

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIA ALICE FERREIRA NUNES

CARACTERIZAÇÃO DAS CEPAS POLARES DE *Trypanosoma cruzi* CL
Brener E Dm28c NA LIBERAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES E NO
PROCESSO DE INVASÃO EM CÉLULAS EUCARIÓTICAS

CURITIBA

2021

MARIA ALICE FERREIRA NUNES

CARACTERIZAÇÃO DAS CEPAS POLARES DE *Trypanosoma cruzi* CL
Brener E Dm28c NA LIBERAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES E NO
PROCESSO DE INVASÃO EM CÉLULAS EUCARIÓTICAS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Marcel Ivan Ramirez Araya

CURITIBA

2021

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Nunes, Maria Alice Ferreira.

Caracterização das cepas polares de *Trypanosoma cruzi* CL Brener e Dm28c na liberação de vesículas extracelulares e no processo de invasão em células eucarióticas. / Maria Alice Ferreira Nunes. – Curitiba, 2021.
66 f. : il.

Orientador: Marcel Ivan Ramirez Araya.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Células. 3. Chagas, Doença de. I. Título. II. Araya, Marcel Ivan Ramirez. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 616.9363



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR - 40001016007P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **MARIA ALICE FERREIRA NUNES** intitulada: **CARACTERIZAÇÃO DAS CEPAS POLARES DE *Trypanosoma cruzi* CL Brener E Dm28c NA LIBERAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES E NO PROCESSO DE INVASÃO EM CÉLULAS EUCARIÓTICAS**, sob orientação do Prof. Dr. MARCEL IVAN RAMÍREZ ARAYA, que após terem inquirido a aluna e realizada 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, 31 de Maio de 2021.

Assinatura Eletrônica

30/07/2021 14:22:47.0

MARCEL IVAN RAMÍREZ ARAYA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

03/08/2021 00:51:25.0

JORGE GONZALEZ

Avaliador Externo (UNIVERSIDAD DE ANTOFAGASTA)

Assinatura Eletrônica

30/07/2021 12:09:12.0

AUGUSTO SAVIO PEIXOTO RAMOS

Avaliador Externo (INSTITUTO CARLOS CHAGAS)

Rua Cel Francisco H. dos Santos, 100. - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-990 - Tel: (41) 3361-1676 - E-mail: pgbiocel@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 103690

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 103690

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, e a todos os professores que me ensinaram ao longo de toda a minha trajetória!

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus pelo dom da minha vida.

Agradecer ao meu esposo Otávio Larrosa por me permitir compartilhar os melhores e piores momentos durante o mestrado, ele sempre sabia quando meus experimentos eram assertivos ou quando fracassavam. Sempre esteve ao meu lado independente do meu ânimo.

Agradecer a minha família por sempre estarem presentes, não importando a distância física e por sempre entenderem quando não podia os visitar.

Agradecer as minhas gatas Penny e Amy por sempre me acalmar com o seu ronronar.

Agradecer ao meu grupo de pesquisa o EVAHPI, por sempre serem gentis e atenciosos comigo, especialmente ao meu orientador Dr. Marcel Ramirez, por acreditar em mim.

Agradecer as minhas colegas de pós-graduação, especialmente a Izadora Volpado Rossi por sempre discutir os resultados e me ajudar nos experimentos de bancada, e a Bruna Sabatke por sua companhia e gentileza, e a todos os colegas e amigos.

Agradecer ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, aos professores e todos os servidores da Universidade Federal do Paraná.

Obrigada!

I am among those who think that science has great beauty. A scientist in his laboratory is not only a technician, he is also a child place before natural phenomenon, which impress him like a fairy tale.

Marie Curie

RESUMO

A doença de Chagas é uma doença tropical negligenciada e representa um dos maiores problemas de saúde pública. É causada pelo *Trypanosoma cruzi*, um protozoário hemoflagelado intracelular obrigatório da ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. O parasita possui um ciclo de vida heteroxênico, que precisa de um hospedeiro vertebrado, mamífero, e um hospedeiro invertebrado, o inseto-vetor. O processo de invasão celular é diferente nas formas infectivas do protozoário, na qual existe dois mecanismos de invasão celular, lisossomo-dependente e lisossomo-independente e várias moléculas distintas. O primeiro contato entre o parasita com o hospedeiro mamífero, é capaz de liberar vesículas extracelulares de interação, essas vesículas auxiliam o parasita na invasão celular, evasão do sistema imunológico e indução de respostas inflamatórias. Em nossos resultados, vimos que a cepa CL Brener na presença de vesículas extracelulares aumentou a invasão em células VERO. Além disso, observamos que tripomastigotas de cultivo possuem a capacidade de produzir uma quantidade de 25 a 50% maior de VEs que as formas metacíclicas e epimastigotas.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, vesículas extracelulares, invasão celular

ABSTRACT

Chagas disease is a neglected tropical disease and represents one of the biggest public health problems. It is caused by *Trypanosoma cruzi*, an intracellular hemoflagellate protozoan of the order Kinetoplastida and family Trypanosomatidae. The parasite has a heteroxenic life cycle, which needs a vertebrate, mammalian host, and an invertebrate host, the insect-vector. The cell invasion process is different in the infectious forms of the protozoan, in which there are two mechanisms of cell invasion, lysosome-dependent and lysosome-independent and several different molecules. The first contact between the parasite and the mammalian host, is able to release extracellular vesicles of interaction, these vesicles assist the parasite in cellular invasion, evasion of the immune system and induction of inflammatory responses. In our results we saw that the strain CL Brener in the presence of extracellular vesicles increased the invasion in VERO cells. In addition, we observed that cultured trypomastigotes have the ability to produce 25 to 50% more EVs than metacyclic and epimastigote forms.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, extracellular vesicles, cell invasion

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA DOENÇA DE CHAGAS.....	19
FIGURA 2 – CICLO BIOLÓGICO DO <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
FIGURA 3 – PREVALÊNCIA DE DTUs DE <i>T. cruzi</i>	24
FIGURA 4 – DESENHO EXPERIMENTAL DO CICLO BIOLÓGICO DE <i>T. cruzi</i>	38
FIGURA 5 – CURVA DE CRESCIMENTO DE EPIMASTIGOTAS.....	39
FIGURA 6 – METACICLOGÊNESE DAS CEPAS CL Brener E Dm28c.....	40
FIGURA 7 – COMPARAÇÃO METACICLOGÊNESE.....	40
FIGURA 8 – DINÂMICA DE LIBERAÇÃO DE TCTs MOI (5:1).....	42
FIGURA 9 – DINÂMICA DE LIBERAÇÃO DE TCTs MOI (2:1).....	43
FIGURA 10 – PERCENTUAL DE SOBREVIVÊNCIA EM EPIs.....	44
FIGURA 11 – PERCENTUAL DE SOBREVIVÊNCIA EM METAs	44
FIGURA 12 – PERCENTUAL DE SOBREVIVÊNCIA EM TCTs.....	45
FIGURA 13 – INDUÇÃO DE LIBERAÇÃO DE VES	46
FIGURA 14 – CONCENTRAÇÃO DE VEs POR NTA.....	47
FIGURA 15 – TAMANHO MÉDIO DE VEs POR NTA.....	48
FIGURA 16 – PERCENTUAL DE CÉLULAS INFECTADAS COM TCTs.....	49
FIGURA 17 – PERCENTUAL DE CÉLULAS INFECTADAS COM TCTs EM NÚMERO DE AMASTIGOTAS	49
FIGURA 18 – PERCENTUAL DE CÉLULAS INFECTAS NA PRESENÇA DE VEs E TCTS DA CEPA CL Brener	50
FIGURA 19 – PERCENTUAL DE CÉLULAS INFECTAS NA PRESENÇA DE VEs E TCTS DA CEPA CL Brener EM NÚMERO DE AMASTIGOTAS	51

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - SOLUÇÕES UTILIZADAS E SUAS COMPOSIÇÕES.....	32
TABELA 2 - CLASSIFICAÇÃO DAS CEPAS DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	32
TABELA 3 - PRODUÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

Ca ²⁺	-	Íon de cálcio
CaCl ₂	-	Cloreto de cálcio
CO ₂	-	Dióxido de carbono
DTU	-	Unidade de tipagem discreta (do inglês, Discrete Typing Unit)
EPIs	-	Epimastigotas
HCl	-	Ácido Clorídrico
IFN- γ	-	Interferon-gama
IL-10	-	Interleucina-10
IL-1 β	-	Interleucina-1 β
IL-6	-	Interleucina -6
KCl	-	Cloreto de Potássio
KH ₂ PO ₄	-	Fosfato Monobásico de Potássio
LIT	-	Meio de cultivo com infuso de fígado e triptose (do inglês, Liver Infusion Tryptose)
METAs	-	Tripomastigotas Metacíclicos
NaHCO	-	Bicarbonato de Sódio
NaOH	-	Hidróxido de Sódio
PBS	-	Tampão Fosfato-Salino (do inglês, Phosphate Buffered Saline)
RPMI	-	do inglês, Roswell Park Memorial Institute Medium
SFB	-	Soro Fetal Bovino
TCTs	-	Tripomastigotas de cultivo celular
THP-1	-	Célula monocítica humana
VERO	-	Células epiteliais renais extraídas de um macaco verde africano

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	OBJETIVOS	17
1.1.1	<i>Objetivo geral</i>	17
1.1.2	Objetivos específicos.....	17
2.	REVISÃO DE LITERATURA	18
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>	20
2.1.2	<i>Ciclo biológico de Trypanosoma cruzi</i>	21
2.1.3	<i>Diversidade Genética de Trypanosoma cruzi</i>	22
2.2	A INTERAÇÃO ENTRE T. cruzi E O HOSPEDEIRO.....	24
2.2.1	<i>Moléculas de T. cruzi envolvidas na interação parasito-hospedeiro</i>	24
2.2.2	<i>O processo de invasão T. cruzi</i>	26
2.3	SISTEMA COMPLEMENTO E O PARASITO.....	27
2.4	AS VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	29
2.4.1	<i>Vesículas extracelulares derivadas de Trypanosoma cruzi</i>	30
3	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1	MEIOS DE CULTURA.....	32
3.2	SOLUÇÕES.....	32
3.3	CULTURA DE CÉLULAS.....	32
3.4	DIFERENCIAÇÃO DE EPIMASTIGOTA PARA TRIPOMASTIGOTA METACÍCLICO (METACICLOGÊNESE).....	33
3.5	PURIFICAÇÃO DE TRIPOMASTIGOTAS METACÍCLICOS DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	33
3.6	PRODUÇÃO DE TRIPOMASTIGOTAS DE CULTURA DE TECIDO DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	34
3.7	INDUÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DA INTERAÇÃO <i>Trypanosoma cruzi</i> com CÉLULAS (THP-1) e (VERO).....	34
3.7.1	<i>Determinação da concentração de proteína em Vesículas Extracelulares (VEs)</i>	35
3.7.2	<i>Mensuração das Vesículas Extracelulares por Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)</i>	35
3.8	SORO NORMAL HUMANO.....	35
3.9	LISE MEDIADA PELO COMPLEMENTO.....	35
3.10	DINÂMICA DE LIBERAÇÃO DE TRIPOMASTIGOTAS DE CULTURA DE TECIDO (TCTs).....	36

