações foram paradas por intermédio da adição de 800  $\mu$ l de RPMI gelado. Os parasitos foram quantificados em uma câmara de Neubauer sob o microscópio ótico com a objetiva de 40 X. A motilidade e integridade da morfologia dos parasitos foram usadas para distinguir entre parasitos vivos e mortos. Para cada amostra, foi lido no mínimo dois quadrantes da câmara de Neubauer.

#### 4.8.1 Ativação das diferentes vias do sistema complemento

A via clássica e das lectinas do complemento são ambas dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , enquanto a via alternativa é dependente somente de  $\text{Mg}^{2+}$ . Para avaliar

a atividade da via alternativa, parasitos foram incubados em SHN contendo 10 mM de um quelante de cálcio, EGTA e 7 mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>).

#### 4.8.2 Efeito das VEs na resistência a lise mediada pelo complemento

Para estes ensaios, epimastigotas ou tripomastigotas metacíclicos ( $5 \times 10^5$  em 100  $\mu$ l) foram incubados em 100  $\mu$ l de SHN diluído em RPMI na presença ou não de VEs (previamente purificadas e quantificadas) a 37°C, conforme foi descrito por Cestari e colaboradores (2012).

### 4.9 ENSAIOS DE INVASÃO À CÉLULAS VERO

As células Vero foram semeadas sobre lamínulas de vidro de 13 mm em placas de 24 poços por 16-24h a uma concentração de  $1 \times 10^5$  células/poço. Depois disso, as células foram lavadas com RPMI 1640 sem soro e incubadas com tripomastigotas metacíclicos ( $1 \times 10^6$  parasitos/poço, MOI 10:1). Após 3 h de incubação, as células foram lavadas 3 vezes com meio RPMI sem SFB, fixadas com paraformaldeído 4% por 15 min e novamente lavadas. Então, dilui-se a solução de Giemsa em água destilada (1:10) e adicionou-se aproximadamente 300  $\mu$ l desta solução por poço, corando por aproximadamente 15 min. Após, as células foram lavadas com água destilada por 3 vezes e, após secas, as lamínulas foram montadas em lâminas de vidro usando a resina Entellan<sup>®</sup> (Merck). As lamínulas foram analisadas em microscópio óptico na ampliação de 1000x ou no scanner de lâminas, o microscópio Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Alemanha), e as imagens foram obtidas utilizando o programa de captura automatizada Metafer 4/VSlide (Metasystems, Alemanha), objetiva 63X. O número de parasitos intracelulares a cada 100 células foi determinado contando aleatoriamente células e parasitos por campo totalizando ao menos 300 células por lamínula em triplicata.

#### 4.9.1 Efeito das VEs na invasão de metacíclicos à células VERO

As células Vero foram semeadas sobre placas com 4 divisórias por 16-24h a uma concentração de  $2 \times 10^5$  células/poço. Para obtenção das VEs, células THP1 e metacíclicos de cada população (WT e 2R) foram marcados com Octadecil Rhodamina B. A octadecil-rhodamina B é uma molécula lipofílica que liga-se às membranas com o fluoróforo na interface aquosa e a cauda no interior dos lipídeos.

Para marcação, foi utilizado 5ug/mL, incubados por 10 min em câmara escura, lavado duas vezes e então iniciada a incubação dos metacíclicos com THP1 para produção de VEs, na presença de 1mM de CaCl<sub>2</sub>. A obtenção de VEs seguiu o protocolo descrito acima. A marcação de metacíclicos com CFSE foi feita com 5uM do marcador, incubação por 15min em câmara escura e após os parasitos foram lavados 2 vezes. O CFSE atravessa membranas celulares intactas e, dentro das células, as esterases intracelulares clivam os grupos acetato para produzir a molécula de carboxifluoresceína fluorescente. Depois disso, as células VERO aderidas na placa foram lavadas com RPMI 1640 sem soro e incubadas com 3,5ug de VEs no momento da adição de tripomastigotas metacíclicos (2x10<sup>6</sup> parasitos/poço, MOI 10:1). A placa foi levada ao microscópio confocal e as imagens foram capturas a cada 4 minutos, durante 3 h de incubação à 37°C. As imagens foram capturadas na ampliação de 400x e obtidas e processadas com o software FIJI/Bioformats. O vídeo representativo das 3 horas de incubação totalizou 27 segundos.

#### 4.10. ENSAIO DE WESTERN BLOTTING

##### 4.10.1 *Obtenção de extrato proteico total de metacíclicos de Trypanosoma cruzi*

Um total de 5x10<sup>6</sup> tripomastigotas metacíclicos foram centrifugados a 4.000xg por 10 min a 4°C e lavados com tampão PBS gelado. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e a lise desses parasitos ocorreu com uso de 100 µl de tampão de amostra para proteína. As amostras foram sonicadas em banho por 5 min e então desnaturadas por 5 min a 95°C. As amostras foram imediatamente utilizadas.

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

Amostras de proteína foram submetidos à separação eletroforética em gel de SDS-PAGE 10% de poliacrilamida. O total de extrato proteico de parasitos (5x10<sup>6</sup> parasitos/canaleta) foi aplicado. A corrida foi realizada em cuba de eletroforese vertical em tampão SDS-PAGE. Fixou-se a voltagem em 120 V por 10 min para o gel de empilhamento e 80 V para o gel de separação por 3 h. Em seguida, os géis foram corados com azul de Coomassie.

#### 4.10.3 *Western blot*

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF) no sistema de transferência semi-seca Trans-Blot SD (Bio-Rad, EUA) a 10 V por 40 min.

Logo após, a membrana foi incubada durante a noite sob agitação a 4°C com solução de bloqueio. Transcorrido este tempo, foram realizadas três lavagens com PBST por 5 min e a membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-GP82 (diluição 1:100 em PBS/T) por 2 h. Depois disso, a membrana foi lavada com PBS/T, três vezes por 5 min, e incubada por 1 h a 37°C com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase. Para ensaios com anti-GP82 o anticorpo secundário empregado foi anti-*mouse* na diluição 1:1.000 (Santa Cruz Biotechnology, EUA). Logo depois, a membrana foi lavada com PBS/T. Finalmente, foi revelada em fotodocumentador Amersham™ 600 (GE Healthcare, EUA) por quimioluminescência utilizando o kit Amersham™ ECL™ *Prime Western Blotting Systems* (GE Healthcare, EUA).

#### 4.11 EFEITO DE VEs NA INTERAÇÃO COM CÉLULAS DENDRÍTICAS

Estudos celulares foram realizados utilizando camundongos C3H/HeN ou C57BL/6 previstos pelo biotério do IMPaM, Departamento de Microbiologia, Faculdade de Medicina, UBA-CONICET.

Células derivadas de medula óssea foram diferenciadas como detalhado por Poncini e col. (2008). Brevemente, as células obtidas de medula óssea de fêmur e tibia de camundongos saudáveis, foram cultivadas por 7 dias em médio IMDM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 20% de médio condicionado com GM-CSF. Foi avaliado o estado de ativação/diferenciação e funcionalidade de Células dendríticas (CDs), de acordo ao seguinte: para diferenciação dos macrófagos, foi adicionado 15% de sobrenadante de células L929 (R15), no dia 0 e dia 4 de cultura. Para a diferenciação de CDs, foi adicionado 50 µM β-mercaptoetanol (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suécia). As células foram plaqueadas em placas de Petri a uma concentração de  $4 \times 10^6$  células em um volume de 10 mL e incubadas a 37°C por 4 dias na presença de 5% CO<sub>2</sub>. No quarto dia, foi adicionado mais 10 mL de meio R15, por placa. As células que não aderiram foram coletadas no 9° dia de

cultura. A população aderente de células foi caracterizada pela expressão dos marcadores de superfície MHCII e CD86 e analisadas por citometria de fluxo.

#### 4.12 DOSAGEM DE CITOCINAS

A dosagem de citocinas foi realizada utilizando os kits Human IL-4 Mini TMB ELISA Development Kit; Human IFN- $\gamma$  Mini TMB ELISA Development Kit; Human IL-6 Mini TMB ELISA Development Kit; Human IL-17E Mini TMB ELISA Development Kit; Human TNF- $\alpha$  Mini TMB ELISA Development Kit (PeproTech, USA). Para isso, foram plaqueadas  $2 \times 10^5$  células THP-1 por poço de placa de 24 poços e diferenciadas após 24 horas utilizando PMA em uma concentração de 15ng por poço. As células foram incubadas com PMA por 24 horas, após, lavadas e adicionado meio RPMI por mais 24 horas. As induções da produção de citocinas foram feitas durante 24 horas com extrato de metacíclicos ou VEs derivadas da interação de metacíclicos com THP-1 como descritas acima, para as cepas G e Y. Como controle positivo foi usado LPS em concentração de 500ng por poço. Após 24 horas de indução, os sobrenadantes foram congelados em  $-80^{\circ}\text{C}$  e somente descongelados para dosagem das citocinas pelos kits. A montagem das placas de ELISA e demais procedimentos foram realizados conforme instruções do fabricante.

#### 4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão. Para comparação dos valores das médias dos grupos, foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para Múltiplas Comparações. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. As análises estatísticas foram realizadas usando o software *GraphPad Prism* (versão 6.0).

## 5. RESULTADOS

### Capítulo I: Seleção de população resistente

Com a finalidade de selecionar uma população de parasitos que tivesse maior resistência à lise pelo Sistema Complemento e posteriormente caracterizar em quantidade e qualidade os níveis de vesículas extracelulares com respeito aos de uma população selvagem, foram usadas algumas estratégias. Para isso, foram utilizados parasitos da cepa G de *T. cruzi*, por se tratar de uma cepa mais sensível ao sistema complemento, assim, nós acreditávamos que seria mais sensível a alteração do parasito em comparação ao WT.

Primeiramente, a estratégia utilizada foi de realizar uma cultura dos parasitos sob pressão constante de SNH, que consistia em manter os parasitos epimastigotas sob uma concentração fixa de SNH durante seu crescimento, sendo que a cada 7 dias o tubo era centrifugado e o pellet ressuspendido na mesma condição de concentração de SNH. Essa estratégia não obteve sucesso pois ao final de 8 semanas de manutenção das culturas, não era possível diferenciar parasitos vivos de mortos e também poderia estar ocorrendo metaciclogênese espontânea nessas condições.

Assim, a seguinte estratégia utilizada foi de seleção populacional em placa, que consistiu em distribuir uma pequena quantidade de epimastigotas ( $1 \times 10^2$ ) por poço de placas de 24 poços e submeter essa população a crescimento a 28°C em diferentes concentrações de SNH. Foram testadas as concentrações de 20%, 10% e 5% de SNH, porém, em nenhuma das condições houve parasitos sobreviventes, depois de serem incubados a 28° C por 7 dias de incubação. Então supõe-se que a relação estequiométrica entre as moléculas inibidoras de complemento presente nessa quantidade de parasitos foi inferior a de moléculas de SNH participando da cascata de complemento, impossibilitando a sobrevivência dos parasitos.

Por fim, a terceira estratégia utilizada para seleção dos parasitos foi a de sequências de exposição ao SNH, na qual cultivos de  $5 \times 10^5$ /mL epimastigotas foram

submetidos à uma pressão de SNH de 30% (v/v) e incubados a 37°C, acompanhando a morte dos parasitos por contagem em câmara de Neubauer através do tempo. Após alcançar 70% de morte da população inicial (ou seja, 30% de parasitos vivos), o que acontecia em aproximadamente 20-40min, as amostras foram levadas à gelo e logo centrifugadas à 3000rpm/10min para eliminação do SNH. Os parasitos remanescentes foram cultivados em meio de cultura LIT completo (chamados de 1R) e após recuperarem a capacidade de crescimento em uma curva de crescimento constante, foram novamente submetidos ao mesmo processo de seleção de 30% de sobreviventes sob ação de 30% de SNH e recuperados novamente em meio cultura completo (LIT com SFB) (chamados de 2R). As estratégias utilizadas para seleção de parasitos resistentes estão resumidas na Tabela 3. Após estabelecimento da curva de crescimento normal dos epimastigotas, esta cultura foi diferenciada à tripomastigotas metacíclicos e foi avaliada a resistência desses parasitos quanto à lise pelo sistema complemento e capacidade de infecção de células.

<b>Estratégia</b>	<b>Método</b>	<b>Sucesso</b>
<b>1</b> Cultura de epimastigotas sob pressão de SNH	Manutenção da cultura de epimastigotas sob pressão constante de SNH e troca do meio de cultura à cada 7 dias sob a mesma condição	Não
<b>2</b> Seleção populacional em placa	Exposição de $1 \times 10^2$ epimastigotas ao SNH em placa de 24 poços (concentrações de 20%, 10% e 5% de SNH) para manter os sobreviventes	Não
<b>3</b> Rounds de SNH	Exposição de epimastigotas ao SNH e acompanhamento da morte dos parasitos até restar somente 30% de sobreviventes.	Sim

TABELA 3 – Estratégias de seleção de parasitos resistentes à lise pelo sistema complemento



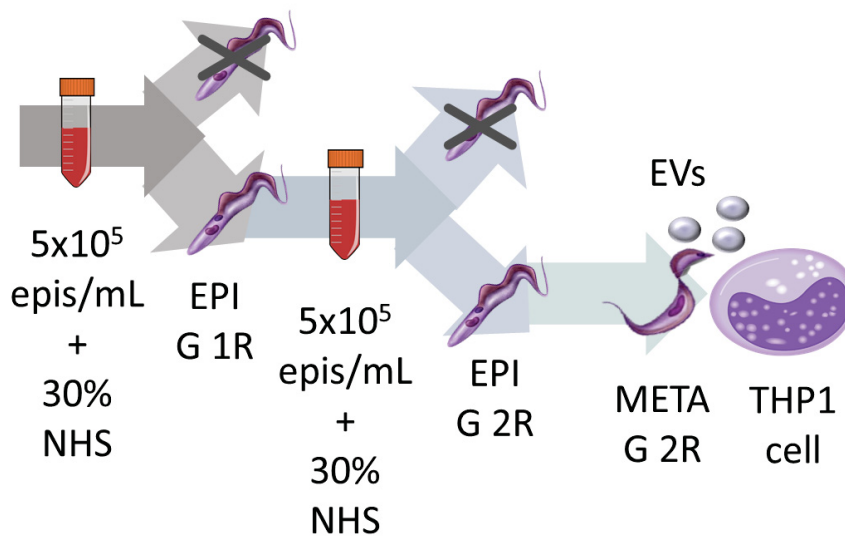


Figura 7. Esquema representando a estratégia de seleção de parasitos utilizando seqüências de alta concentração de SNH sobre epimastigotas.