3.11	ENSAIOS DE INVASÃO EM CÉLULAS VERO.....	36
3.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
4	RESULTADOS.....	38
4.1	CICLO BIOLÓGICO DO <i>Trypanosoma cruzi in vitro</i>	38
4.2	ENSAIO DE LISE MEDIADO PELO SISTEMA COMPLEMENTO.....	43
4.3	PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES..	45
4.4	ENSAIOS FENOTÍPICOS DE INVASÃO CELULAR NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	48
5	DISCUSSÃO.....	52
6	CONCLUSÕES.....	57
7	REFERÊNCIAS.....	58

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma doença tropical negligenciada e representa um dos maiores problemas de saúde pública, principalmente na América Latina (World Health Organization, WHO, 2021). Esta doença é uma antropozoonose do continente americano, e devido a migração populacional se espalhou por vários países não endêmicos (PÉREZ-MOLINA e MOLINA, 2018). É causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, identificado na primeira década do século XX pelo médico sanitário e cientista brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, após a investigação de casos na cidade de Lassance-MG (CHAGAS, 1909). Também conhecida como tripanossomíase americana, é uma infecção parasitária causada por um protozoário hemoflagelado intracelular obrigatório da ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae.

O protozoário *T. cruzi* possui um ciclo de vida heteroxênico, na qual o parasito precisa de um hospedeiro vertebrado, mamífero, e um hospedeiro invertebrado, o inseto triatomíneo, sofrendo alterações morfológicas e bioquímicas durante seu ciclo de vida (GARCIA et al., 1999). O ciclo se inicia quando o hospedeiro invertebrado realiza o repasto sanguíneo e libera nas fezes e urina as formas tripomastigotas metacíclicas. As formas metacíclicas entram no hospedeiro mamífero através de feridas na pele ou membranas mucosas e invadem as células. Depois da invasão celular, os tripomastigotas metacíclicos são contidos dentro de um vacúolo parasitóforo, de onde escapam, transforma-se em amastigotas e se multiplica no citoplasma por divisão binária. Posteriormente as amastigotas se diferenciam em tripomastigotas sanguíneos, altamente móveis, que são liberados na lise celular. Os tripomastigotas podem infectar células vizinhas, migrar para tecidos diferentes ou ser ingerido por um inseto vetor. No inseto vetor, os tripomastigotas sanguíneas se diferenciam em epimastigotas (intestino posterior do inseto), se multiplicam por divisão binária, e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos no reto do triatomíneo, reiniciando o ciclo de vida (TYLER et al., 2001; MORETTI et al., 2020).

O processo de invasão celular é diferente nas formas infectivas do protozoário. Os tripomastigotas metacíclicos expressão moléculas relacionadas a invasão como a gp82 e gp90, enquanto que para os tripomastigotas sanguíneos utilizam Tc-85, mucinas e trans-sialidases (YOSHIDA, 2006; YOSHIDA et al., 2000). Além disso,

parece haver dois mecanismos de invasão celular, lisossomo-dependente e lisossomo-independente, conforme revisado por Alves & Colli (2007).

Durante os primeiros momentos da infecção, um dos mecanismos mais efetivos do sistema imune inato para a eliminação do parasito é o sistema complemento. Ele consiste em um conjunto de proteínas celulares contidas no soro, e devido à algum estímulo, são ativadas em cascata e resultam na formação de um poro na membrana do patógeno, levando à sua lise (CESTARI et al., 2013; EVANS-OSES et al., 2013). No entanto, o protozoário *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 utilizado por *T. cruzi* é a liberação de vesículas extracelulares (VEs), entre elas principalmente microvesículas. (CESTARI et al., 2012; LAI et al., 2015).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Caracterizar as cepas CL Brener e Dm28c de *Trypanosoma cruzi* na liberação de vesículas extracelulares e no processo de invasão em células eucarióticas.

1.1.2 Objetivos específicos

1. Determinar a sensibilidade à lise pelo sistema complemento das cepas CL Brener e Dm28c.
2. Avaliar a infecção em células VERO das cepas CL Brener e Dm28c.
3. Obter e caracterizar vesículas extracelulares de interação entre tripomastigotas de cultura de tecidos com células THP-1 e células VERO.
4. Caracterizar fenotipicamente as vesículas extracelulares de interação em ensaios de invasão celular.

2. REVISÃO DE LITERATURA

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

A doença de Chagas é uma antropozoonose do continente americano que se espalhou a partir de seus limites originais através da migração populacional (PÉREZ-MOLINA E MOLINA, 2018). É causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, identificado na primeira década do século XX pelo médico e cientista brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, (CHAGAS, 1909). Também conhecida como tripanossomíase americana, é uma infecção parasitária causada por um protozoário hemoflagelado intracelular obrigatório da ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae.

A distribuição da doença de Chagas ocorre principalmente na parte continental da América Latina. No entanto, tem sido cada vez mais detectado nos Estados Unidos da América, no Canadá, em países europeus e em alguns países do pacífico ocidental (Fig.1). A nova distribuição acontece devido a globalização e o fluxo intenso de pessoas por países, especialmente imigrantes latinos, na qual contribuem para a propagação da infecção em áreas não endêmicas (World Health Organization, WHO, 2021; DIAS et al., 2019).

Estima-se que 6 a 7 milhões de pessoas em todo o mundo, principalmente na América Latina estejam infectados com *T. cruzi* (WHO, 2021). Além disso, na região das Américas a incidência anual é de 30.000 casos, e cerca de 12.000 mortes por ano (Pan American Health Organization, PAHO, 2021). No Brasil, estima-se que há cerca de 4,6 milhões de pessoas infectadas com *T. cruzi*, o que evidencia a magnitude da doença como condição crônica (MARTINS-MELO et al., 2014; DIAS et al., 2016). A doença apresenta a maior carga de adoecimento e morte entre todas as doenças negligenciadas, mantendo esta doença como um crítico problema de saúde pública (MINISTÉRIO DA SAÚDE, MS, 2019). Embora a mortalidade tenha diminuído, a doença pode causar consequências irreversíveis e crônicas no coração, sistema digestivo e sistema nervoso.

A transmissão natural da doença é vetorial, sendo os hospedeiros invertebrados os insetos vetor hematófagos da família Reduviidae (subfamília Triatominae). São popularmente conhecidos como “barbeiro”, “bicudo” ou “chupão”. *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* configuram entre os

vetores mais importantes da doença (RASSI et al., 2010). Os insetos-vetor hematófagos podem transmitir o protozoário *T. cruzi* para os hospedeiros vertebrados, como marsupiais e mamíferos placentários, inclusive o homem. Entretanto, existem outras formas de transmissão alternativas da doença, como transmissão oral, transmissão congênita, transfusão sanguínea, transplante de órgãos, acidentes de laboratório e até mesmo manipulação da caça. (DIAS et al., 2019).

No Brasil a transmissão da doença de Chagas pelo principal inseto vetor *Triatoma infestans* foi interrompida desde o ano 2006, e o Brasil recebeu certificado pela Organização Mundial da Saúde e pela Organização Pan-Americana da Saúde por essa conquista, porém ainda existem insetos-vetor que transmitem a doença no país (PAHO, 2006). Além disso, houve aumento da transmissão da doença através da forma oral e congênita, devido principalmente a surtos ocorridos pela ingestão de alimentos contaminados com o protozoário e a transmissão vertical pelas gestantes (BARBOSA et al., 2015).

Na transmissão congênita, a via transplacentária é a principal via de transmissão vertical da doença de Chagas, que pode ocorrer em qualquer fase da doença (aguda, indeterminada ou crônica) e em qualquer estágio da gestação, porém com o risco elevado no último trimestre. A transmissão pode ocorrer a partir do contato entre as mucosas fetais e o sangue da mãe contaminado com *Trypanosoma cruzi*. O risco de transmissão congênita parece estar relacionado à parasitemia materna, sugerindo que o tratamento precoce seja realizado em mulheres infectadas em idade fértil, a fim de prevenir a doença congênita. (SANTOS et al., 2018; GONZÁLEZ et al., 2019).

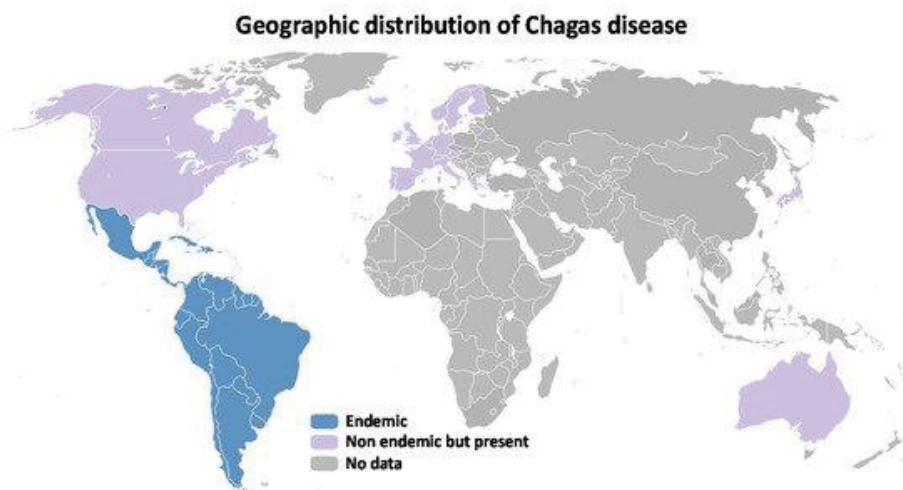


Fig.1 Distribuição geográfica da doença de Chagas. Distribuição global mostrando os países endêmicos da doença de Chagas, onde a transmissão ocorre principalmente pela ação do inseto vetor, bem como os países que recebem pessoas infectadas dessas regiões devido ao processo migratório.

Fonte: Adaptado de Sengenito et al (2020)

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. Quando aparente, isto é, no caso de 10 à 30% dos pacientes, os sinais clínicos aparecem entre 5 à 40 dias após a transmissão. Os sintomas da fase aguda incluem febre, inflamação em local de infecção (chagoma de inoculação), edema palpebral unilateral (sinal de Romaña), linfadenopatia e hepatoesplenomegalia. (RASSI et al., 2010; PÉREZ-MOLINA E MOLINA, 2018)

A fase aguda dura entre 4 à 8 semanas, e a parasitemia é alta, devido ao alto grau de multiplicação dos parasitos, após 90 dias, a parasitemia diminui substancialmente. A mortalidade na fase aguda pode chegar até 10% dos indivíduos sintomáticos. Nessa fase, o diagnóstico laboratorial é realizado através da observação do parasito presente no sangue dos indivíduos infectados, em testes parasitológicos diretos, como exame de sangue à fresco, esfregaço e gota espessa (CONSENSO BRASILEIRO EM DOENÇA DE CHAGAS, 2015).

A fase aguda pode se resolver espontaneamente, quando não tratados, os pacientes podem permanecer infectados cronicamente. O tratamento é medicamentoso, com as drogas licenciadas até o momento (Benzonidazol e Nifurtimox), e é recomendado para pacientes em fase aguda e congênita, já para a fase crônica, o benefício do tratamento com essas drogas ainda é discutido por terem menor eficácia (PÉREZ-MOLINA E MOLINA, 2018). O tratamento pode causar efeitos colaterais, como reações alérgicas, vômitos, náuseas, além de existirem sensibilidades variáveis entre as diferentes cepas de *T. cruzi* (BERMUDEZ et al., 2016).

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. No entanto, cada vez mais pacientes com doença indeterminada são diagnosticados com doença cardíaca ou digestiva, com sutis anormalidades (PÉREZ-MOLINA E MOLINA, 2018).

Após 10 a 30 anos de infecção aguda, os pacientes podem desenvolver fase crônica e doença grave, principalmente cardiomiopatia ou megavísceras (megacólon ou megaesôfago) (RASSI et al., 2010; PÉREZ-MOLINA E MOLINA, 2018). Nessa fase, o diagnóstico parasitológico é comprometido em virtude da ausência de parasitemia. A doença geralmente é diagnosticada por exames sorológicos ou por métodos indiretos, como o xenodiagnóstico ou hemocultivo (CONSENSO BRASILEIRO EM DOENÇA DE CHAGAS, 2015).

O controle do inseto vetor, a triagem das amostras de sangue e órgãos antes de transfusões e transplantes, triagens sorológicas de gestantes, tratamento de pacientes infectados e cuidado em manipulações laboratoriais são imprescindíveis para o controle da doença de Chagas, pois ainda não existe uma vacina disponível para essa doença.

2.1.2 Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*

O protozoário *Trypanosoma cruzi* possui ciclo biológico heteroxênico, os invertebrados o inseto-vetor, e os vertebrados, marsupiais, mamíferos placentários e o homem (Fig.2). Apresenta formas evolutivas distintas, como epimastigota, tripomastigota metacíclico, amastigota e tripomastigota sanguíneo. O ciclo se inicia quando os tripomastigotas metacíclicos são liberados nas fezes ou urina do vetor triatomíneo após o repasto sanguíneo, e infectam o hospedeiro mamífero pela membrana mucosa ou pela lesão cutânea, devido ao prurido intenso no local da picada (PAES et al., 2011; MORETTI et al., 2020).

No momento da invasão de *T. cruzi* às células mamíferas, ocorre a formação de um vacúolo parasitóforo, ou seja, um compartimento endocítico, na qual os lisossomos acidificam o meio, conseqüentemente ativam mecanismos parasitários com a liberação de hemolisina, o que irá levar à ruptura do vacúolo e a saída do parasita para o citoplasma. No citoplasma, os tripomastigotas metacíclicos se diferenciam para a forma amastigota (ANDREWS et al., 1990; ALBERTTI et al., 2010. Após nove ciclos de divisão binária no citosol, as amastigotas se diferenciam em

tripomastigotas da corrente sanguínea e são liberado após a ruptura da membrana da célula hospedeira (DVORAK e HYDE, 1973 ; DVORAK e HOWE, 1976).

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, disseminando a infecção e o ciclo pode reiniciar. Durante a hematofagia do inseto vetor, ambas as formas podem ser ingeridas, porém somente os tripomastigotas sanguíneos se diferenciam na forma replicativa extracelular, denominada epimastigota, no intestino posterior do inseto. Os epimastigotas se multiplicam por divisão binária, e em seguida se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicos no reto do triatomíneo, reiniciando o ciclo biológico (TYLER, 2001).

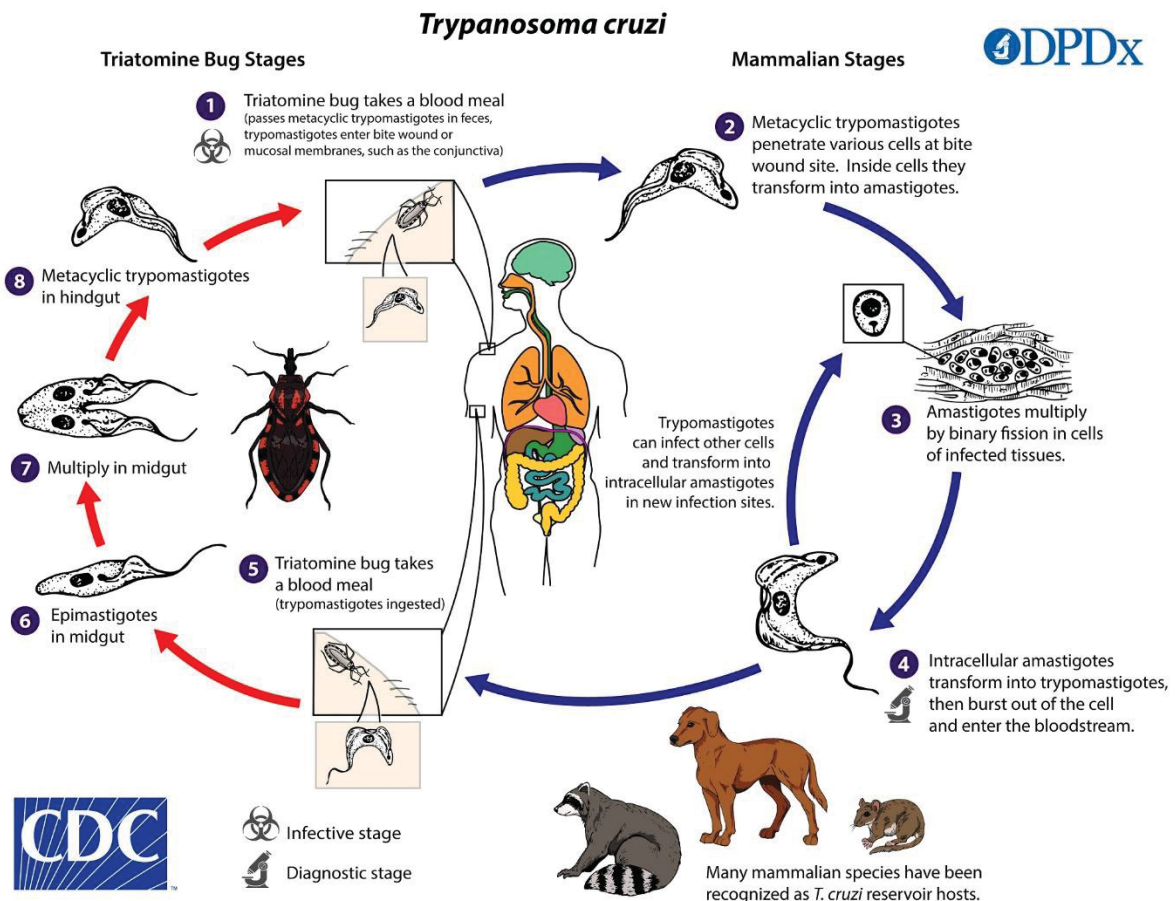


Fig. 2 Ciclo Biológico do *Trypanosoma cruzi*.

Fonte: CDC: Centers for Disease Control and Prevention

2.1.3 Diversidade Genética de *Trypanosoma cruzi*

O protozoário *Trypanosoma cruzi* apresenta variedade genética. Estudos relatados por Carlos Chagas (1909) já descreveram características particulares, como diferenças no comportamento das populações parasitárias, diferenças na virulência, infecções mistas em áreas endêmicas pelo mesmo paciente e a influência do hospedeiro no resultado da infecção.

Ao longo dos anos, o conhecimento sobre a diversidade genética de *T. cruzi* e a epidemiologia molecular tem progredido, porém muitas questões ainda persistem, como os fatores que determinam a patogenicidade do parasita e influência do hospedeiro na doença de Chagas (ZINGALES, 2018). Estudos “clássicos”, identificaram uma diferença de até 40% no conteúdo do DNA entre as linhagens. Essas diferenças foram atribuídas ao DNA nuclear e cinetoplasto, sendo o núcleo o principal fator contribuinte. Os tripanosomatídeos possuem alta plasticidade genética, como a capacidade de expansão e contração de sequências específicas, eventos de fusão ou fissão cromossomal e hibridização (MESSENGER E MILES, 2015).

Sabe-se que a espécie *T. cruzi* é composta de várias subpopulações, que possuem cepas que circulam em hospedeiros mamíferos domésticos e selvagens, e insetos vetores. Dessa forma, no ano de 2009 foi proposto um consenso para classificação e nomenclatura intraespecífica de *T. cruzi*. Essa classificação aborda seis linhagens genéticas, unidades de tipagem discreta (Discrete Typing Units DTUs), chamadas de TcI a Tc VI, baseando-se nos padrões genéticos, bioquímicos ou marcadores biológicos (ZINGALES et al., 2009; ZINGALES et al., 2012). No entanto, existe ainda um sétimo DTU restrito aos morcegos TcBat (MARCILI et al., 2009) (Fig.3).



Fig. 3 Prevalência de DTUs do *T. cruzi* em países América do Norte, Central e do Sul.