Inicialmente, enquanto a população de parasitos que havia passado pela 2ª seleção recuperava o crescimento, foi testada a resistência de epimastigotas da primeira seleção com 30% de SNH (1R) quanto à lise pelo sistema complemento. Os epis de G 1R mostraram maior sobrevivência em comparação aos epimastigotas selvagem (*wild type* ou WT), sob exposição de 6,25% de SNH por diferentes períodos. Além disso, foi visto que a Via Alternativa do Complemento era menos eficaz na lise dessa população de parasitos (Figura 08).

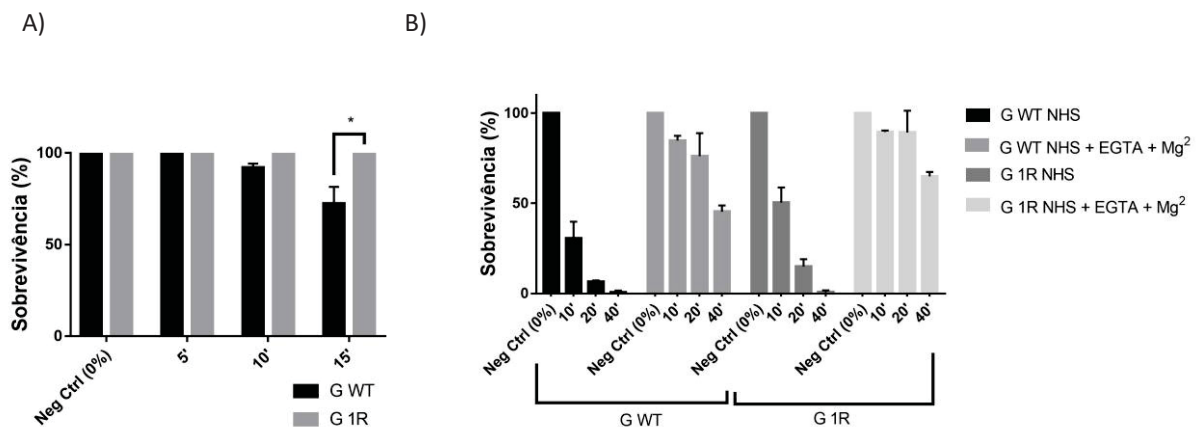


Figura 8. A) Cinética de lise de epimastigotas pelo sistema complemento nos tempos 5, 10 e 15 min na presença de 6,25% de SNH. B) Ação da Via Alternativa (SNH + EGTA +  $Mg^{+2}$ ) em comparação com a ativação de todas as vias do Sistema Complemento (SNH) usando 6,25% de SNH por 10, 20 e 40 min.

Após recuperação dos parasitos que passaram por duas seleções de SNH, as curvas de crescimento de epimastigotas G WT e 2R foram comparadas por 72h e vimos que não havia diferença entre elas (Fig 9 A). Posteriormente, a viabilidade dos parasitos em condição de metaciclo gênese foi avaliada durante 9 dias, e foi observado um comportamento de maior viabilidade nos parasitos 2R (Fig 9 B) . Além disso, houve maior rendimento na purificação de metacíclicos por coluna de cromatografia de troca iônica (DEAE Cellulose) (Fig 9 C) na população selecionada e detectamos uma diferença no aspecto das culturas, onde os parasitos WT apresentavam-se mais adesão ao fundo da garrafa de cultura. (Fig 9 D).

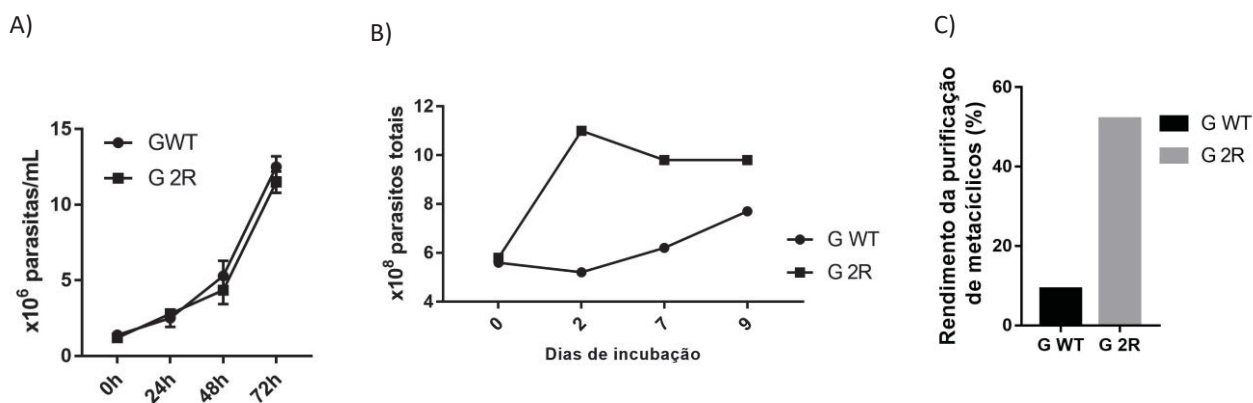
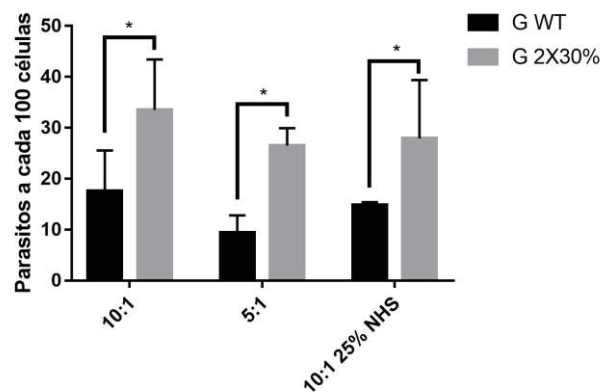


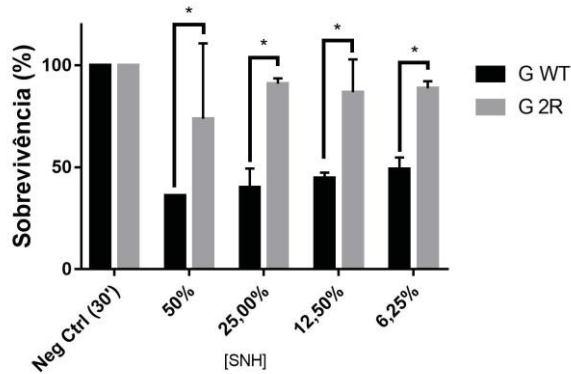
Figura 9. A) Curva<sup>D)</sup> de crescimento de Epis em meio LIT completo. B) Contagem total de parasitas em meio de metaciclogênese. C) Rendimento da purificação de metas em porcentagem. D) Imagem das garrafas de indução de metaciclogênese onde vê-se maior aderência dos parasitos ao fundo da garrafa em WT (esquerda) do que em 2R (direita)

A seguir, metacíclicos de WT e de 2R foram avaliados quanto a lise pelo sistema complemento em uma diluição seriada de SNH. A população G 2R mostrou-se mais resistente à lise em todas as concentrações séricas (Fig 10 A). Foi avaliada também a capacidade de infecção destes parasitos à células mamíferas (VERO) usando MOI 10:1 ou 5:1 (metas:células), sendo que a quantidade de parasitos a cada 100 células foi superior nos parasitos 2R do que WT em todas as condições (Fig 10 B e C). Além disso, a capacidade de infecção dos parasitos de 2R manteve-se acima da WT mesmo na presença de SNH. (Fig 10 C).

A)

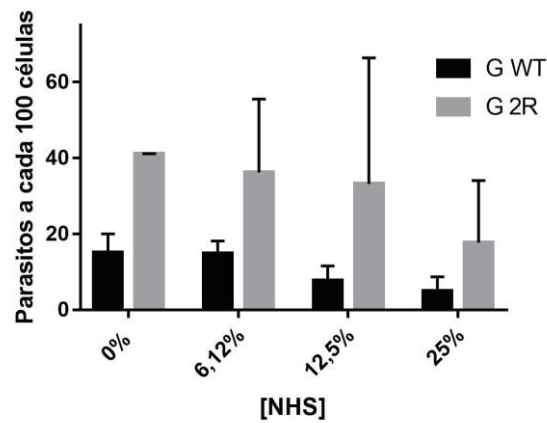
B)





C)

Figura 10. sobrevivência de metacíclicos de quanto a A) lise complemento em concentrações de invasão de em diferentes 25% SNH; C)



Comparação da tripomastigotas G WT versus G 2R pelo sistema diferentes de SNH por 1h; B) taxa metas em células VERO MOIs e na presença de taxa de invasão de metas em células VERO em MOI 10:1 sob diferentes concentrações de SNH

Tais resultados indicaram que foi possível selecionar uma população de parasitos mais resistente à lise pelo SNH e que também era mais infectiva à células mamíferas por meio da estratégia de exposição à sequências de alta concentração de SNH.

Com o intuito de investigar à fundo a estabilidade dessa população selecionada de parasitos, realizamos ensaios de lise pelo complemento em diferentes condições. Foi visto que ao longo do tempo essa população já não resistia aos ensaios de lise como nos ensaios iniciais (Fig 11).

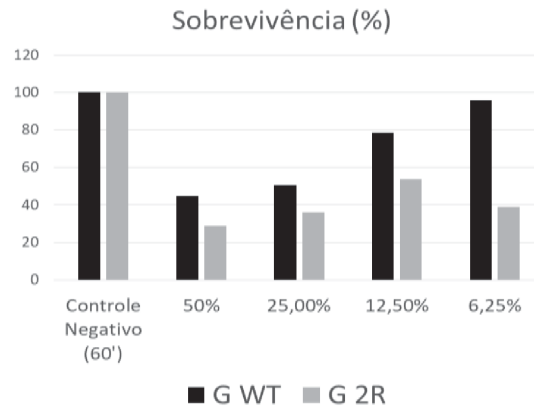
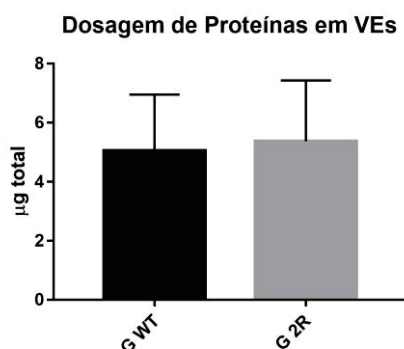


Figura 11. Comparação da sobrevivência de tripomastigotas metacíclicos de G WT versus G 2R quanto à lise pelo sistema complemento em diferentes concentrações de SNH por 1h.

Analisando a liberação de VEs obtidas a partir da interação entre metacíclicos e células THP1, foi visto que não havia aparentemente uma diferença na quantificação total de proteínas em VEs derivadas das duas populações como visto na figura 12 A (WT e 2R). Após determinar que havia instabilidade na resistência quanto à lise pelo complemento dos parasitos selecionados, fomos analisar o comportamento dessa população na presença de VEs. Primeiramente, vimos que os parasitos WT e 2R apresentavam similar sensibilidade a 25% de SNH na ausência de VEs. Interessantemente, foi visto que metacíclicos de G 2R tem maior sobrevivência que WT na presença VEs quando expostos a 25% de SNH. Curiosamente, tanto vesículas derivadas de parasitos WT quanto de parasitos G 2R foram capazes de favorecer a resistência dos parasitos à lise pelo SNH.

A)



B)

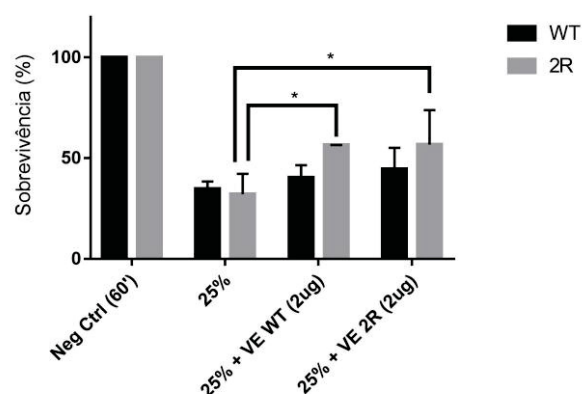


Figura 12. A) Quantificação de vesículas extracelulares obtidas a partir de  $1 \times 10^7$  metacíclicos WT e 2R em uma hora de indução a  $37^\circ\text{C}$  e 1 mM de  $\text{CaCl}_2$ . B) Avaliação da resistência ao Complemento de parasitos metacíclicos WT e 2R expostos a 25% de SNH por 60 min, na adição ou não de VEs derivadas de metacíclicos de G WT ou G 2R.

Para avaliar o efeito das VEs sobre o processo de invasão celular, nós utilizamos a técnica de microscopia time lapse, que consiste em gravar uma sequência de imagens de microscópio confocal e depois visualizá-las a uma velocidade maior para ter uma visão acelerada do processo microscópico. Para isso, foi utilizada a marcação fluorescente de VEs com Rhodamina B (vermelho) e de metacíclicos com CFSE (verde), e para visualização das células VERO aderidas foi usado DIC (Contraste Diferencial Interferencial). Os parasitos foram incubados em uma relação 10:1 (metacíclicos:VERO) por 3 horas e foram adicionados 3,5ug de VEs derivadas de metacíclicos WT ou 2R. As imagens foram obtidas a cada 4 min e reunidas em um vídeo acelerado de 27 segundos, representativo do tempo total de incubação. A figura 13 mostra as imagens feitas em intervalos de 3 segundos a partir do vídeo (totalizando os 9 primeiros segundos do vídeo), o que representa 1 hora da incubação. As marcações foram eficazes porém, analisando as imagens, julga-se necessário a adição de um marcador para entrada do parasito nas células. Além disso, para quantificação, será necessário realizar um ensaio de invasão convencional com adição de VEs, para marcação em Giemsa.