Fonte: Adaptado de Zingales (2018)

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

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

O protozoário *T. cruzi* possui proteínas em sua superfície que auxiliam no processo de invasão, essas proteínas podem diferir nos diferentes estágios do parasita. O *T. cruzi* possui formas infectivas e não infectivas. Os epimastigotas são formas não infectivas, mas replicativas, que estão no inseto vetor. As amastigotas são formas que se replicam no interior de células mamíferas, e foi demonstrado que elas podem ser infectivas (MORTARA et al., 1991). Entretanto, os tripomastigotas são infectivos, mas não replicativos, e 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, apresenta moléculas importantes para interação entre o parasito e o hospedeiro (PECH-CANUL, 2017). Algumas moléculas que participam da interação do parasito com células do hospedeiro são expressas tanto em tripomastigotas metacíclicos quanto em

tripomastigotas derivados de cultura, como a cruzipaína (MURTA et al., 1999) e trans-sialidases (MING et al., 1995).

Os mecanismos de invasão celular por tripomastigotas metacíclicos (META) e por tripomastigotas de cultura de tecido (TCT) dependem de moléculas. As glicoproteínas gp35/50, gp82 e gp90 na qual são utilizadas na interação dos metacíclicos com células hospedeiras desencadeiam cascatas de sinalização bidirecional. Os metacíclicos de cepas altamente invasivas, como a CL Brener, utilizam gp82 para aderir e invadir células, molécula capaz de disparar sinalização de Ca^{+2} em ambas células (RAMIREZ et al., 1993), enquanto os parasitos da cepa G, pouco invasivo, utilizam as moléculas gp35/50, menos eficientes na indução de sinais de Ca^{+2} (YOSHIDA e ARAGUTH, 1987). 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 são Tc-85, mucinas e trans-sialidases. A glicoproteína Tc-85 de superfície reconhece a laminina, fibronectina, citoqueratina 18 e integrinas das células hospedeiras. As mucinas, glicoproteínas ancoradas com GPI, são as proteínas de superfície mais abundantes de *T. cruzi*. Estão envolvidas em processos de proteção do parasito contra os mecanismos de defesa do vetor e do hospedeiro, e promovem a adesão e invasão das células de mamíferos (BUSCAGLIA et al., 2006).

As trans-sialidases (TS) pertencem a família GP85-trans-sialidase e transferem ácido siálico de glicoconjugados do hospedeiro para mucinas presentes na membrana do parasito. A sialilação de moléculas na superfície do parasito é importante 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 (DE PABLOS e OSUNA, 2012).

2.2.2 O processo de invasão *T. cruzi*

O *T. cruzi* é um protozoário que tem a capacidade de invadir um grande número de diferentes tipos de células (BURLEIGH E ANDREWS, 1995). O processo de invasão de células hospedeiras podem 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 do *T. cruzi* em célula hospedeira é determinada pelas vias de sinalização induzida pelo parasito, na qual permitem a internalização do parasito e a maturação do vacúolo parasitóforo. Os tripomastigotas possuem a capacidade de invadir essencialmente qualquer tipo de célula nucleada por um mecanismo independente da polimerização da actina do hospedeiro. Estudos relatam que 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).

Além disso, a invasão do *T. cruzi* foi significativamente reduzida após o tratamento com as drogas, colchicina e vinblastina, que interrompem a formação de microtúbulos (RODRIGUEZ, SAMOFF et al. 1996), devido a 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, na qual atuam como doadores de membrana para a formação do vacúolo parasitóforo (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).

Além do tripomastigota como forma infectivas, foi visto também que as amastigotas podem ser infecciosas às células, podendo infectar células por um mecanismo dependente de actina e manter um ciclo replicativo intracelular, assim 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).

2.3 O SISTEMA COMPLEMENTO E O PARASITO

O sistema complemento é um componente chave na resposta da imunidade inata, na qual possui função na primeira linha de defesa contra agentes patogênicos. Ele compreende mais de 35 proteínas, que se tornam ativadas principalmente por três vias: lectina, clássica e alternativa, resultando em respostas biológicas como inflamação, fagocitose e lise de patógenos. Além da resposta inflamatória, o complemento desempenha função na solubilização e remoção de imunocomplexos circulantes para evitar sua deposição e conseqüentemente uma lesão tecidual, também está envolvido com a opsonização de células apoptóticas, contribuindo com a fagocitose e remoção da circulação, além disso, o sistema complemento conecta as

respostas inatas e adquiridas pela ativação de linfócitos B e síntese de imunoglobulinas (LIDANI et al., 2017).

Dessa forma, o *T. cruzi* precisa evadir a resposta imune inata do hospedeiro mamífero e invadir rapidamente as células para progredir na infecção. Durante os momentos iniciais da infecção, os mecanismos mais relevantes do sistema imune em relação aos parasitos são 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. 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- γ , IL-1 β , TNF- α , IL-6, TGF- β e MCP-1/CCL2 (CARRERA-SILVA et al., 2011).

Evitar o ataque do sistema imunológico é um fator determinante para a sobrevivência de patógenos em seus hospedeiros. Estudos já demonstraram que o sistema complemento é capaz de causar lise nas formas tripomastigotas de *T. cruzi* e que existe variação no grau de suscetibilidade ou resistência entre diferentes cepas de *T. cruzi* (CESTARI & RAMIREZ 2010). Em 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., 1981). Os primeiros trabalhos de ativação das vias do complemento com *T. cruzi* demonstram que a forma epimastigota é lisada por meio da via alternativa (NOGUEIRA et al., 1975) e o soro não imune (soro normal) é capaz de causar a lise tanto em epimastigotas quanto tripomastigotas metacíclicos (YOSHIDA e ARAGUTH, 1987).

Nos momentos iniciais da infecção não há produção de anticorpos contra *T. cruzi*. Portanto, as principais vias do complemento ativadas são a via alternativa e a via das lectinas e não a via clássica. Contudo, as três vias são capazes de causar lise no parasito. Foi demonstrado que as lectinas ligadora de manose (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 a membrana plasmática de *T. cruzi* podem ser reconhecidas pelas moléculas de sensor de PAMP, como as MBLs e ficolinas levando à ativação das MASP. 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).

Durante a infecção por *T. cruzi* o complemento é ativado por todas as vias, o processo é parcialmente interrompido devido a presença de proteínas reguladoras do complemento do parasito, reduzindo sua lise (CESTARI et al., 2013; LIDANI et al., 2017). Além das moléculas e fatores de virulência intrínsecos dos microrganismos, uma outra estratégia tem sido descrita para evadir o 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.

2.4 AS VESÍCULAS EXTRACELULARES

A liberação de vesículas extracelulares é um dos mecanismos de comunicação intercelular durante os processos fisiológicos. Descritas inicialmente como pequenas vesículas pelas quais os reticulócitos de ovinos em maturação descartavam componentes celulares obsoletos (TRAMS et al., 1981). Os exossomos e outras vesículas extracelulares (VEs) são consideradas uma forma universal de comunicação célula-célula presente em diversos organismos como, proteobacteria, achaea, procariotos e eucariotos (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 entre 30 a 100 nm e sua liberação parece ser contínua (BARILE, VASSALLI, 2017). No entanto, as microvesículas, que por vezes recebe as denominações de micropartículas ou ectossomos, tem origem a partir de brotações diretamente da membrana plasmática com um diâmetro que varia entre 100 a 1.000 nm (CONNOR et al., 2010).

Essas pequenas vesículas liberadas por células, contém ácidos nucleicos, proteínas e metabolitos essenciais para comunicação celular. Dependendo da célula alvo, as vesículas podem agir localmente ou a distância em tecidos, com sinalização parácrina ou endócrina. Elas são liberadas por células infectadas com vírus, bactérias,

fungos ou parasitas, e tem demonstrado papel fundamental em alterações bioquímicas que ocorrem no patógeno e hospedeiro, incluindo a modulação do sistema imune (DE PABLOS et al., 2018).

2.4.1 Vesículas extracelulares derivadas de *Trypanosoma cruzi*

As VEs derivadas de *T. cruzi* começaram a ser descritas em 1979, mostrando que elas possuíam propriedades antigênicas (SILVEIRA et al., 1979). Diversos estudos sugerem que as VEs desempenham um papel importante na dinâmica das células parasito-hospedeiro 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 (RAMIREZ et al., 2016). 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). Estudos demonstraram 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, sobrevivência do parasito e virulência, sendo o conteúdo de exossomos e microvesículas diferentes (RIBEIRO et al., 2018). A avaliação do conteúdo de ácidos nucleicos em VEs de *T. cruzi* mostraram RNAs presentes em diferentes formas de parasitos e também se diferem dos encontrados em sua célula de origem, indicando um direcionamento específico desses RNAs (BAUTISTA-LÓPEZ et al., 2017). 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 (CHOWDHURY et al., 2017).

As vesículas extracelulares liberadas por patógenos, transferem os fatores de virulência e biomoléculas para as células hospedeiras, aumentando a suscetibilidade

do hospedeiro a infecção. Durante a infecção tanto o hospedeiro quanto o parasito produzem VEs. No entanto, as VEs se ligam ao parasita e conferem proteção contra o ataque do sistema complemento, aumentando a invasão das células do hospedeiro pelo protozoário. O parasito *T. cruzi* evita o efeito de lise do sistema complemento para progredir com sucesso em seu ciclo de vida. Portanto, a liberação de VEs poderia ser uma estratégia usada pelo *T. cruzi* para neutralizar as proteínas do sistema complemento (WYLLIE e RAMIREZ, 2017). Sendo assim, a comunicação ativa entre o *T. cruzi* e seu hospedeiro é um processo bidirecional no qual milhões de VEs de ambos os organismos participam (DE PABLOS et al., 2018).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MEIOS DE CULTURA

Meio LIT (infusão de fígado): extrato de levedura 15 g/L; Na₂HPO₄ 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).

3.2 SOLUÇÕES

TABELA 1 – SOLUÇÕES UTILIZADAS E SUAS COMPOSIÇÕES

SOLUÇÃO	COMPOSIÇÃO
Tampão PSB1X (solução de uso)	NaCl 137mM; KCl 2,7mM; Na ₂ HPO ₄ 10mM; KH ₂ PO ₄ 1,8 mM, pH 7,4
Tampão PBSG	PBS1X e glicose 2% (v/v), pH 8,0

3.3 CULTURA DE CÉLULAS

Parasitas: Neste trabalho foram utilizados parasitos *T. cruzi* das cepas CL Brener e Dm28c (TABELA 2). As culturas axênicas das formas epimastigotas desses parasitos foram mantidas em fase logarítmica de crescimento (com densidade celular entre 1 e 2x10⁷ parasitos/ml) em meio LIT completo suplementado com 10% SFB inativado a temperatura de 28°C (CAMARGO et al., 1964).

TABELA 2 – CLASSIFICAÇÃO DAS CEPAS DE *Trypanosoma cruzi*

CEPA/CLONE	DTUS	PAÍS	HOSPEDEIRO/VETOR
Clone - CL Brener	<i>T. cruzi</i> VI	Rio Grande do Sul, Brasil	<i>Triatoma infestans</i>
Dm28c	<i>T. cruzi</i> I	Carabobo, Venezuela	<i>Didelphis marsupialis</i>

Fonte: Adaptado de ZINGALES et al (2009).

Células: Foram utilizadas células (VERO) células epiteliais renais extraídas de um macaco verdade africano, e células (THP-1) célula monocítica humana, as células foram mantidas em meio RPMI 1640 (Sigma, EUA – com adição de NaHCO₃ 2 g/L e 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% CO₂.

3.4 DIFERENCIAÇÃO DE EPIMASTIGOTA PARA TRIPOMASTIGOTA METACÍCLICO (METACICLOGÊNESE)

Para a metaciclogênese *in vitro*, foram usados epimastigotas no início da fase estacionária, ou seja, no quinto dia de cultivo com densidade celular de aproximadamente 2 e 4x10⁷ parasitos/ml. Uma alíquota de 10 µl da suspensão de epimastigotas foi diluída com 90 µl de tampão PBS, ou seja, fator de diluição 10, e a contagem foi realizada a partir de uma alíquota de 10 µl em câmara de Neubauer (Boeco, Alemanha) sob o microscópio ótico com a objetiva de 40X.

O cálculo do número de parasitos por ml foi determinado na câmara de Neubauer. Depois disso, o volume do cultivo parasitário que contém aproximadamente 1x10⁸ epimastigotas foram coletados e centrifugados a 2.000xg por 10 minutos a 10°C. Os epimastigotas (~1x10⁸) foram ressuspensos em 5 ml de meio LIT completo juntamente com 15 ml de meio Tc100 (Vitrocell) em garrafas médias (75 cm²), incubados a 28°C por 8-10 dias.

3.5 PURIFICAÇÃO DE TRIPOMASTIGOTAS METACÍCLICOS DE *Trypanosoma cruzi*

Os tripomastigotas metacíclicos (METAs) 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 10°C e ressuspensos em 3 ml de tampão PSB 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 metacíclicas passam pela coluna enquanto que as formas epimastigotas ficam retidas, devido as diferenças de carga (TEIXEIRA e YOSHIDA, 1986). Os METAs foram usados imediatamente após a purificação.

3.6 PRODUÇÃO DE TRIPOMASTIGOTAS DE CULTURA DE TECIDO DE *Trypanosoma cruzi*

Tripomastigotas metacíclicos (1×10^7 parasitos/ml) foram usados para infectar células VERO (1×10^6 células/ml) em garrafas de cultura (75 cm^2) com 80% de confluência, MOI10:1, e meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 5% SFB por 24h em estufa umidificada a 37°C sob atmosfera controlada de 5% CO_2 . Após 24h de infecção, foi realizada a troca do meio de cultura, a infecção foi mantida por cerca de 8 dias havendo a troca do meio de cultura diariamente, mantendo em mesmas condições. Após 8 dias de infecção, os tripomastigotas de cultura de tecido (TCTs) eclodiram das células VERO que foram infectadas, foi realizada a coleta do sobrenadante contendo os TCTs e depois foram centrifugados por $3.000 \times g$ por 10 minutos. Em seguida, os TCTs foram usados para infectar novas células.

3.7 INDUÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DA INTERAÇÃO *Trypanosoma cruzi* com CÉLULAS (THP-1) e (VERO)

Epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos e tripomastigotas de cultura de tecido foram incubados em uma relação 5:1 com células THP-1 e/ou VERO (5×10^6 parasitos/ml e 1×10^6 células/ml). As células foram pré-incubadas durante 1h em meio RPMI 1640 sem soro, lavadas e ressuspensas em RPMI 1640 com 1mM CaCl_2 . Durante o estímulo, as células juntamente com os parasitos foram incubadas a 37°C durante 1h. As vesículas extracelulares totais foram obtidas por centrifugação diferencial de 5 min a $1.000 \times g$ para remover as células, uma centrifugação de $4.000 \times g$ durante 30 min para remover células residuais e debris celulares, e logo ultracentrifugação a $100.000 \times g$ por 90min (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 ressuspenso em PBS 1x. Para o isolamento de VEs grandes (large) e pequenas (small) foi realizado centrifugações diferenciais, uma centrifugação de $1.000 \times g$ por 10 min para remoção de células, $4.000 \times g$ por 30 min para remover células residuais e debris celulares, $11.000 \times g$ por 120 min para obter VEs grandes e ultracentrifugação de $100.000 \times g$ por 90 min para obter VEs pequena. O sobrenadante foi descartado e o precipitado (pellet) foi ressuspenso em PBS 1x (ROSSI et al., 2019).

3.7.1 Determinação da concentração de proteína em Vesículas Extracelulares (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.

3.7.2 Mensuração das Vesículas Extracelulares por Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

O tamanho médio e a concentração de VEs foram determinadas por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA), através da plataforma NanoSight. É um método para medir nanopartículas em suspensão líquida na faixa de 10 a 1000 nm com base no movimento browniano.

3.8 SORO NORMAL HUMANO

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

3.9 LISE MEDIADA PELO COMPLEMENTO

Este ensaio mede a capacidade do soro normal humano (SNH) de realizar lise nos parasitos pela ação do sistema complemento. As concentrações de soro foram escolhidas experimentalmente antes da realização de qualquer experimento, baseado na diluição limite que avalia a lise dos parasitos em diferentes concentrações de SNH em determinado tempo e na determinação da IC₅₀, ou seja, utilizar a diluição de soro que lise aproximadamente 50% dos parasitos nos tempos preestabelecidos. Para fazer isso, foram realizados 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%). Formas epimastigotas, tripomastigotas metacíclicas e/ou tripomastigota de cultura de tecido de *T. cruzi* foram centrifugadas a 1.000xg por 10 minutos, 4°C , lavadas e suspensas em RPMI na concentração de $5 \times 10^6/\text{ml}$. Os parasitos (5×10^5 em 100 μl) foram incubados juntamente com 100 μl de SHN por 30 minutos a 37°C . As reações foram paradas por intermédio da adição de 800 μl 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 contado no mínimo dois quadrantes da câmara de Neubauer.

3.10 DINÂMICA DE LIBERAÇÃO DE TRIPOMASTIGOTAS DE CULTURA DE TECIDO (TCTs)

As células VERO foram semeadas em placas de 6 poços por 16-24h, a uma concentração de 1×10^5 células/poço com RPMI 1640 10% SFB. Depois disso, as células foram lavadas com RPMI 1640 sem soro e incubadas com tripomastigotas de cultura de tecido (TCTs) (5×10^5 parasitos/poço, MOI 5:1) a temperatura de 37°C. Após 1h de incubação, as células foram lavadas com RPMI 1640 com 5% SFB para retirar os TCTs remanescentes. Foi realizada a troca diária do meio de cultura, e contado o número de TCTs no sobrenadante em câmara de Neubauer para acompanhar a liberação dos TCTs. A contagem foi realizada a partir de uma alíquota de 10 µl em câmara de Neubauer (Boeco, Alemanha) sob o microscópio óptico com a objetiva de 40X, por um período de 7 dias consecutivos.

3.11 ENSAIOS DE INVASÃO EM 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 1×10^6 células/poço. Depois disso, as células foram lavadas com RPMI 1640 sem soro e incubadas com tripomastigotas de cultura de tecido (TCTs) (5×10^6 parasitos/poço, MOI 5:1). Após 3h e/ou 1h 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 µl desta solução por poço, corando por aproximadamente 15 min. Depois, 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® (Merck). As lamínulas foram analisadas em microscópio óptico na ampliação de 1.000x. 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.

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos com 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 8.0).

4. RESULTADOS

4.1 CICLO BIOLÓGICO DO *Trypanosoma cruzi in vitro*

Com a finalidade de reproduzir o ciclo biológico do *T. cruzi in vitro*, e caracterizar as diferentes formas do parasito nas cepas CL Brener e Dm28c, foi realizado um desenho experimental que compreendeu desde as formas epimastigotas até as formas infectivas tripomastigotas metacíclicas e tripomastigotas derivadas de cultivo celular (Fig.4).

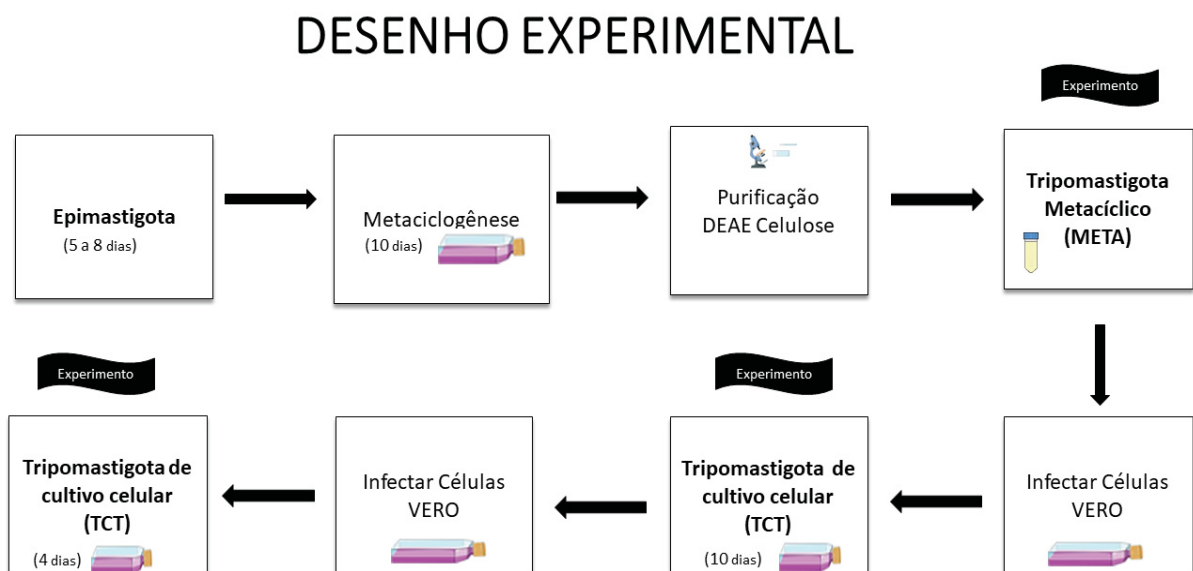


Fig. 4 Desenho experimental do ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi in vitro*.