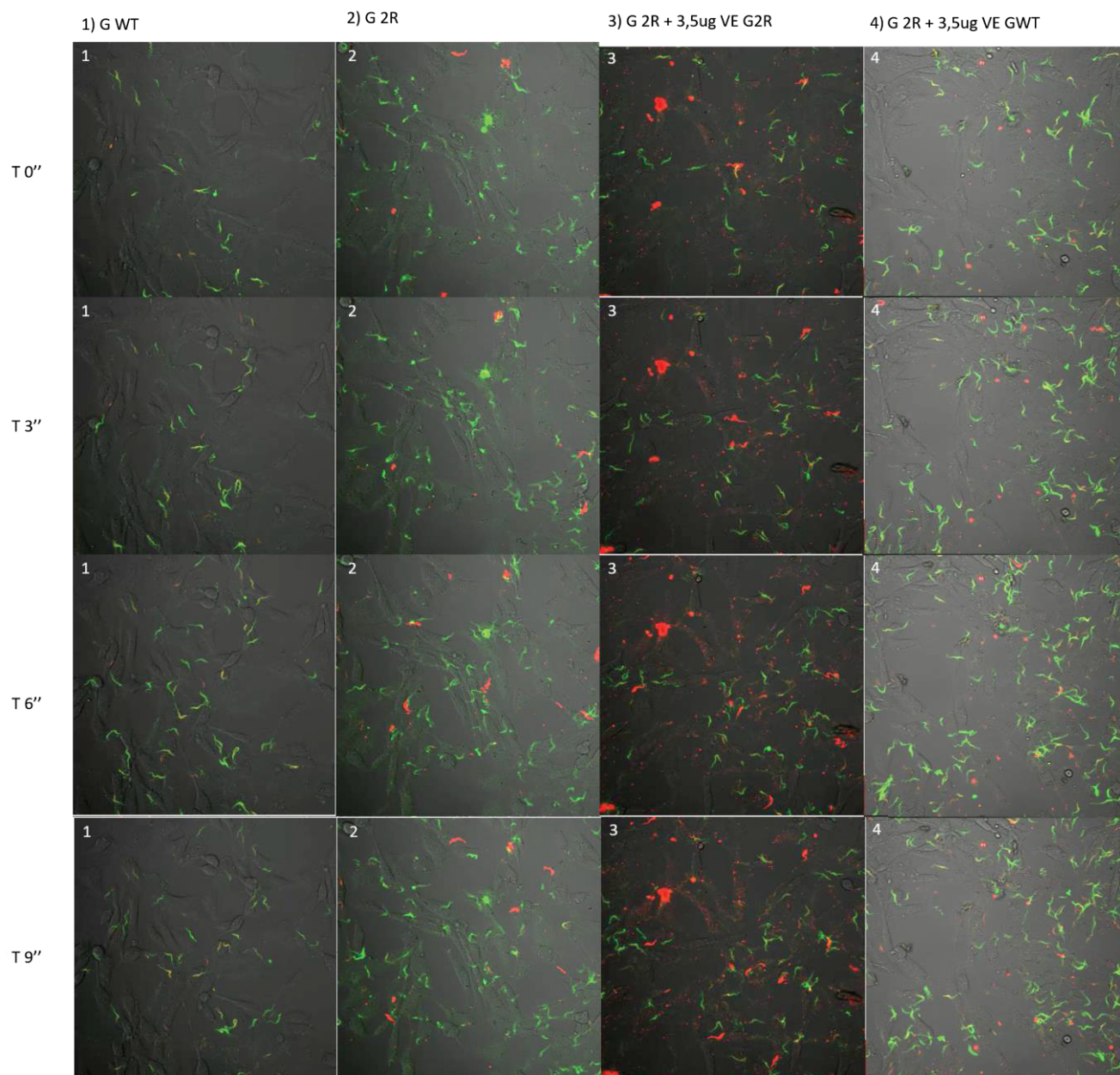


Figura 13. Sequência de imagens capturadas durante o ensaio de invasão em microscopia time lapse. As VEs foram marcadas com Rhodamina B (vermelho) e metacíclicos com CFSE (verde). Para visualização das células VERO aderidas foi usado DIC (Contraste Diferencial Interferencial). Os parasitos foram incubados em uma relação 10:1 (metacíclicos:VERO) por 3 horas e as imagens foram obtidas a cada 4 min e reunidas em um vídeo acelerado de 27 segundos, representativo do

tempo total de incubação. A sequência de imagens foi feita em intervalos de 3 segundos a partir do vídeo (totalizando os 9 primeiros segundos do vídeo), o que representa 1 hora da incubação.

Com o indicativo de que a resistência do parasito selecionado é instável, nós questionamos a possibilidade de que essa resistência havia sido uma resposta transitória do parasito que se perderia ao longo do tempo na ausência do estímulo. Para tentar responder se era essencial a presença do estímulo para o fenótipo de maior resistência, nós cultivamos epimastigotas da cepa G selvagem e da população selecionada (2R) por 13 subculturas na presença de 5% de SNH. Após os 13 repiques, os parasitos foram lavados e cultivados por 2 dias em meio LIT completo na ausência de SNH. Então, os parasitos epimastigotas mantidos sob pressão de SNH foram testados quanto à lise pelo sistema complemento na concentração de 12,5% de SNH por 15 e 30 min, e foi avaliada a ativação da Via Alternativa do complemento utilizando SNH adicionado de EGTA e  $Mg^{+2}$ . Observou-se que, tanto na ativação de todas as vias do complemento com SNH ou na ativação de somente a Via Alternativa, o parasito WT apresentou maior sobrevivência em comparação ao 2R, o que mostra que o estímulo da pressão de SNH não foi suficiente para que o parasito selecionado retomasse sua resistência.

Sobrevivência (%)				
Tempo	Cepa G WT		Cepa G 2R	
	SNH	EGTA	SNH	EGTA
Neg				
Ctrl (30')	100	100	100	100
15'	11	100	0	78
30'	1	57	0	26

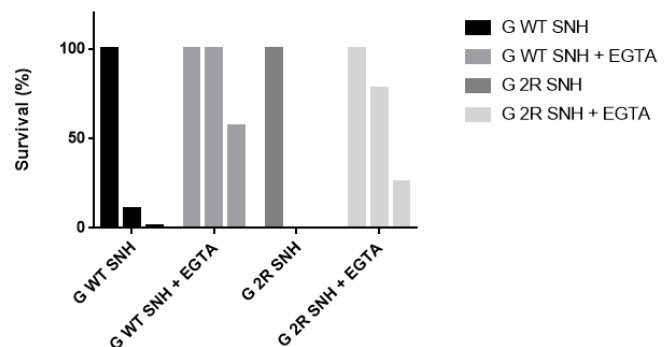



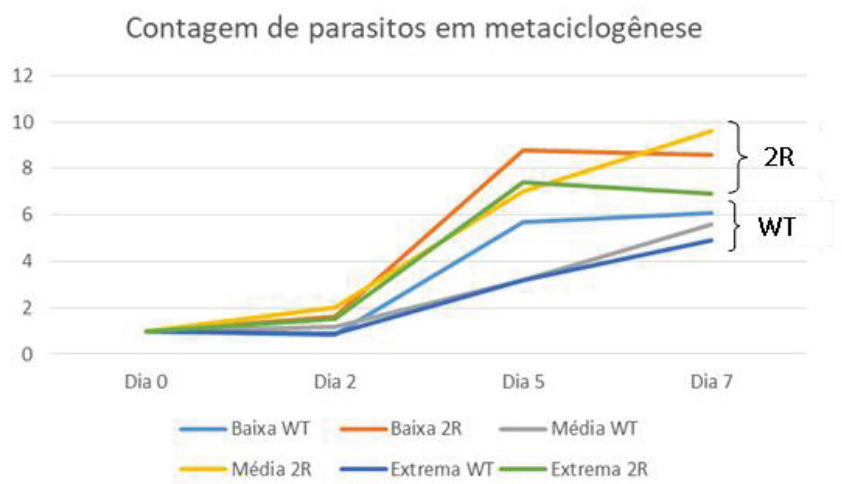




Figura 14. Avaliação da sensibilidade dos parasitos WT e 2R ao sistema complemento (ativação de todas as vias – SNH ou ativação somente da Via Alternativa – SNH + EGTA +  $Mg^{+2}$ )

Os dados mostraram que a população 2R apresenta uma maior viabilidade em meio de metaciclogênese e submetidos à lise pelo SNH é mais sensível. Uma possível explicação seria que os parasitos 2R não estavam sofrendo um estímulo suficiente para sua diferenciação ou que os parasitos requeiram uma carência nutricional maior para indução da metaciclogênese. Então, haveria a possibilidade desta população não sofrer metaciclogênese completa, apresentando-se como formas intermediárias entre epimastigotas e metacíclicos na purificação, o que levaria a uma maior sensibilidade desses parasitos ao complemento. Para tentar avaliar se tratava-se de uma questão de falta de estímulo para diferenciação, nós procedemos metaciclogêneses dos parasitos WT e 2R em diferentes condições de estresse nutricional, no qual as proporções de volume adicionado de meio suplementado com SFB em relação ao volume final eram de 16,6%, 6,25% e 3,2%. Os parasitos foram incubados por 7 dias e foi feita a contagem de parasitos não aderidos ao fundo da garrafa (nadantes) durante o período de metaciclogênese. Foi visto que em todas as condições, a contagem total de parasitos nadantes no volume da garrafa era maior em G 2R do que em WT. Além disso, o rendimento total da purificação dos metacíclicos foi maior em G 2R nas condições de média e extrema carência. Foi visto que ambas populações apresentaram maior rendimento da purificação de metacíclicos na condição de extrema carência. Os metacíclicos WT e 2R diferenciados nas 3 condições foram testados quanto à resistência ao SNH e vimos que, independente da condição de metaciclogênese, os parasitos de 2R apresentaram-se mais sensíveis ao complemento.

Maior carência nutricional		
Baixa	Média	Extrema
$1 \times 10^8$ epis 15 mL Tc100 3mL LIT 16,6%	$1 \times 10^8$ epis 15 mL Tc100 1mL LIT 6,25%	$1 \times 10^8$ epis 15 mL Tc100 0,5mL LIT 3,2%
WT    2R 	WT    2R 	WT    2R 



Condição	Rendimento Total Purificação (x10 <sup>7</sup> )	
Baixa	WT	2
	2R	1,2
Média	WT	1,6
	2R	7,3
Extrema	WT	5,7
	2R	14,5

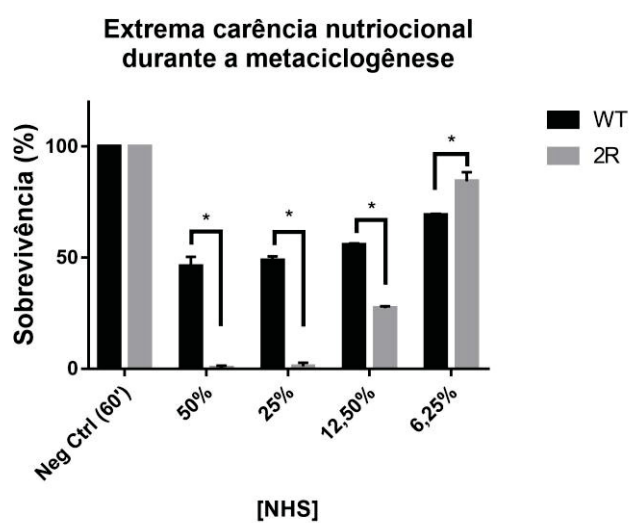
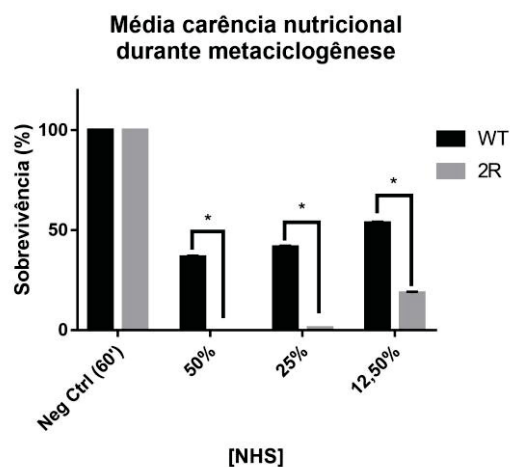
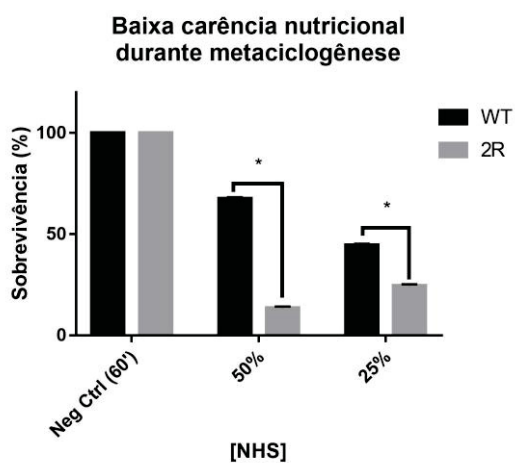
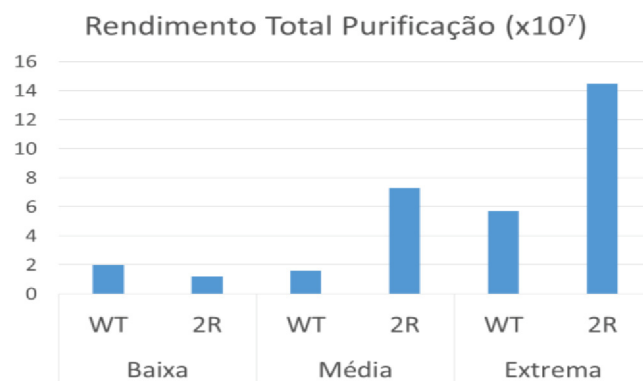
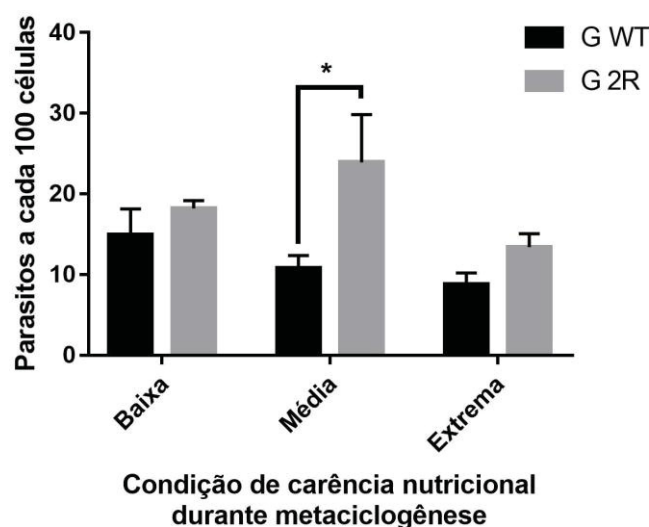
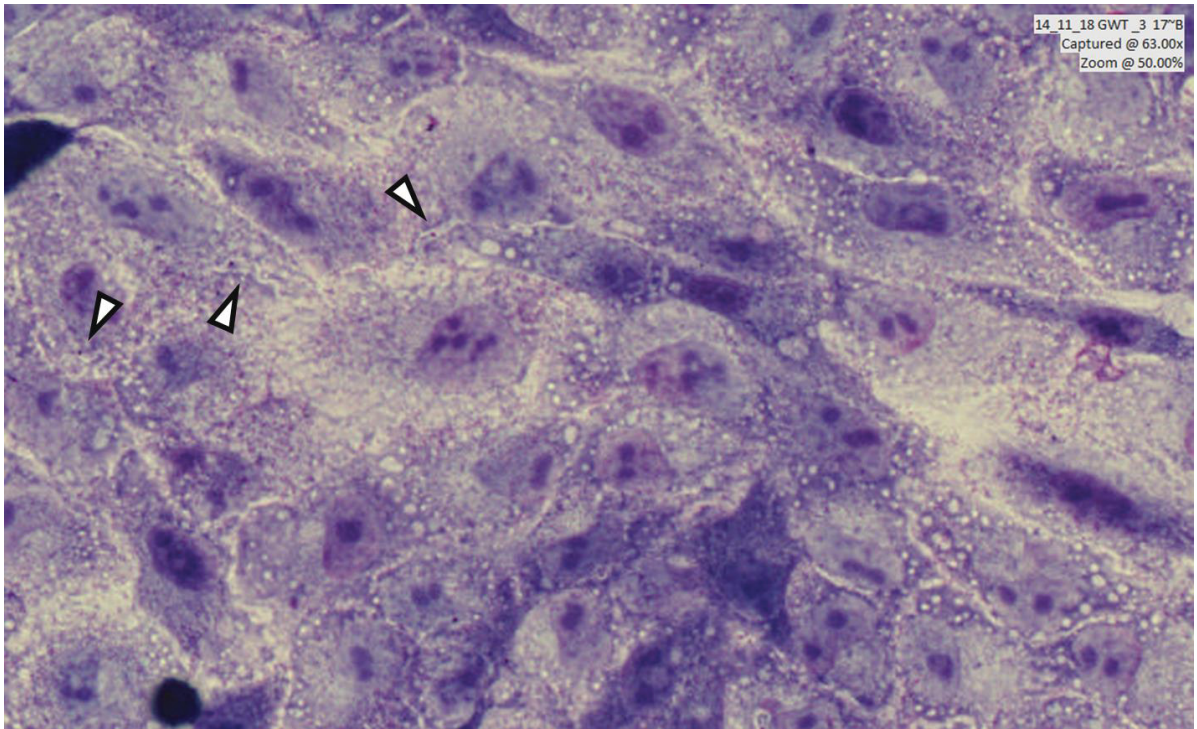