Posteriormente, foi iniciado o cultivo axênico de epimastigotas das cepas CL Brener e Dm28c, suas curvas de crescimento foram avaliadas, iniciando com 1×10^6 parasito/mL em meio de cultura LIT suplementado com 10% de SFB à 28°C. O crescimento do parasito das cepas CL Brener e Dm28c foi avaliado pela contagem do número de parasitas diariamente em uma câmara de Neubauer por microscopia óptica, durante 5 dias consecutivos. A cepa Dm28c demonstrou ter uma tendência maior de replicação em relação a CL Brener (Fig.5).

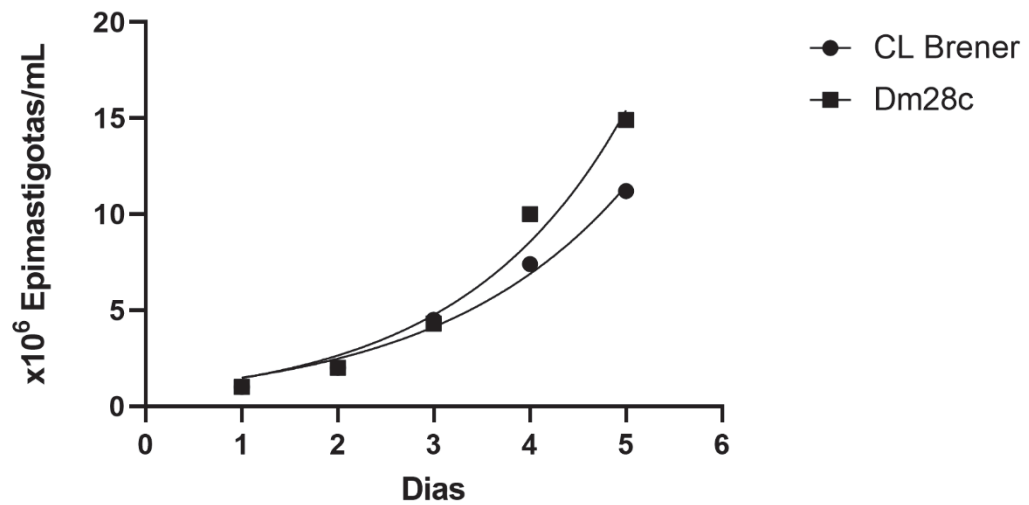
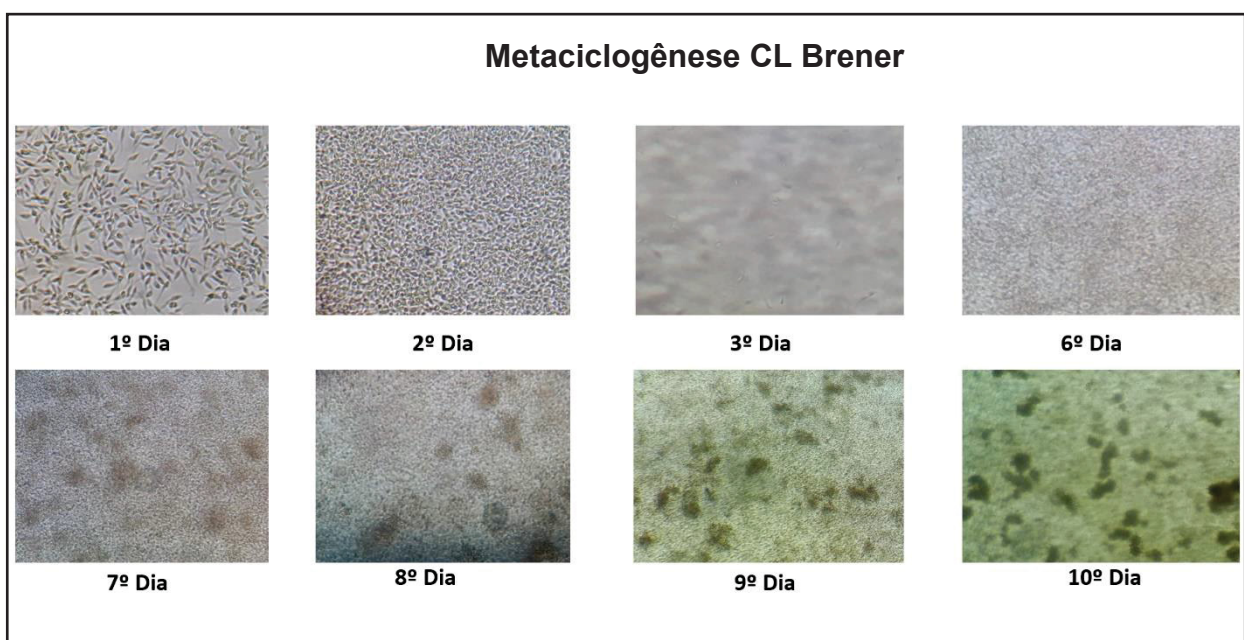


Fig. 5 Curva de Crescimento de Epimastigotas das cepas CL Brener e Dm28c.

Durante sua passagem pelo inseto triatomíneo, as formas epimastigotas de *T. cruzi* sofrem diferenciação à tripomastigotas metacíclicos, processo que pode ser simulado em laboratório pela exposição dos parasitos a uma carência nutricional.

Assim, após conhecer a curva de crescimento dos epimastigotas das cepas CL Brener e Dm28c fomos analisar a capacidade de diferenciação em formas tripomastigotas metacíclicas (METAs). Realizamos a metaciclogênese desses parasitas por um período de 10 dias em condição de carência nutricional (Fig.6).



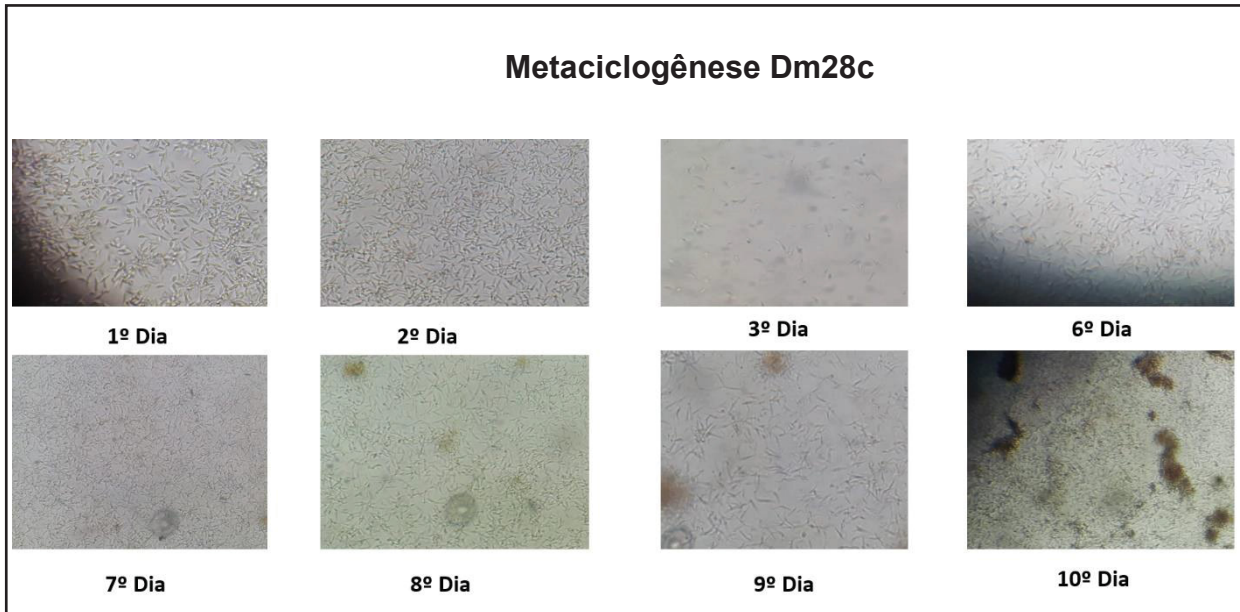


Fig. 6 Metaciclogênese das cepas CL Brener e Dm28c acompanhadas através de imagens por 10 dias consecutivos.

Durante o período de metaciclogênese, observamos através de microscopia óptica, características morfológicas sofrerem alterações com o passar do tempo, até chegar à diferenciação de epimastigota para tripomastigota metacíclicos. Foi possível observar a mudança de uma forma mais arredondada e de menor movimento do corpo em EPIs, para uma forma mais delgada e com movimentos flagelares concisos em METAs (Fig.7).

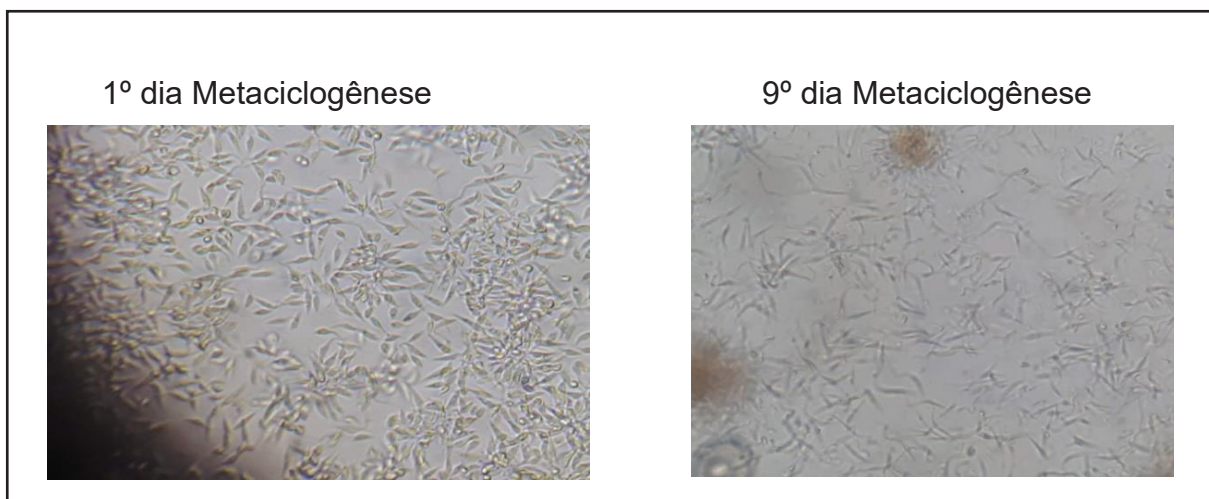


Fig.7 Comparação do primeiro e nono dia de metaciclogênese da cepa Dm28c por imagens.