Figura 15. A) Representação esquemática das condições de carência nutricional durante a metaciclologênese para os parasitos da população G WT e G 2R, por 7 dias. B) Rendimento total da purificação de metacíclicos (metacíclicos  $\times 10^7$  total) nas três condições de carência nutricional durante a metaciclologênese (baixa, média e extrema). C) Contagem dos parasitos natantes em meio de metaciclologênese nos dias 2, 5 e 7 após a incubação. D) Avaliação da sobrevivência dos parasitos metacíclicos de WT e 2R na presença de diferentes concentrações de SNH durante 1 hora de incubação.

Após averiguar que a população 2R perdeu a estabilidade quanto à resistência ao complemento e tornou-se mais sensível, fomos avaliar também a estabilidade do fenótipo de maior infectividade desses parasitos. Nós avaliamos as taxas de invasão dos parasitos que passaram pela metaciclologênese nas três diferentes condições de diferenciação. Os parasitos foram incubados com células VERO em uma relação de 10:1 (metacíclicos : VERO) durante 3 horas de infecção. Foi visto que a contagem de parasitos a cada 100 células VERO foi maior na população 2R em todas as condições de metaciclologênese, sendo que os parasitos expostos a média carência durante a metaciclologênese obtiveram a maior taxa de infecção, 121,9% maior na população 2R em comparação a WT.







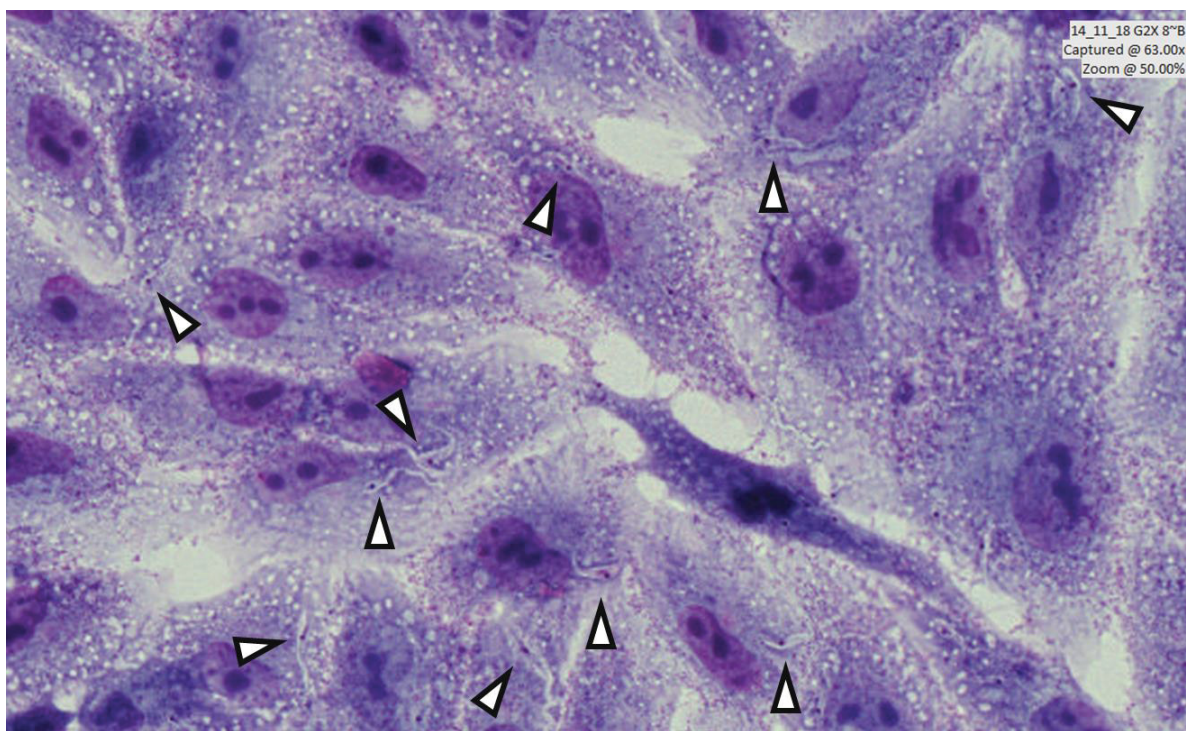


Figura 16. A) Comparação da taxa de invasão de metacíclicos à células VERO em MOI 10:1. Foi avaliada a taxa de invasão de metacíclicos diferenciados nas três condições de carência nutricional durante a metaciclogênese (baixa, média e extrema carência nutricional). B e C) Imagens de microscopia do ensaio de invasão em ampliação de 500x, sendo os metacíclicos de B) WT e C) 2R provenientes da metaciclogênese em condição média de carência nutricional.

Como a população selecionada apresentava-se mais infectiva à células VERO em comparação ao WT, nós decidimos avaliar a expressão da glicoproteína

GP82 dos dois grupos, molécula específica de metacíclicos que participa no processo de invasão celular. Para isso, foi usada a técnica de Western Blotting com lisados dos parasitos obtidos em 4 etapas da diferenciação de *T. cruzi*: 1) epimastigotas em início de curva de crescimento (com concentração de aproximadamente  $1 \times 10^6$ /mL); 2) epimastigotas em fase estacionária da curva de crescimento (aproximadamente  $2 \times 10^7$ /mL); 3) parasitos em diferenciação após dois dias incubados em meio de metaciclogênese; 4) metacíclicos purificados por coluna de DEAE celulose (Figura 17). Para preparação do lisado, foram utilizados  $5 \times 10^6$  parasitos totais de cada condição. A revelação da membrana de nitrocelulose foi feita utilizando o anticorpo 3F6. Algumas falhas técnicas impediram que as amostras migrassem adequadamente no gel de poliacrilamida, acarretando na identificação da banda de GP82 abaixo do esperado (82kDa) e bandas difusas. Porém, este resultado preliminar aponta que as amostras provenientes de G 2R apresentaram maior marcação com o anticorpo 3F6, principalmente a última amostra aplicada, correspondente aos metacíclicos de G2R. Para averiguação da marcação adequada e quantificação, este ensaio deverá ser repetido.

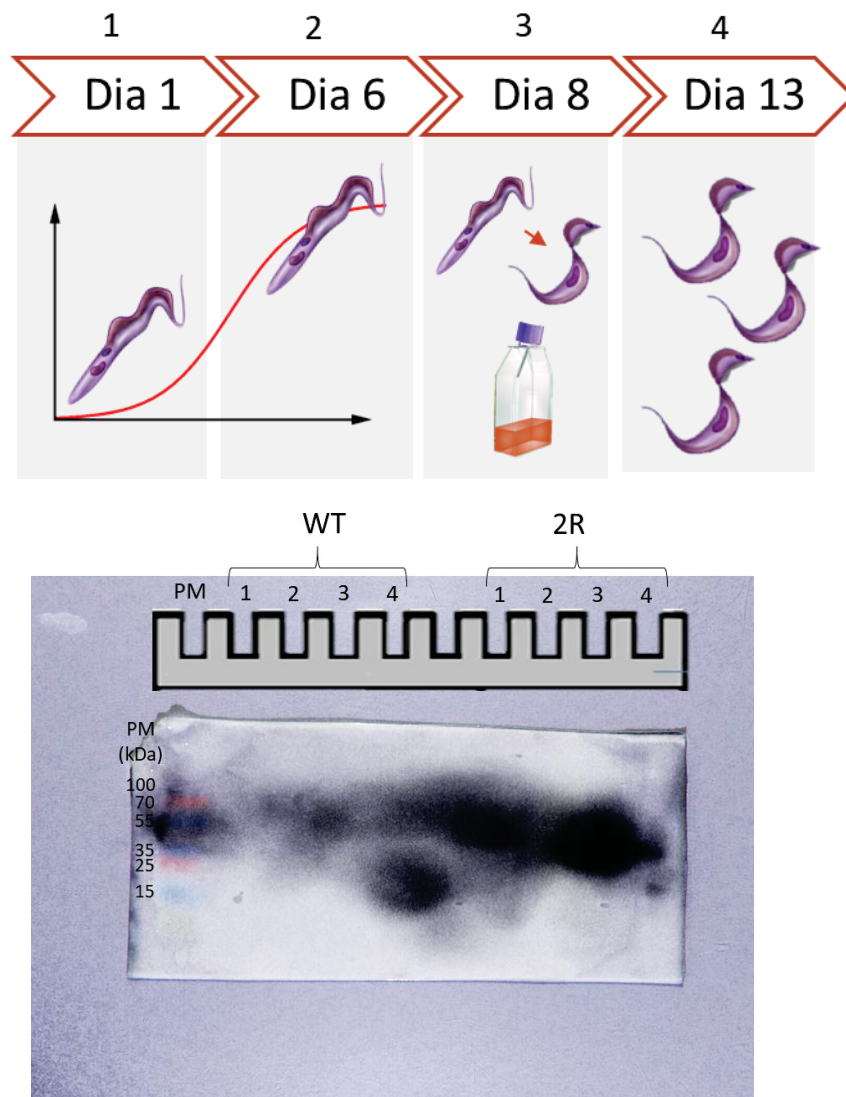


Figura 17. A) Representação esquemática da obtenção dos parasitos em 4 etapas da diferenciação de *T. cruzi* para western blotting: 1) epimastigotas em início de curva de crescimento (com concentração de aproximadamente  $1 \times 10^6$ /mL); 2) epimastigotas em fase estacionária da curva de crescimento (aproximadamente  $2 \times 10^7$ /mL); 3) parasitos em diferenciação após dois dias incubados em meio de metaciclôgênese; 4) metacíclicos purificados por coluna de DEAE celulose. B) Western Blot dos parasitos de G WT e G 2R obtidos nos 4 momentos de diferenciação.



## Capítulo II: Ativação do Sistema Imune por VEs

Para avaliar qual era a capacidade das VEs de *T. cruzi* em modular o sistema imune, foram realizados ensaios de tratamento de células dendríticas (CDs) imaturas com VEs derivadas da interação de parasitos metacíclicos das cepas G e Y com THP1 e avaliação da produção de citocinas estimuladas por VEs. Foi avaliado o estado de ativação/diferenciação e funcionalidade de Células dendríticas (CDs) derivadas de medula óssea pela expressão dos marcadores de superfície MHCII e CD86 em citometria de fluxo. Foi possível observar que as VEs ativaram levemente as CDs pela maior coexpressão de CD86 e MHCII em comparação aos controles. As VEs provenientes da interação da cepa Y com células THP-1 aumentou marcadamente a ativação de CDs na concentração de 10 ug. Para observar se o tipo celular participante na geração das VEs seria importante para ativação das CDs foram obtidas VEs provenientes da interação de metacíclicos da cepa G com células VERO. Não houve diferença na ativação de CDs estimuladas com VEs de metacíclicos-THP1 ou metacíclicos-VERO (Figura 18).

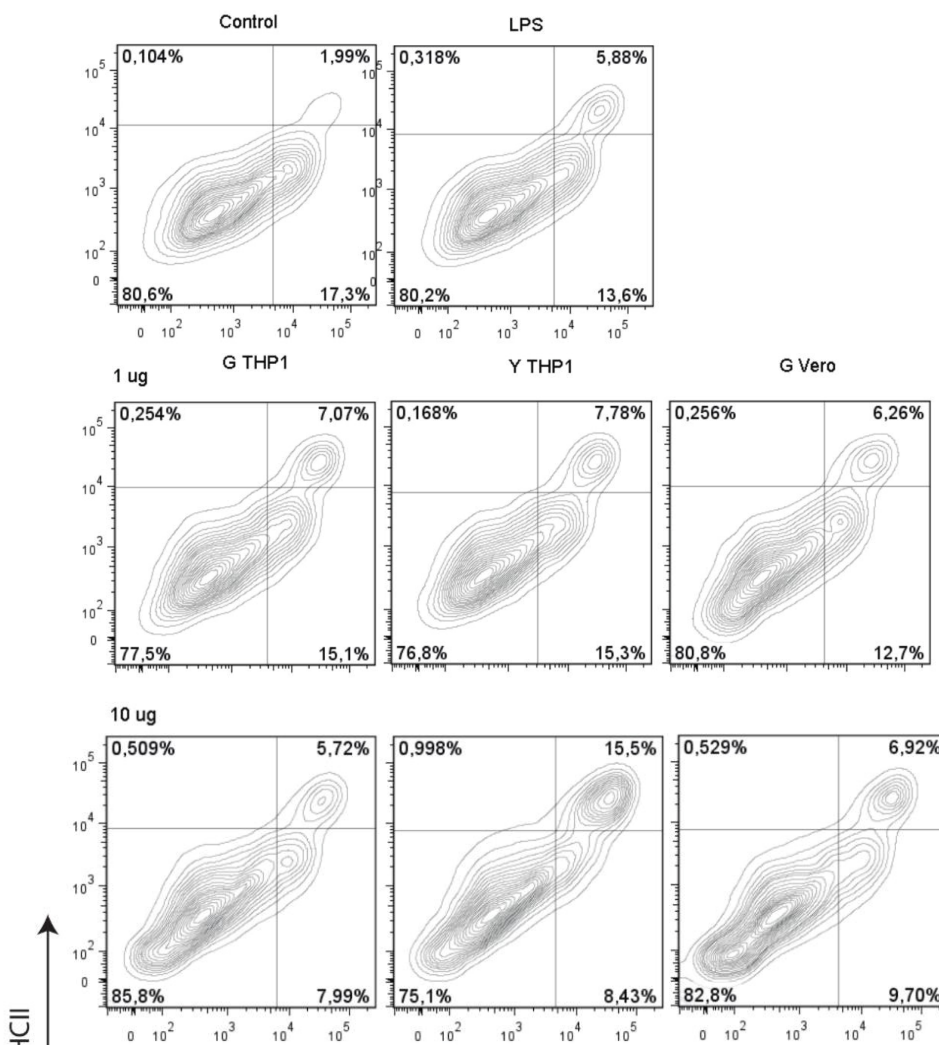
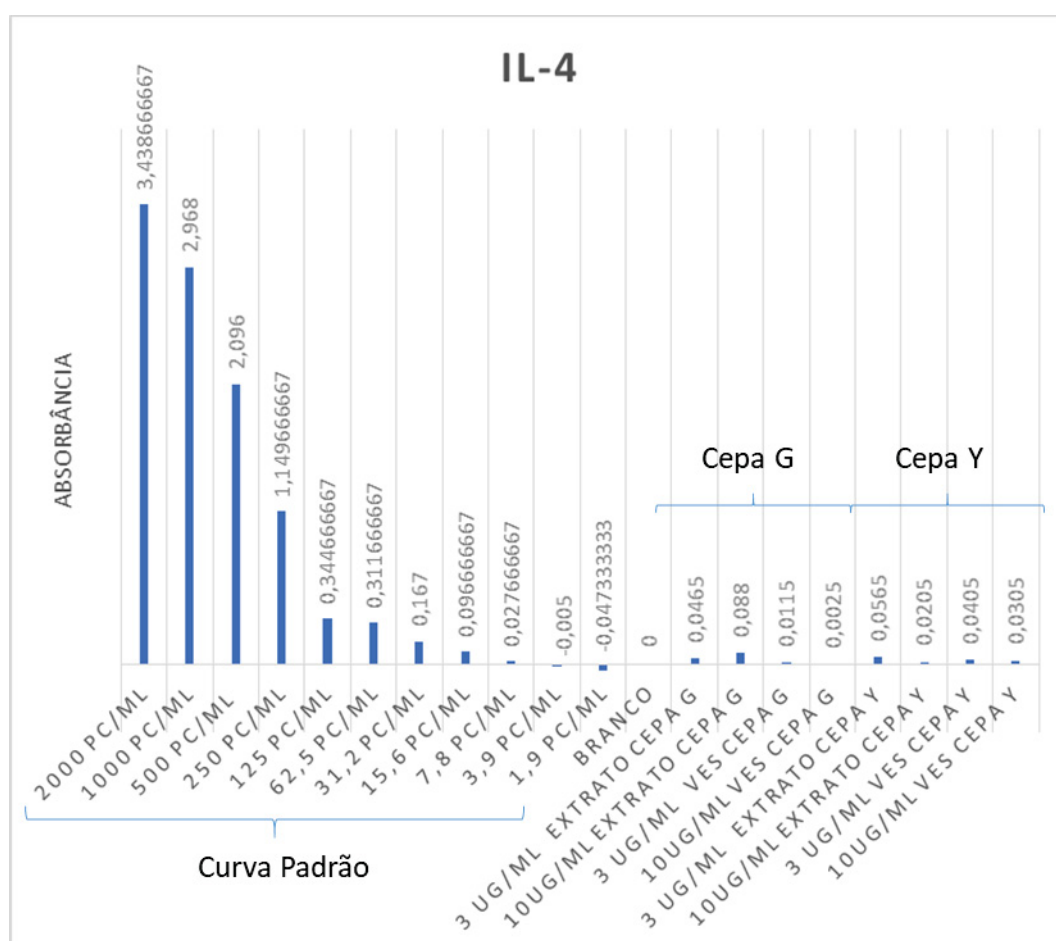
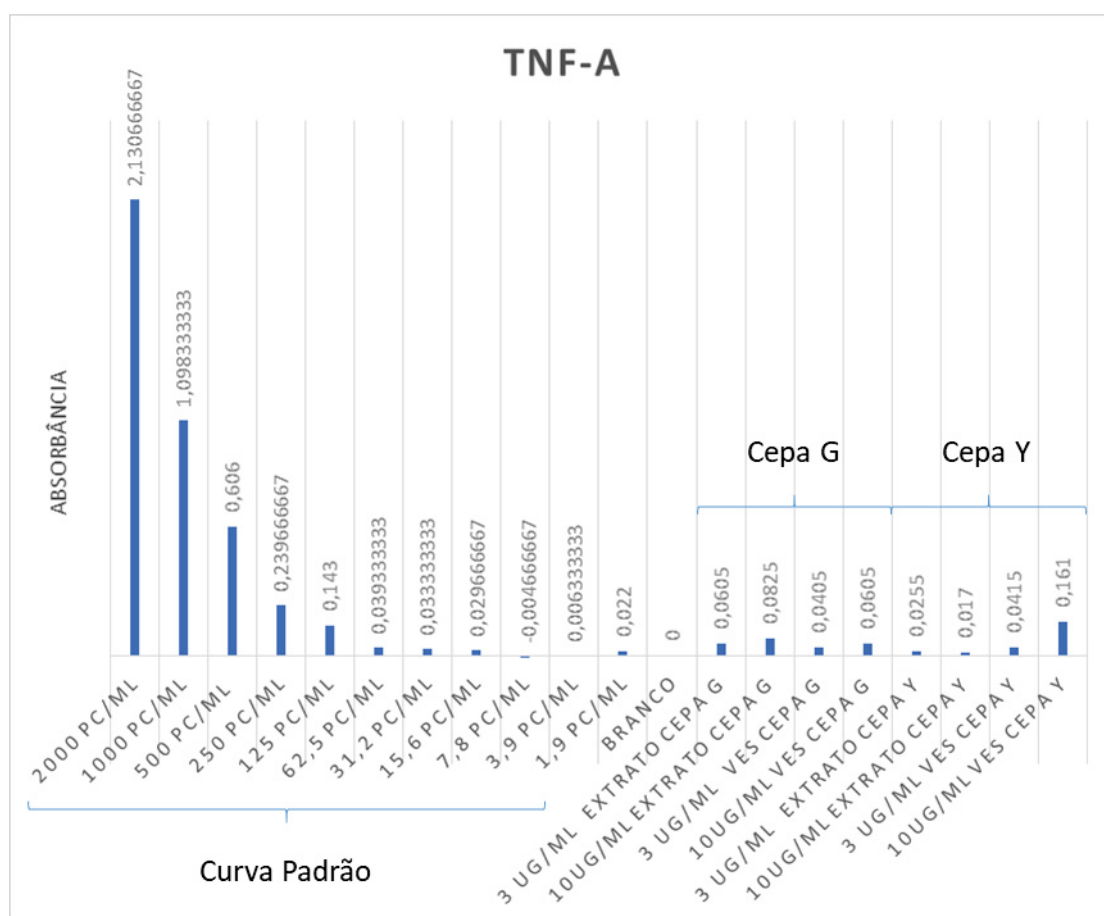


Figura 18. Análise da coexpressão de CD86 e MHC II por CDs estimuladas por 1 e 10 ug de VEs derivadas da interação de metacíclicos da cepa C ou Y com células THP1 ou de cepa G com células VERO.

Foi avaliada também a capacidade das VEs em induzir a produção de citocinas, tanto por CDs quanto por macrófagos. À respeito da liberação de citocinas por CDs, foram avaliadas as citocinas IL-10 e TNFa, porém os níveis ficaram abaixo do limite de detecção do método. O perfil de liberação de citocinas em resposta às VEs foi avaliado também em macrófagos. As citocinas avaliadas foram: INF G, TNF a, IL-6, IL-4 e IL-17. Os níveis de liberação de citocinas foram baixos em todas as condições, inclusive no tratamento com extrato parasitário. Apesar das pequenas diferenças entre as condições, foi possível perceber que a indução da produção de TNFa por VEs da cepa Y foi maior do que o extrato de parasitos correspondente, tanto em 3 quanto em 10 ug de tratamento (Figura 18 B). Parte das dosagens ficou abaixo do limiar de detecção da técnica, portanto para maiores interpretações o ensaio deve ser repetido utilizando maiores concentrações de extrato parasitário e VEs.



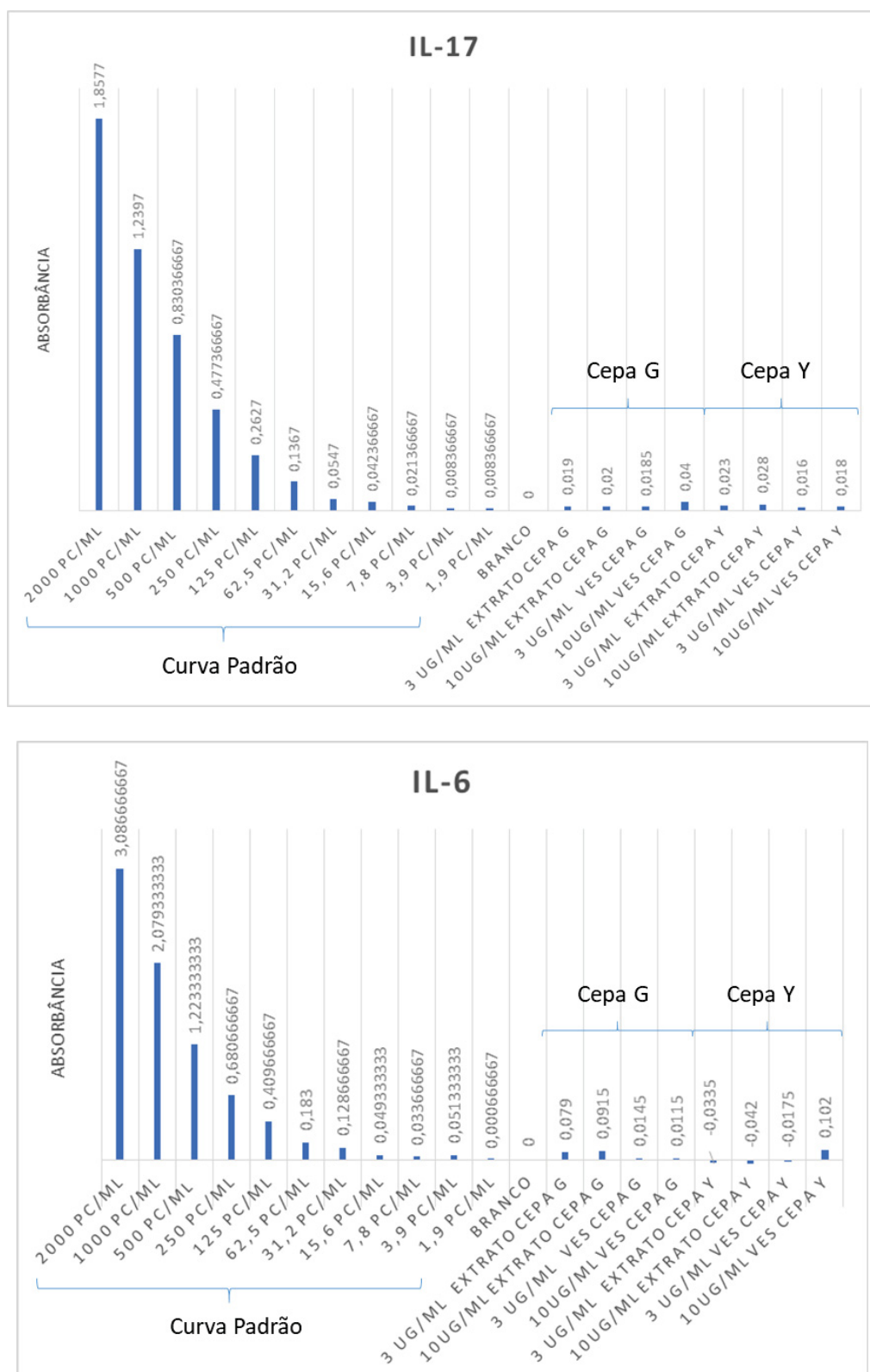


Figura 19. Dosagem da produção de citocinas (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-4 e IL-17) por macrófagos derivados de THP1 na presença de 3 ou 10ug de extrato de metacíclicos

de cepa G ou Y e de VEs derivadas da interação de metacíclicos de G ou Y com THP1.

## 6 DISCUSSÃO

Os tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi*, ao entrarem na corrente sanguínea, enfrentam um momento crítico para o sucesso da infecção: precisam evadir ao sistema complemento e rapidamente invadir células do hospedeiro. Os mecanismos envolvidos na evasão da ação do sistema imune são multifatoriais e nesta dissertação analisamos principalmente a liberação de VEs. Utilizando a estratégia de seleção de parasitos mais resistentes à lise pelo sistema complemento conseguimos analisar o modelo parasitário no seu perfil fenotípico de resistência à lise mediada pelo complemento e de invasão a células eucarióticas e associar a liberação de VEs como mecanismo de proteção à lise pelo SNH. Através dessa dissertação, obtivemos as seguintes evidências:

- É possível selecionar uma população de parasitos mais resistentes ao SNH

As estratégias seguidas para seleção de uma população mais resistente poderiam seguir diferentes critérios: ou selecionar uma população que resistisse a constante exposição ao SNH a longo prazo ou selecionar uma população com um choque de alta concentração de SNH durante curto prazo, e permitir que esta população se recupere na ausência de SNH.