Depois de induzir a metacicloogênese, os parasitas foram purificados por meio de uma coluna de troca iônica DEAE celulose, na qual os EPIs em pH 8.0 ficam retidos na coluna enquanto os METAs passam através dela, devido as diferenças de carga da superfície dos parasitas. Posteriormente formas tripomastigotas metacíclicas purificadas foram utilizadas em ensaios fenotípicos.

Durante muito tempo, nosso grupo de pesquisa tem trabalhado e estudado os tripomastigotas metacíclicos, com a finalidade de entender os mecanismos de evasão do sistema imune do hospedeiro e o papel das vesículas extracelulares no primeiro contato do parasita com o hospedeiro mamífero. Uma vez entendido, e descrito pelo nosso grupo, o efeito das vesículas extracelulares na inibição do sistema complemento e na promoção da invasão a células eucarióticas (CESTARI et al., 2012; RAMIREZ et al., 2016; WILLYE et al., 2017), decidimos avançar no ciclo parasitário.

Sendo assim, para que a linha de pesquisa pudesse abranger também momentos posteriores da infecção, foi necessário a introdução do modelo de tripomastigota de cultivo, que representam a contraparte experimental dos tripomastigotas sanguíneos liberados pelas células infectadas. Queríamos entender como as outras formas infectivas, os tripomastigotas de cultura de tecido se comportavam, desde a sua invasão até a eclosão em células do hospedeiro, a produção e caracterização de suas vesículas extracelulares.

Sendo assim, utilizamos os METAs (1×10^7 parasito/ml) das cepas CL Brener e Dm28c separadamente para infectar células VERO em garrafas de cultura (75cm^2) semiconfluentes, com o objetivo de produzir os TCTs. Após um dia de infecção, as células foram lavadas através da troca do meio de cultura RPMI 5% SFB e mantidas à 37°C em atmosfera de 5% CO_2 . A infecção foi mantida por um período de 10 dias à 37°C em atmosfera de 5% CO_2 realizando a troca do meio de cultura diariamente. Após esse período, obtivemos tripomastigota de cultura de tecido (TCTs), que foram coletados e utilizados para infectar novas células. O esquema das diferentes etapas no ciclo biológico *in vitro* pode se observar na figura (Fig.4).

Para entender como acontece o processo de infecção e liberação de TCTs a partir de células infectadas, realizamos experimentos que denominamos dinâmica de liberação dos TCTs. Nesse ensaio, pretendíamos entender a cinética de liberação dos TCTs. Para isso, células VERO foram plaqueadas 24h antes da infecção com 1×10^5 células/mL em placas de 6 poços. Posteriormente as células foram infectadas com 5×10^5 parasito/mL (MOI de 5:1) das cepas CL Brener e Dm28c por um período de 1h

em meio carenciado à 37°C em atmosfera de 5% CO₂. Depois desse período, as células foram lavadas com meio de cultura RPMI 5% SFB e mantidas à 37°C em atmosfera de 5% CO₂. Realizamos a troca do meio de cultura RPMI 5% SFB diariamente, por meio da retirada do sobrenadante, e contagem dos parasitos que eclodiram das células em câmara de Neubauer.

Foi observado por meio da contagem de parasitas no sobrenadante, que no 4º dia pós infecção (d.p.i) houve um pico de liberação dos TCTs das duas cepas. Um novo pico de liberação de parasitas também foi observado no 7º (d.p.i), decorrente possivelmente pela reinfeção dos parasitas liberados a partir do 3º (d.p.i) em células presentes na cultura, mas que não haviam sido infectadas anteriormente. Observou-se que a cepa Dm28c possui uma tendência maior de liberação de TCTs ao longo dos dias em relação a CL Brener (Fig.8).

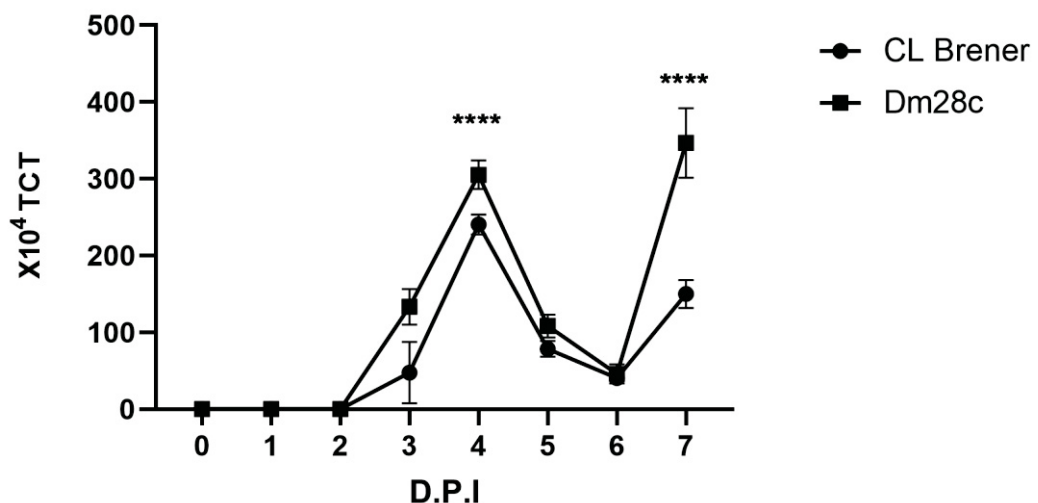


Fig.8. Dinâmica de liberação de TCTs das cepas CL Brener e Dm28c MOI 5:1 em células VERO.

Posteriormente nos perguntamos se a mesma dinâmica de liberação de parasitas ocorreria ao diminuir a carga de infecção para MOI 2:1, na qual foram plaqueadas células VERO com concentração 5x10⁵ células/mL 24h em placas de 6 poços antes do experimento, e infectadas com 1x10⁶ parasito/mL por um período de 1h em meio carenciado à 37°C em atmosfera de 5% CO₂. Posteriormente as células foram lavadas com meio de cultura RPMI 5% SFB, e contabilizado o número de TCTs diariamente com a troca do meio de cultura RPMI 5% SFB. Observou-se que a cepa

Dm28c continuou a liberar uma quantidade maior de TCTs em relação a CL Brener com o primeiro pico de liberação no 4º (d.p.i) e segundo pico no 7º (d.p.i) (Fig.9).

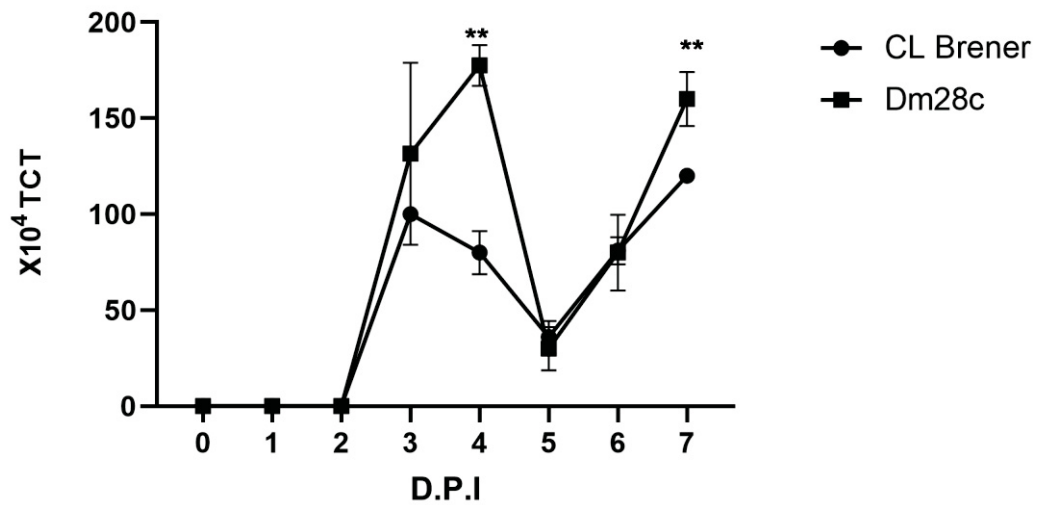


Fig.9. Dinâmica de liberação de TCTs das cepas CL Brener e Dm28c MOI 2:1 em células VERO.

4.2 ENSAIO DE LISE MEDIADO PELO SISTEMA COMPLEMENTO

Com o objetivo de caracterizar fenotipicamente as cepas CL Brener e Dm28c utilizadas em nosso estudo, fomos analisar a ativação do sistema complemento, em ensaios de lise pelo complemento no estágio de epimastigotas. Foram utilizadas diluições seriadas de soro normal humano (SNH) com concentrações de 25%, 12,5%, 6,25% e controle na ausência de SNH (0%), em contato com os parasitas por um período de 30 minutos à 37°C. Verificamos que a cepa Dm28c nesse estágio é mais sensível ao complemento em relação a CL Brener em todas as concentrações de SNH, pois houve mais parasitas lisados na presença de SNH, diminuindo a sobrevivência do parasito (Fig.10).

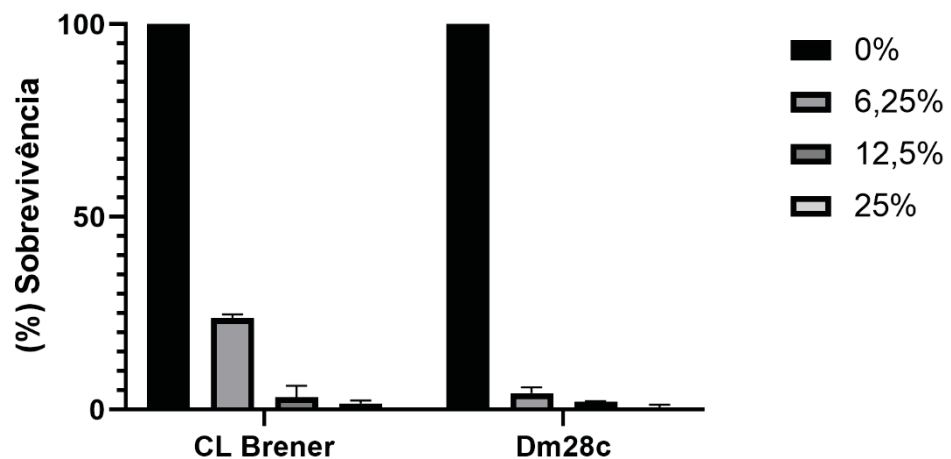


Fig.10. Percentual de sobrevivência do parasito após o contato com SNH e ativação do sistema complemento em epimastigotas das cepas CL Brener e Dm28c por 30 minutos à 37°C com concentrações de 6,25%; 12,5% e 25% SNH.