Na estratégia de longa e constante exposição ao SNH, haveria a possibilidade do parasito responder e se adaptar ao estresse para sobreviver, enquanto que, na estratégia de rápido choque com alta concentração de SNH, somente sobreviveriam aqueles que já estivessem mais aptos a resistir ao sistema complemento. Além disso, haveria a possibilidade de que o efeito fosse transiente e o fenótipo perdido ao longo dos subcultivos do parasito. Feita as considerações acima, as metodologias empregadas para seleção da população mais resistentes variaram entre i) exposição contínua e longa ao SNH e ii) choque de alta concentração de SNH. Por limitações experimentais, as estratégias de exposição contínua a SNH não obtiveram sucesso, porém a estratégia de choque de alta concentração de SNH foi capaz de selecionar uma população mais resistente ao SNH.

A atuação do sistema complemento é um dos mecanismos mais efetivos da defesa inata contra patógenos. Sabe-se que mesmo sendo a forma infectiva de *T.*

*cruzi*, os tripomastigotas metacíclicos de diversas cepas são mortos pelo complemento com soro não imune (CESTARI e RAMIREZ, 2010).

Ao tentar selecionar parasitos mais resistentes à lise pelo SNH, foram utilizados epimastigotas mantidos em cultura axênica. *T. cruzi* tem sido considerado um organismo clonal que se replica por fissão binária e no qual novos clones se desenvolvem a partir do acúmulo de mutações discretas (Tibayrenc and Ayala, 2002), e ainda existe diversidade genética de *T. cruzi* e da heterogeneidade das populações, mesmo entre uma cepa. Hipotetiza-se que, no hospedeiro, o sistema imune seja capaz de selecionar uma população de parasitos, o que foi sugerido a partir da análise de dois isolados de *T. cruzi* provenientes da paciente Berenice (o primeiro caso humano de doença de Chagas (Chagas, 1909) coletados em dois períodos de sua vida: um aos 55 anos e outros aos 71 anos de idade. O estudo aponta que os isolados em tempos diferentes da vida da mesma paciente apresentaram diferenças quanto ao perfil eletroforético por digestão do DNA do cinetoplasto e do padrão de isoenzimas (LANA, 1996). Portanto, partiu-se do princípio de que, dentro da diversidade populacional de epimastigotas, parte deles se apresentariam mais resistentes ao SNH que outros. Nesse sentido, a seleção de uma população de 30% de parasitos que resistissem a um choque de alta concentração de SNH manteria uma pequena parcela dos parasitos que já apresentam a característica de maior resistência. Em tripomastigotas sanguíneos, a avaliação da sensibilidade ao complemento por meio de seleções foi estudada da seguinte maneira: tripomastigotas sanguíneos (cepa Tulahuen) foram purificados a partir de camundongos infectados e expostos por 1h a soro imune de porco da Índia, e foi visto que o percentual de lise de parasitos não variou significativamente mesmo aumentando a concentração de parasitos. Esses resultados apontaram para a possibilidade de haver subpopulações de organismos resistentes à lise. Porém, quando os tripomastigotas eram incubados com soro imune inativado por calor adicionado soro não imune, por 1 hora e então lavados e testados novamente em testes de lise, houve aumento na proporção de parasitos mortos. Foi visto que a parasitemia de animais infectados com parasitos que sobreviveram a lise pelo soro foi menor em comparação as parasitemias de animais infectados com parasitos controle. O que indica que a lise dos parasitos é dependente da natureza da

variabilidade do sistema imune do hospedeiro. Além disso, três gerações de parasitos coletados de camundongos infectados por inóculos de parasitos que resistiram à lise pelo soro permaneceram com níveis similares de sensibilidade ao soro (KIERSZENBAUM e RAMIREZ, 1990).

- A resistência ao sistema complemento é transiente e se torna instável ao longo do tempo

A seleção de parasitos mais resistentes à lise pelo SNH e mais infectivos do que a população originária também traz a questão de que esse fenótipo poderia se tratar de uma resposta do parasito ao estresse a que foi sujeito durante a seleção. Em todos os estágios de vida do parasito, *T. cruzi* encontra ambientes hostis, com alteração de pH, temperatura, disponibilidade de nutrientes, presença de componentes do soro e de células imune. Assim, os parasitos apresentam respostas adaptativas (fisiológicas, genéticas ou epigenéticas) para contornar essas situações de estresse. Em *Leishmania* sp., foi observado que promastigotas e amastigotas conseguem funcionar melhor com o valor de pH ambiental mesmo que haja uma variação de 2 unidades de pH entre o pH intracelular e extracelular. Isso sugere que os parasitos possuam mecanismos para detectar mudanças no pH ambiental e consigam se adaptar a ele. Esta hipótese foi avaliada através do exame das atividades celulares e características de promastigotas de *L. donovani*, *L. major* e *L. mexicana amazonensis* mantidas em cultura por longos períodos em pH 4,5, 5,0 e 6,0. Os promastigotas adaptados ao crescimento a pH 4,5 exibiram nesse valor um tempo de duplicação 1,6 vezes superior ao correspondente mantido e crescido a pH 7. Quando promastigotas adaptadas para pH 4,5 foram levadas à cultura em pH 7, seu tempo de geração voltou em poucas horas para o das células originais em pH 7. Esta reversibilidade dos tempos de duplicação indica que a adaptação da taxa de crescimento dos promastigotas ao pH é fenotípico e não genético (ZILBERSTEIN et al., 1991; ZILBERSTEIN e SHAPIRA, 1994).

Em *T. cruzi*, foram vistas alterações morfológicas, ultraestruturais e fisiológicas produzidas quando epimastigotas foram expostas a estresse ácido, nutricional, oxidativo e de temperatura. Alterações morfológicas claras foram observadas, e a



manutenção do estado fisiológico do parasito foi severamente afetada. Foi visto que os parasitos foram capazes de recuperar seu crescimento normal após os danos, exibindo a capacidade de se adaptarem à essas condições adversas (PEREZ-MORALES et al., 2017).

Sabe-se que, durante a diferenciação de epimastigotas para metacíclicos de *T. cruzi*, o parasito sofre uma grande alteração na composição de sua membrana, principalmente com o aumento da expressão de proteínas ancoradas à GPI responsáveis pela interação com o sistema imunológico e resistência dos parasitos (ACOSTA-SERRANO et al., 2001; BUSCAGLIA et al., 2006; BERNÁ et al., 2017; GODOY et al., 2012). Assim, nós hipotetizamos que a população selecionada poderia estar mais sensível ao complemento por não sofrer estímulo suficiente para a diferenciação. Decidimos testar a hipótese de que a maior carência nutricional durante o processo de diferenciação estaria modulando a sensibilidade dos parasitos ao complemento. Foi visto que a maior exigência nutricional não foi suficiente para alterar a sensibilidade dos parasitos ao SNH (Fig. 15). Apesar disso, a capacidade de infecção de células eucarióticas foi maior na população selecionada nas três condições de metaciclogênese (Fig. 16A).

Um ponto analisado foi se a pressão constante de SNH durante o crescimento do parasito era necessária para estimular a resistência do parasito ao sistema complemento. Não foi vista a recuperação do fenótipo de resistência após exposição do parasito ao SNH, o que nos indica que a resistência do parasito não depende apenas de uma resposta a um estímulo ambiental, mas sim de componentes genéticos próprios do parasito e/ou outros mecanismos não completamente entendidos.

- Os parasitos selecionados são mais infectivos

Comparando as populações de parasitos WT e 2R na capacidade de infectar células eucarióticas, sempre os parasitos selecionados mostraram-se mais infectivos. Isto pode ser devido ao parasito colocar como prioridade para sua sobrevivência invadir as células. O nosso grupo já tinha observado essas propriedades das formas metacíclicas anteriormente (CESTARI; RAMIREZ, 2010). Desta maneira, a análise da

expressão dos genes associados a invasão durante a seleção poderá ser esclarecedor. Os resultados preliminares de expressão de GP82, a principal molécula envolvida com a invasão de formas metacíclicas de *T. cruzi* (RAMIREZ et al, 1993) demonstram uma tendência de maior expressão de GP82 na população selecionada, como visto no western blotting usando o anticorpo monoclonal 3F6 (Fig 17B).

Uma das nossas hipóteses para explicar a instabilidade que existe nas populações selecionadas a resistência pelo complemento poderia estar associada a dinâmica de membrana plasmática. Os efeitos de mudança de expressão de genes associados a resistência ao complemento, como calreticulina ou CRIT, envolvem moléculas que não são altamente expressas pelos parasitas e talvez a sua expressão aumentada seja apenas transitória ou insuficiente para manter o fenótipo de resistência a longo prazo. No entanto as moléculas associadas a invasão (GP82, GP90, GP35/50) são antígenos majoritários e o aumento da expressão destes poderia impossibilitar biofísicamente a inclusão de moléculas associadas a resistência na membrana. Devido a ausência de promotores de RNA polimerase II, a sobreexpressão de genes em *T. cruzi* através de técnicas de biologia molecular faz com que a expressão não seja muito aumentada, o que dificulta a visualização de mudanças bruscas na dinâmica de membrana do parasito. No entanto, os trabalhos pioneiros de de Jesus et al. (1993) com mutantes nulos de GP72 em *T. cruzi* mostraram que a alteração da expressão de uma molécula de citoesqueleto pode induzir uma alteração morfológica no flagelo dos parasitos, o que explicaria um rearranjo de moléculas alterando a estabilidade da membrana e não apenas a ausência funcional da molécula.

- As VEs derivadas da interação metacíclico-THP1 são capazes de promover maior resistência ao sistema complemento

Por análises proteômicas baseadas em cromatografia em fase gasosa e espectrometria de massas, as VEs de tripomastigotas derivados de cultura celular das cepas Y e YuYu mostraram que a maioria das proteínas identificadas em VEs correspondem a membros da superfamília trans-sialidase, seguidos de mucinas, MASPs e proteases de superfície GP63 (RIBEIRO et al., 2018). Os autores

demonstraram que as VEs de uma cepa foram capazes de aumentar a infectividade dos parasitos da outra cepa. Por outro lado, Cestari et al. (2012) demonstraram que as VEs liberadas pelas formas metacíclicas de *T. cruzi* são capazes de se ligarem à C3 convertase e inibir sua ativação catalítica, assim conferindo maior resistência aos parasitos na presença de SNH. Os autores demonstraram também que as VEs carregam TGF-B, contribuindo para o aumento da infecção de *T. cruzi* à células eucarióticas. Neste trabalho, nós mostramos que as VEs são capazes de aumentar a resistência dos parasitos à lise pelo sistema complemento (Fig 12). Foi visto que tanto as VEs derivadas da população WT quanto da selecionada foi capaz de aumentar a resistência dos metacíclicos à lise pelo SNH. Uma das hipóteses é que as alterações na composição da membrana dos parasitos selecionados podem propiciar uma maior atração para ligação das VEs à sua superfície. A ação das VEs no processo de invasão celular será avaliado em ensaios posteriores.

- Capítulo II: As VEs são capazes de modular o sistema imune

A principal função das células dendríticas é dar início à resposta imune adquirida. As CDs imaturas, que residem na maioria dos tecidos e órgãos, ativamente capturam e processam antígenos. Após sua ativação, elas migram aos nódulos linfáticos e ao baço, onde ativam células T naive. Durante essa migração, as CDs passam por um processo de maturação, para se tornarem células apresentadoras de antígeno (APC). Durante a maturação, as CDs perdem sua capacidade de capturar e processar antígenos e aumentam sua expressão de complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II e moléculas coestimulatórias (CD40, CD80, CD86) e adesão (CD54). Essas células também produzem citocinas, como a IL-12.

A infecção por *T. cruzi* consegue modular a resposta imunológica de seu hospedeiro para sua proteção. Planelles et al. demonstraram que macrófagos e CDs apresentaram sua função prejudicada após infecção por *T. cruzi*, de maneira que as CDs de camundongos de linhagem mais suscetível a infecção exibem menor coexpressão de CD40 e CD86 em comparação as linhagens mais resistentes.

Também foi demonstrado que a infecção aguda por *T. cruzi* em camundongos com a cepa virulenta RA, regula negativamente a expressão *in vivo* de MHC-II em células apresentadoras de antígenos, assim como prejudica a capacidade estimulatória de células T de CDs (ALBA-SOTO et al., 2003). De modo similar, Poncini et al (2008) mostraram que tripomastigotas são capazes de modular o estágio de diferenciação e a funcionalidade de CDs derivadas de medula óssea *in vitro*, sendo que as CDs tiveram baixa expressão de MHC-II e moléculas coestimulatórias. Overtvelt et al (1999) mostraram que CDs infectadas por *T. cruzi* exibem menores níveis de secreção de citocinas, como IL-12, TNF- $\alpha$  e IL-6, que normalmente são liberadas em altos níveis por CDs ativadas por LPS. Além disso, as moléculas HLA-DR e CD40 foram menos expressas por CDs na presença de *T. cruzi*. Os mesmos efeitos puderam ser induzidos pelo meio condicionado de *T. cruzi*, indicando que esses efeitos inibitórios podem ser mediados por fatores solúveis liberados pelo *T. cruzi*. Esses resultados estão de acordo com os nossos, nos quais foi demonstrado que as VEs exercem um pequeno estímulo sobre a coexpressão de CD86 e MHC II por CDs (Fig 18). Overtvelt et al (1999) apontaram que a dosagem de IL-6 e IL-10 liberada por CDs infectadas esteve abaixo do limite de detecção da técnica, assim como nosso ensaio de estímulo da liberação de citocinas por VEs obteve valores muito baixos. Nogueira et al. (2015) mostrou que as VEs derivadas de algumas cepas são capazes de induzir uma grande produção de TNF- $\alpha$ , sendo que outras cepas, como a cepa Y tiveram uma baixa indução de citocinas, o que concorda com nossos resultados experimentais.

## 7 CONCLUSÕES

Neste trabalho fomos capazes de selecionar uma população de parasitos de *Trypanosoma cruzi* mais resistentes à lise pelo Sistema complemento através da estratégia de exposição à altas concentrações de parasitos ao SNH por um curto período de tempo. Essa população selecionada mostrou-se mais resistente à lise pelo SNH inicialmente, porém foi descrita uma instabilidade deste fenótipo dos parasitos. Além da resistência ao SNH, foi avaliado que os parasitos selecionados apresentavam-se mais infectivos à células eucarióticas, sendo que este fenótipo foi estável ao longo do tempo. Sugere-se que a maior infectividade dos parasitos selecionado em comparação ao selvagem poderia estar associada à maior expressão de GP82, molécula de metacíclicos envolvida no processo de invasão celular.

Foi visto que VEs derivadas da interação entre metacíclicos e THP1 foram capazes de conferir maior resistência aos parasitos quando expostos ao SNH. As VEs derivadas da população selvagem também foi capaz de induzir um aumento na resistência dos parasitos selecionados, o que indicaria uma maior afinidade desses parasitos por VEs. O papel das VEs no processo de invasão celular ainda precisa ser elucidado.

Além disso, durante o trabalho foi visto que as VEs derivadas das cepas G e Y são capazes de ativar resposta de células dendríticas em baixos níveis e a produção de citocinas estimulada por VEs também se deu em baixas níveis.

Assim, conclui-se que os mecanismos de resistência à lise pelo complemento e de infecção de células eucarióticas por *T. cruzi* são complexos e dependem da dinâmica de interação entre os parasitos e hospedeiro.

## 8 PERSPECTIVAS

Para melhor interpretar os fenômenos aqui estudados e chegar a conclusões assertivas sobre o assunto, alguns experimentos deverão ser realizados:

- 1) Repetição do ensaio de western blotting para identificação da expressão de gp82 pelas duas populações utilizando o anticorpo monoclonal 3F6.
- 2) PCR quantitativo para avaliação de genes de resistência ao complemento (Calreticulina e CRIT) e genes estágio específicos de metacíclicos (gp82 e gp90) nas populações WT e 2R
- 3) Avaliação da infectividade de metacíclicos de WT e 2R na presença de SNH
- 4) Análise do efeito das VEs no processo de invasão celular de metacíclicos por experimento em transwell, no qual na câmara superior haverá a interação de metacíclicos com THP1 para produção de VEs e na inferior haverá a invasão de metacíclicos à células VERO.

## REFERÊNCIAS

ABRAHAMSOHN, I. A. Cytokines in innate and acquired immunity to *Trypanosoma cruzi* infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 1, p. 117-121, 1998.

ACOSTA-SERRANO, A et al. The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: structure and biological roles. **Mol Biochem Parasitol**. May;114(2):143-50, 2001.

ALBA SOTO, C. D., et al. *Trypanosoma cruzi* infection modulates in vivo expression of major histocompatibility complex class II molecules on antigen-presenting cells and T-cell stimulatory activity of dendritic cells in a strain-dependent manner. **Infect. Immun**. 711194-1199, 2003.

ALBERTTI, L. A. G. et al. Role of host lysosomal associated membrane protein (LAMP) in *Trypanosoma cruzi* invasion and intracellular development. *Microbes and Infection*, v. 12, p. 784-789, jun., 2010.

ALMEIDA, I. C. et al. Complement-mediated lysis of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes by human anti- $\alpha$ -galactosyl antibodies. **The Journal of Immunology**, v. 146, n. 7, p. 2394-2400, abr., 1991.

ALMEIDA, I. C. et al. Lytic anti-x-galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas' disease recognize novel O-linked oligosaccharides on mucin-like glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemistry Journal**, v. 304, p. 793-802, 1994.

ALMEIDA, I. C. et al. *Trypanosoma cruzi* Mucins: Potential Functions of a Complex Structure. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 94, Suppl. I: 173-176, 1999 173 Igor C Almeida/+, Ricardo Gazzinelli\*/\*\*, Michael AJ Ferguson\*\*\*, Luiz R Travassos\*\*\*\*

ALVES, Maria Júlia M.; COLLI, Walter. *Trypanosoma cruzi*: Adhesion to the Host Cell and Intracellular Survival. **Iubmb Life**, [s.l.], v. 59, n. 4, p.274-279, 2007.

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

ATWOOD, J. A. *et al.* The *Trypanosoma cruzi* proteome. **Science**, v. 309, p. 473-476, jul., 2005.

BARILE, Lucio; VASSALLI, Giuseppe. Exosomes: Therapy delivery tools and biomarkers of diseases. **Pharmacology & Therapeutics**, [s.l.], v. 174, p.63-78, jun. 2017.

BARTENEVA, Natasha S.; MALTSEV, Natalia; VOROBYEV, Ivan A.. Microvesicles and intercellular communication in the context of parasitism. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [s.l.], v. 3, p.1-15, 2013.

BARTHOLOMEU, D. C. *et al.* Genomic organization and expression profile of the mucin-associated surface protein (MASP) family of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 10, p. 3407-3417, mar., 2009.

Bautista-López N, Ndao M, Camargo FV, *et al.* Characterization and diagnostic application of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote excreted-secreted antigens shed in extracellular vesicles released from infected mammalian cells. **J Clin Microbiol** 55:744-758, 2017

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

BAYER-SANTOS, E. *et al.* Characterization of the small RNA content of *Trypanosoma cruzi* extracellular vesicles. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 193, n. 2, p. 71-74, fev., 2014.

BERMUDEZ, J. *et al.* Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Tropica**, v. 156, p. 1-16, 2016.

BERNÁ, Luisa *et al.* Transcriptomic analysis reveals metabolic switches and surface remodeling as key processes for stage transition in *Trypanosoma cruzi*. **Peerj**, [s.l.], v. 5, p.3017-3040, 8 mar. 2017.

BONNEY, K.M. Chagas Disease in the 21st Century: a public health success or an emerging threat?. **Parasite**. v. 21, n. 11, mar., 2014.



BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma Cruzi*. **Annual Review Of Microbiology**, [s.l.], v. 27, n. 1, p.347-382, out. 1973. Annual Reviews.

BUSCAGLIA, C. A. *et al.* *Trypanosoma cruzi* surface mucins:host-dependent coat diversity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 229-236, fev., 2006.

BURLEIGH; BA; ANDREWS, NW. Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Curr Opin Microbiol**. 1998 Aug;1(4):461-5.

CAMARGO, E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 6, n. 3, p. 93–100, jun.,1964.

CAMPOS, J. H. Extracellular vesicles:role in inflammatory responses and potential uses in vaccination in cancer and infectious diseases. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, ago., 2015.

CARRERA-SILVA, E. A.; Gea, S.; Guiñazú, N. Cytokines, key players to turn on/off the anti-*Trypanosoma cruzi* innate defense mechanisms. **Science against microbial pathogens:communicating current research and technological advances**, p. 594-604, 2011.

CARDOSO, M.; Reis-Cunha, J. L.; Bartholomeu, D. C. Evasion of the immune response by *Trypanosoma cruzi* during acute infection. **Frontiers in Immunology**, v. 6, jan., 2016.

CESTARI, I. *et al.* Complement C2 receptor inhibitor trispanning confers an increased ability to resist complement-mediated lysis in *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 198, n. 9, p. 1276-83, nov., 2008.

CESTARI, I. *et al.* Role of early lectin pathway activation in the complement-mediated killing of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular Immunology**, v. 47, n. 2-3, p. 426-37, dez., 2009.

CESTARI, I.; Ramirez, M.I. Inefficient complement system clearance of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes enables resistant strains to invade eukaryotic cells. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, p. e9721, 2010.

CESTARI, I. *et al.* *Trypanosoma cruzi* immune evasion mediated by host cell-derived microvesicles. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 4, p. 1942-1952, fev., 2012.

CESTARI, I. *et al.* Mechanisms of complement lectin pathway activation and resistance by trypanosomatid parasites. **Molecular Immunology**, v. 53, n. 4, p. 328-334, abr., 2013.

CHAGAS, C. Nova Trypanozomíase Humana. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. p. 160-218, 1909.

CHOWDHURY I, KOO S, GUPTA S, *et al.* Gene expression profiling and functional characterization of macrophages in response to circulatory microparticles produced during *Trypanosoma cruzi* infection and Chagas disease. **J Innate Immun** 9:203-216, 2017.

CIAVAGLIA MC; CARVALHO TU; SOUZA W. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with cells with altered glycosylation patterns. *Biochem Biophys Res Commun*. Jun 15;193(2):718-21, 1993.

COCUCCI, E.; Racchetti, G.; Meldolesi, J. Shedding microvesicles: artefacts no more. **Trends Cell Biology**, v. 19, n. 2, p. 43-51, fev., 2009.

COIMBRA, V. C. *et al.* Eucleated L929 cells support invasion, differentiation, and multiplication of *Trypanosoma cruzi* parasites. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 8, p. 3700–3706, ago., 2007.

CONNOR, D. E. *et al.* The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 103, n. 5, p. 1044–1052, mai., 2010.

COURA, J. R. Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 113-117, 2006.

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

DE PABLOS, L. M. D.; OSUNA, A. Multigene families in *Trypanosoma cruzi* and their role in infectivity. **Infection and immunity**, v. 80, p. 2258-2264, mar., 2012.

DI NOIA, J.M., et al. The *Trypanosoma cruzi* mucin family is transcribed from hundreds of genes having hypervariable regions. **J. Biol. Chem.** 273:10843–10850. 1998

DOLO, V. *et al.* Selective Localization of matrix metalloproteinase 9, b1 integrins, and human lymphocyte antigen class I molecules on membrane vesicles shed by 8701-BC breast carcinoma cells. **Cancer Research**, v. 58, n. 19, p. 4468–4474, out., 1998.

DORTA ML, FERREIRA A, OSHIRO MEM, YOSHIDA N. Ca<sup>2+</sup> signal induced by *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecules implicated in mammalian cell invasion. *Mol Biochem Parasitol* 73: 285-89, 1995.

DUJARDIN, J. C., et al. Genomic rearrangements in trypanosomatids: an alternative to the "one gene" evolutionary hypotheses? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. V. 95, n. 4., p. 527-534, Jul., 2000.

DUNKELBERGER, Jason R; SONG, Wen-chao. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. **Cell Research**, [s.l.], v. 20, n. 1, p.34-50, 15 dez. 2009. Springer Nature.

EL-SAYED, N. M. *et al.* The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v. 309, p. 409-415, jul., 2005.

EVANS-OSES, I.; De Messias-Reason, I.; Ramirez, M. I. The emerging role of complement lectin pathway in trypanosomatids: molecular bases in activation, genetic deficiencies, susceptibility to infection, and complement system-based therapeutics. **The Scientific World Journal**, 2013.

FERNANDES, M. C. *et al.* Extracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi* are potent inducers of phagocytosis in mammalian cells. **Cell Microbiology**, v. 15, p. 977-991, jun., 2013.

FERNANDEZ-CALERO T, GARCIA-SILVA R, Pena A, et al. Profiling of small RNA cargo of extracellular vesicles shed by *Trypanosoma cruzi* reveals a specific extracellular signature. **Mol Biochem Parasitol** 199:19-28, 2015.

FERREIRA, V. *et al.* The classical activation pathway of the human complement system is specifically inhibited by calreticulin from *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Immunology**, v. 172, n. 5, p. 3042-3050, mar., 2004.

FISCHER, E., OUAISSI, M. A., VELGET, P., CORNETTE, J., and KAZATCHKINE, M. D. Gp 58/68, a parasite component that contributes to the escape of the trypomastigote form of *T. cruzi* from damage by the human alternative complement pathway. **Immunology** 65, 299–303, 1988.

FREITAS-JUNIOR LHG, BRIONES MRS, SHENKMAN S. Two distinct groups of mucin-like genes are differentially expressed in the developmental stages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 93: 101-114, 1998

GARCIA, ES; GONZALEZ, MS; AZAMBUJA, P. Biological factors involving *Trypanosoma cruzi* life cycle in the invertebrate vector, *Rhodnius prolixus*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, supl. 1, p. 213-216, Sept. 1999.

GARCIA-SILVA, M. R. *et al.* Gene expression changes induced by *Trypanosoma cruzi* shed microvesicles in mammalian host cells: relevance of tRNA-derived halves. **BioMed Research International**, v. 2014, n. 305239, abr., 2014.

Gaur P, Chaturvedi A. Mining SNPs in extracellular vesicular transcriptome of *Trypanosoma cruzi*: a step closer to early diagnosis of neglected Chagas disease. **PeerJ** 1:16, 2016.

GODOY, Lyris Martins Franco de *et al.* Quantitative proteomics of *Trypanosoma cruzi* during metacyclogenesis. **Proteomics**, [s.l.], v. 12, n. 17, p.2694-2703, ago. 2012.

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

GONZÁLEZ, Andrea *et al.* *Trypanosoma cruzi* Calreticulin Topographical Variations in Parasites Infecting Murine Macrophages. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, [s.l.], v. 92, n. 5, p.887-897, 6 maio 2015.

GYÖRGY, B. *et al.* Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 16, p. 2667-2688, ago., 2011.

HARDING, Clifford V.; HEUSER, John E.; STAHL, Philip D.. Exosomes: Looking back three decades and into the future. **The Journal Of Cell Biology**, [s.l.], v. 200, n. 4, p.367-371, 18 fev. 2013

IIDA K., WHITLOW M. B., NUSSENZWEIG V. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* escape destruction by the terminal complement components. **J. Exp. Med.** 169 881–891., 1989.

INAL, J. M., and SCHIFFERLI, J. A. Complement C2 receptor inhibitor trispanning and the Beta-chain of C4 share a binding site for complement C2. **J. Immunol.** 168, 5213–5221. 2002

JACOBSON, K. C.; Fletcher, R. C.; Kuhn, R. E. Binding of antibody and resistance to lysis of trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunology**, v. 14, n. 1, p. 1-12, jan., 1992.

JANEWAY, C. A. et al. The complement system and innate immunity. **Immunobiology: The Immune System in Health and Disease**. 5ª edição. Nova York: Garland Science; 2001. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27100/>

JESUS, AR DE, et al. Gene deletion suggests a role for *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein GP72 in the insect and mammalian stages of the life cycle. **J Cell Sci.** Dec;106 ( Pt 4):1023-33, 1993.

JOHNSTONE RM, et al. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). **J Biol Chem.** Jul 5;262(19):9412-20, 1987.

KIERSZEMBAUM, F., RAMIREZ, M. A. Modulation of sensitivity of blood forms of *Trypanosoma cruzi* to antibody-mediated, complement-dependent lysis. **Infection and immunity**, p. 119-123, jan., 1990

KIPNIS T. L. et al. Enzymatic treatment transforms trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* into activators of alternative complement pathway and potentiates their uptake by macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 78 602–605, 1981.

KOWAL, Joanna et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 113, n. 8, p.968-977, 8 fev. 2016.

LAI, F.; Lichty, W.; Bowdish, D. Microvesicles: ubiquitous contributors to infection and immunity. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 97, fev., 2015.

LAMBRIS, J. D.; Ricklin, D.; Geisbrecht, B. V. Complement evasion by human pathogens. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 132-142, fev., 2008.

LANA, M. & TAFURI, W.L. *Trypanosoma cruzi*. In: Neves, D.P.; Melo, A.L.; Genro, O.; Linardi, P.M. **Parasitologia humana**. 9 ed. São Paulo, Atheneu, p. 82-114, 1995.

LEWIS, M. D. et al. Flow cytometric analysis and microsatellite genotyping reveal extensive DNA content variation in *Trypanosoma cruzi* populations and expose contrasts between natural and experimental hybrids. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 12, p. 1305-1317, out. 2009.

LEY, V; et al.. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. **J Exp Med**. Aug 1; 168(2): 649–659. 1988

LIDANI, Kárita C. F. et al. The Complement System: A Prey of *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 8, p.1-15, 20 abr. 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.00607>.

LÖTVALL, J. *et al.* Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 3, n. 26913, 2014.

MÁLAGA S AND YOSHIDA N. Targeted reduction in expression of *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein gp90 increases parasite infectivity. *Infect Immun* 69: 353-359, 2001.

MANTEL, P. Y.; MARTI, M. The role of extracellular vesicles in *Plasmodium* and other protozoan parasites. **Cell Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 344-354, mar., 2014.

MARCILLA, Antonio et al. Extracellular vesicles in parasitic diseases. **Journal Of Extracellular Vesicles**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.25040-25043, jan. 2014. Informa UK Limited.

MARTI, M.; JOHNSON, P. J. Emerging roles for extracellular vesicles in parasitic infections. **Current Opinion in Microbiology**, v. 32, p. 66-70, mai., 2016.

MAYILYAN, K. R *et al.* Innate Immunity of plants, animals and humans. Holger Heiner. 2008.

MERLE, N. S. *et al.* Complement system part I: molecular mechanisms of activation and regulation. **Frontiers in Immunology**, v. 6, jun., 2015a.

MERLE, N. S. *et al.* Complement system part II: role in immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 6, mai., 2015b.

MESSENGER, L. A., MILES, A. M. Evidence and importance of genetic exchange among field populations of *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 151, p. 150-155, 2015

MILES M. A. *et al.* The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 3, p. 217-225, 1977.

MING, M.; Ewen, M. E.; Pereira, M. E. Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF beta signaling pathway. **Cell**, v. 82, n. 2, p. 287-296, jul., 1995.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Governo Federal. Doença de Chagas. Criado em Março de 2014 Disponível em <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/oministerio/principal/secretarias/svs/doenca-de-chagas>>, último acesso em 4 de janeiro de 2019.

MORTARA, RA. *Trypanosoma cruzi*: amastigotes and trypomastigotes interact with different structures on the surface of HeLa cells. **Exp Parasitol.** Jul;73(1):1-14, 1991.

MORTARA, RA., *et al.* Host cell actin remodeling in response to *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote versus amastigote entry. **Subcell Biochem.**;47:101-9, 2008.

MURTA, Silvane Maria Fonseca; ROMANHA, Alvaro José. Characterization of *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, supl. 1, p. 177-180, Sept. 1999.

NESARGIKAR, Prabhu; SPILLER, B.; CHAVEZ, R.. The complement system: History, pathways, cascade and inhibitors. **European Journal Of Microbiology And Immunology**, [s.l.], v. 2, n. 2, p.103-111, jun. 2012.



NEVES RFC, FERNANDES ACS. *Trypanosoma cruzi*-secreted vesicles have acid and alkaline phosphatase activities capable of increasing parasite adhesion and infection. **Parasitol Res** 113:2961-2972, 2014.

NOGUEIRA, N.; Bianco C.; Cohn, Z. Studies on the selective lysis and purification of *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 142, p. 224-226, jul., 1975.

NOGUEIRA, P. M. *et al.* Vesicles from different *Trypanosoma cruzi* strains trigger differential innate and chronic immune responses. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 4, n. 28734, nov., 2015.

NORRIS, K. A. Stable transfection of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes with the trypomastigote-specific complement regulatory protein cDNA confers complement resistance. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 6, p. 2460-2465, jun., 1998.

ORTEGA-BARRIA E, PEREIRA ME. A novel *T. cruzi* heparin-binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells. **Cell**, Oct 18;67(2):411-21, 1991.

OVERTVELT, VL, *et al.* *Trypanosoma cruzi* infects human dendritic cells and prevents their maturation: inhibition of cytokines, HLA-DR, and costimulatory molecules. **Infect Immun**. Aug;67(8):4033-40, 1999.

PAES, L.S. *et al.* The Uniqueness of the *Trypanosoma cruzi* Mitochondrion: Opportunities to Target New Drugs Against Chagas' Disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, p. 2074-2099, 2011.

PAHO, Pan American Health Organization. Chagas disease (American Trypanosomiasis). Atualizado em abril de 2014. Disponível em <[http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=article&id=10&Itemid=40743](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743)>, último acesso em 4 de janeiro de 2017.

PECH-CANUL, Á. C.; MONTEÓN, V.; SOLÍS-OVIEDO, R. A Brief View of the Surface Membrane Proteins from *Trypanosoma cruzi*. **Journal Of Parasitology Research**, [s.l.], v. 2017, p.1-13, 2017. Hindawi Limited.

PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. *et al.* Mucin-like molecules form a negatively charged coat that protects *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes from killing by human anti-



alpha-galactosyl antibodies. **Journal of Cell Science**, v. 113, p. 1299-1307, mar., 2000.

PÉREZ-MOLINA, José; MOLINA, Israel. Chagas disease. **The Lancet**, [s.l.], v. 391, n. 10115, p.82-94, jan. 2018. Elsevier BV.

PÉREZ-MORALES, Deyanira et al. Ultrastructural and physiological changes induced by different stress conditions on the human parasite *Trypanosoma cruzi*. **Cell Stress And Chaperones**, [s.l.], v. 22, n. 1, p.15-27, 6 out. 2016

PINHEIRO, E. et al. Chagas disease: review of needs, neglect, and obstacles to treatment access in Latin America. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 3, p. 296-300, mai., 2017.

PLUSKOTA, E. *et al.* Expression, activation, and function of integrin  $\alpha$ Mb2 (Mac-1) on neutrophil-derived microparticles. **Blood**, v. 112, n. 6, p. 2327–2335, set., 2008.

PONCINI, C. V. et al. *Trypanosoma cruzi* Induces Regulatory Dendritic Cells In Vitro. **Infection And Immunity**, [s.l.], v. 76, n. 6, p.2633-2641, 17 mar. 2008.

RAMÍREZ, Galia et al. *Trypanosoma cruzi* calreticulin: A novel virulence factor that binds complement C1 on the parasite surface and promotes infectivity. **Immunobiology**, [s.l.], v. 216, n. 1-2, p.265-273, jan. 2011.

RAMIREZ, M. I. *et al.* Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 9, p. 3636-3641, set., 1993.

RAMIREZ, M. I. *et al.* Dynamic flux of microvesicles modulate parasite–host cell interaction of *Trypanosoma cruzi* in eukaryotic cells. **Cellular Microbiology**, set., 2017.

RAPOSO, G.; Stoorvogel, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. **The Journal of Cell Biology**, v. 200, n. 4, p. 373–383, fev., 2013.

RASSI, A.; Rassi, A.; Marin-Neto, J.A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, abr., 2010.

RIBEIRO KS, VASCONCELLOS CI, SOARES RP, et al. Proteomic analysis reveals different composition of extracellular vesicles released by two *Trypanosoma cruzi* strains associated with their distinct interaction with host cells. **J Extracel Vesicles** 7: 1-14, 2018.

ROBBINS, Paul D.; MORELLI, Adrian E.. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. **Nature Reviews Immunology**, [s.l.], v. 14, n. 3, p.195-208, mar. 2014.

RODRIGUEZ, A.. Host cell invasion by trypanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport. **The Journal Of Cell Biology**, [s.l.], v. 134, n. 2, p.349-362, 1 jul. 1996. Rockefeller University Press.

ROMANO PS, et al. The autophagic pathway is a key component in the lysosomal dependent entry of *Trypanosoma cruzi* into the host cell. **Autophagy**. Jan;5(1):6-18, 2009.

ROMAN-CAMPOS, D. *et al.* Changes in cellular contractility and cytokines profile during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Basic Research in Cardiology**, v.104, p. 238-246, 2009.

SALAZAR NA, MONDRAGON A, KELLY JM. Mucin-like glycoprotein genes are closely linked to members of the trans-sialidase super-family at multiple sites in the *Trypanosoma cruzi* genome. **Mol Biochem Parasitol**. Jun;78(1-2):127-36, 1996.

SCHENKMAN, S.; Güther, M. L.; Yoshida, N. Mechanism of resistance to lysis by the alternative complement pathway in *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes: effect of specific monoclonal antibody. **The Journal of Immunology**, v. 137, n. 5, p. 1623-1628, set., 1986.

SCHENKMAN, S, et al., Mucin-like glycoproteins linked to the membrane by glycosylphosphatidylinositol anchor are the major acceptors of sialic acid in a reaction catalyzed by trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**. Jun;59(2):293-303, 1993.

SCHENKMAN S, ROBBINS ES, NUSSENZWEIG V. Attachment of *Trypanosoma cruzi* to mammalian cells requires parasite energy, and invasion can be independent of the target cell cytoskeleton. **Infect Immun** 59: 645-654, 1991.

SILVEIRA JF, ABRAHAMSOHN PA, COLLI W. Plasma membrane vesicles isolated from epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. **Biochim Biophys Acta** 550:522-532, 1979

SILVERMAN, J. M. *et al.* Leishmania exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocytes and dendritic cells. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 9, p. 5011-5022, nov., 2010.

SOSONIUK, Eduardo *et al.* *Trypanosoma cruzi* calreticulin inhibits the complement lectin pathway activation by direct interaction with L-Ficolin. **Molecular Immunology**, [s.l.], v. 60, n. 1, p.80-85, jul. 2014.

SOUTO, R. P.; ZINGALES, B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 62, p. 45- 52, jul.,1993.

SOUZA, Wanderley de; CARVALHO, Tecia Maria Ulisses de; BARRIAS, Emile Santos. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. **International Journal Of Cell Biology**, [s.l.], v. 2010, p.1-18, 2010. Hindawi Limited.

STANAWAY, J. D., ROTH, G. The burden of Chagas disease. **Global Heart**, v. 10, n. 3, p. 139-144, set., 2015.

STEINDEL, M. *et al.* Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v .60, p. 71-80, 1993.

SZEMPRUCH, A. J. *et al.* Extracellular Vesicles from *Trypanosoma brucei* mediate virulence factor transfer and cause host anemia. **Cell**, v. 14, n. 164, p. 246-257, jan., 2016.

TAMBOURGI, D. V. *et al.* A partial cDNA clone of trypomastigote decay-accelerating factor (T-DAF), a developmentally regulated complement inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, has genetic and functional similarities to the human complement inhibitor DAF. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 9, p. 3656-3663, set., 1993.

TEIXEIRA, M. M.; Yoshida, N. Stage-specific surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* identified by mono-clonal antibodies. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 18, p. 271–282, set.,1986.

TETTA, Ciro et al. Extracellular vesicles as an emerging mechanism of cell-to-cell communication. **Endocrine**, [s.l.], v. 44, n. 1, p.11-19, 1 dez. 2012.

TRAMS, Eberhard G. et al. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Biomembranes**, [s.l.], v. 645, n. 1, p.63-70, jun. 1981.

TRICARICO, Christopher; CLANCY, James; D'SOUZA-SCHOREY, Crislyn. Biology and biogenesis of shed microvesicles. **Small Gtpases**, [s.l.], v. 8, n. 4, p.220-232, 5 ago. 2016

TROCOLI-TORRECILHAS, A. C. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 1, p. 29-39, jan., 2009.

TROCOLI-TORRECILHAS, A. C. *et al.* Vesicles as carriers of virulence factors in parasitic protozoan disease. **Microbes and Infection**, v. 14, p. 1465-1474, ago., 2012.

TYLER, K. M., & ENGMAN, D. M. *The life cycle of Trypanosoma cruzi revisited.* **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 5-6, p. 472–481, 2001.

TYLER, Kevin M. et al. Responsive microtubule dynamics promote cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Cellular Microbiology**, [s.l.], v. 7, n. 11, p.1579-1591, 17 ago. 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00576.x>.

VAN NIEL, Guillaume; D'ANGELO, Gisela; RAPOSO, Graça. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s.l.], v. 19, n. 4, p.213-228, 17 jan. 2018.

VILLALTA, F, et al. Molecular analysis of early host cell infection by *Trypanosoma cruzi*. **Front Biosci**. Mai. 1;13:3714-34. 2008

WALPORT, M. J. Complement. First of two parts. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 14, p. 1058-1066, abr., 2001.

WHO, Chagas Disease (American trypanosomiasis) factsheet n° 340. Atualizado em março de 2016. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>> último acesso em 4 de janeiro de 2017.

WHO, First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Geneva: World Health Organization, 2010

WOOLSEY AM, Sunwoo L, Petersen CA, Brachmann SM, Cantley LC, Burleigh BA. Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. **J Cell Sci.** 116(17):3611–3622, 2003.

WYLLIE MP, RAMIREZ MI. Microvesicles released during the interaction between *Trypanosoma cruzi* TcI and TcII strains and host blood cells inhibit complement system and increase the infectivity of metacyclic forms of host cells in a strain-independent process. *Pathog Dis* 75:1-10, 2017.

YÁÑEZ-MÓ, M. *et al.* Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 4, n. 27066, 2015.

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 1, p. 87-111, 2006.

YOSHIDA, N.; ARAGUTH, M. F. Trypanolytic activity and antibodies to metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* in non-Chagasic human sera. **Parasite Immunology**, v. 9, n. 3, p. 389-393, mai., 1987.

YOSHIDA, N, CORTEZ, M. *Trypanosoma cruzi*: parasite and host cell signaling during the invasion process. **Subcell Biochem.**47:82-91, 2008.

ZHANG, Y. *et al.* Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. **Molecular Cell**, v. 39, p. 133-144, jul., 2010.

ZINGALES, B. *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051-1054, nov., 2009.

ZINGALES, B. *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 240-253, 2012.

ZILBERSTEIN, D., et al. *Growth at acidic pH induces an amastigote stage-specific protein in Leishmania promastigotes.* **Molecular and Biochemical Parasitology**, 45(1), 175–178, 1991.

ZILBERSTEIN, D; SHAPIRA, M. The Role of pH and Temperature in the Development of Leishmania Parasites. **Annual Review Of Microbiology**, [s.l.], v. 48, n. 1, p.449-470, out. 1994.

## ANEXO A – PRODUÇÃO CIENTÍFICA

1)

Capítulo aceito para publicação: em etapa de impressão.

Methods in Molecular Biology (Springer Science Business Media LLC, New York)

Book Serie: *Trypanosoma cruzi* infection

Chapter: Isolation and characterization of extracellular vesicles derived from *Trypanosoma cruzi*

DOI: 10.1007/978-1-4939-9148-8\_7

2)

A new landscape of host-protozoa interactions involving the extracellular vesicles world.

Gavinho B<sup>1</sup>, Rossi IV<sup>1</sup>, Evans-Osses I<sup>1</sup>, Inal J<sup>2</sup>, Ramirez MI<sup>1</sup>.

Parasitology. 2018 Oct;145(12):1521-1530.

doi: 10.1017/S0031182018001105.