Posteriormente fomos verificar a sensibilidade a lise no estágio de tripomastigotas metacíclicos. O perfil da lise pelo sistema complemento nas formas metacíclicas é diferente aos epimastigotas, nas cepas CL Brener e Dm28c. Em nossos experimentos na presença de SNH com concentrações de 50%, 25%, e 12,5% à 37°C por 30 minutos, foi observado uma maior resistência ao complemento, conseqüentemente menor lise (Fig.11). Observamos a sobrevivência de cerca de 60% dos parasitos em ambas as cepas com uma concentração fisiológica de 50% de SNH.

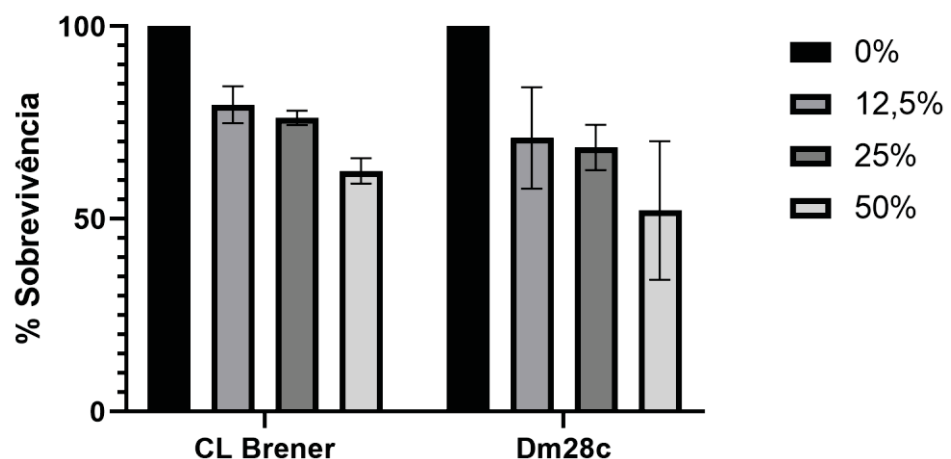


Fig. 11. Percentual de sobrevivência do parasito após o contato com SNH e ativação do sistema complemento em tripomastigota metacíclicos das cepas CL Brener e Dm28c por 30 minutos à 37°C com concentrações de 12,5%; 25% e 50% SNH.

No estágio de tripomastigota de cultura de tecido (TCT) observamos que a lise mediada pelo sistema complemento é pouco eficaz, as cepas CL Brener e Dm28c em contato com 50% de SNH à 37°C por 30 minutos possuem alto percentual de sobrevivência, isso pode acontecer devido a mecanismos transientes de evasão do sistema imune serem mais efetivos, uma vez que já foram ativados anteriormente no estágio tripomastigota metacíclicos (Fig.12).

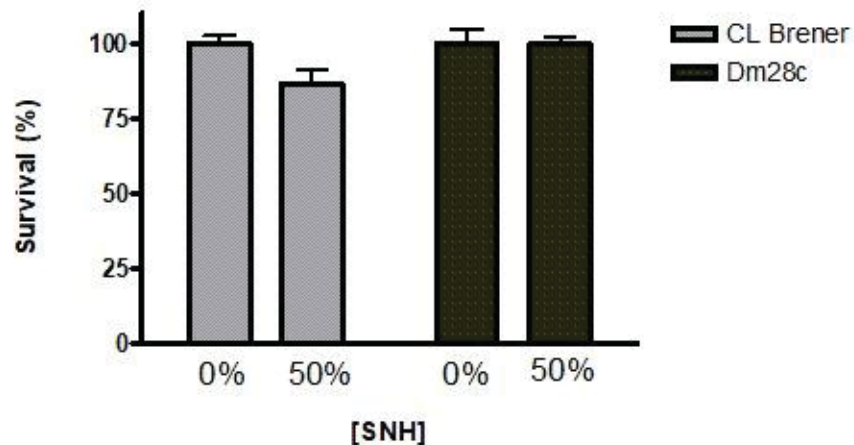


Fig.12. Percentual de sobrevivência do parasito após o contato com SNH e ativação do sistema complemento em tripomastigota de cultura de tecido (TCT) das cepas CL Brener e Dm28c por 30 minutos à 37°C com 50% concentração de SNH.

Devido aos mecanismos transientes de evasão do sistema imune em tripomastigota de cultura de tecido (TCT) serem muito efetivos, resolvemos estudar e caracterizar o impacto da interação de TCTs com vesículas extracelulares (VEs) e no processo de invasão celular em células VERO.

4.3 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES

Depois de conhecer o perfil de ativação do sistema complemento das cepas CL Brener e Dm28c em epimastigotas (EPs), tripomastigotas metacíclicos (METAs) e tripomastigota de cultura de tecido (TCTs) fomos avaliar o processo de liberação de VEs por *T. cruzi*

Realizamos a indução da liberação de VEs das cepas CL Brener e Dm28c em (EPs), (METAs) e (TCTs), através da interação com células eucarióticas, modelo previamente caracterizado pelo nosso grupo, na qual pretende simular o primeiro

contato do parasita com o sistema imune, na interação parasitária com uma linhagem de monócitos humanos, THP-1. Foi realizado uma relação de 5 parasitos: 1 célula (THP-1), com 1mM de CaCl₂ por 1h à 37°C. Observamos que os TCTs possuem a capacidade de produzir uma quantidade de 25 a 50% maior de VEs que as formas metacíclicas e epimastigotas.

A (Tabela 3) mostra uma relação dos ensaios de microvesiculação e a dosagem de proteínas por método de Micro BCA das vesículas extracelulares obtidas nos ensaios.

TABELA 3. PRODUÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES

Cepa CL Brener	Estágio	[] <i>T. cruzi</i>	[] THP-1	ug Proteínas
	EPI	10X10 ⁶	2x10 ⁶	13 ug
META	5x10 ⁶	1x10 ⁶	10 ug	
TCT	5x10 ⁶	1x10 ⁶	18 ug	
Cepa Dm28c	Estágio	[] <i>T. cruzi</i>	[] THP-1	ug Proteínas
	EPI	10X10 ⁶	2x10 ⁶	10 ug
META	5x10 ⁶	1x10 ⁶	16 ug	
TCT	5x10 ⁶	1x10 ⁶	32 ug	

Posteriormente, analisamos a indução da liberação de VEs a partir da interação de TCTs de CL Brener e Dm28c com células eucarióticas THP-1 e VERO. Curiosamente, verificamos uma produção maior de VEs através da dosagem de proteínas na interação com células VERO (Fig.13).

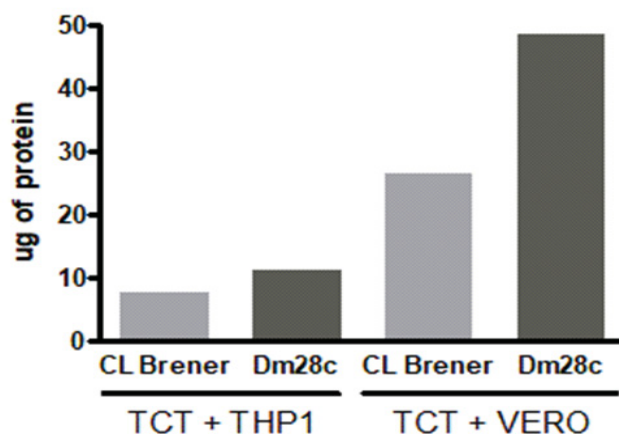


Fig.13. Indução de liberação de vesículas extracelulares de TCT CL Brener e Dm28c com células THP-1 e VERO.

Além de quantificar as VEs por dosagem de proteínas, fizemos a caracterização das VEs de TCTs CL Brener e Dm28c com interação com células THP-1 por Nanoparticle tracking analysis (NTA), um método mais específico e sensível, que nos permitiu conhecer a população de vesículas liberadas em concentração e tamanho médio.

A interação foi realizada com concentração de 1×10^7 TCT/mL CL Brener e Dm28c com 2×10^6 THP-1 com 1mM CaCl_2 à 37°C por 1h, em seguida foram empregadas centrifugações diferenciais para separar as populações maiores de menores VEs. Foi observado que a cepa Dm28c com interação com THP-1 produziu uma maior concentração de VEs no tamanho large (maiores) e Dm28c sem interação em relação a CL Brener (Fig.14).

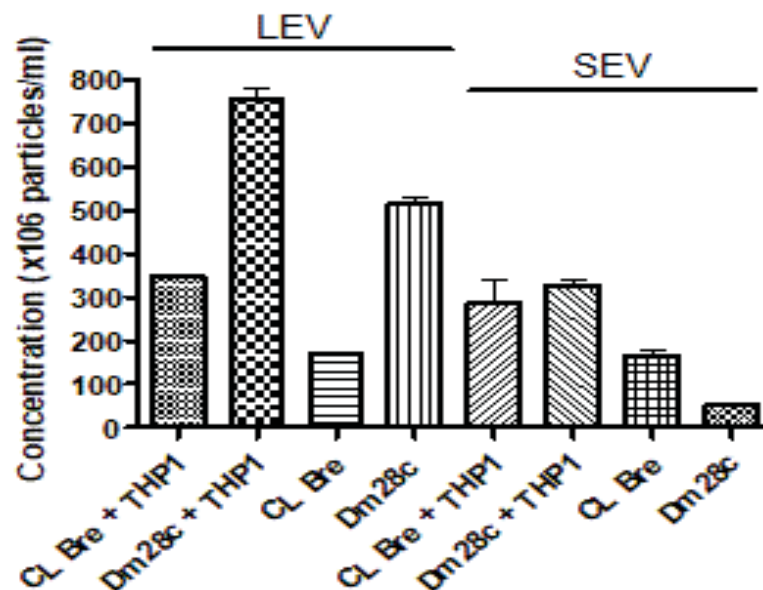


Fig.14. Concentração de VEs de CL Brener e Dm28c caracterizadas por NTA.

Além disso, foi mensurado o tamanho dessas VEs, e observamos vesículas grandes de CL Brener e Dm28c com interação com THP-1 que possuem cerca de 205 nm (Fig.15). Curiosamente em nosso ensaio, o tamanho das vesículas menores foi acima do esperado. Com a caracterização das vesículas de interação realizamos os ensaios fenotípicos de invasão celular.

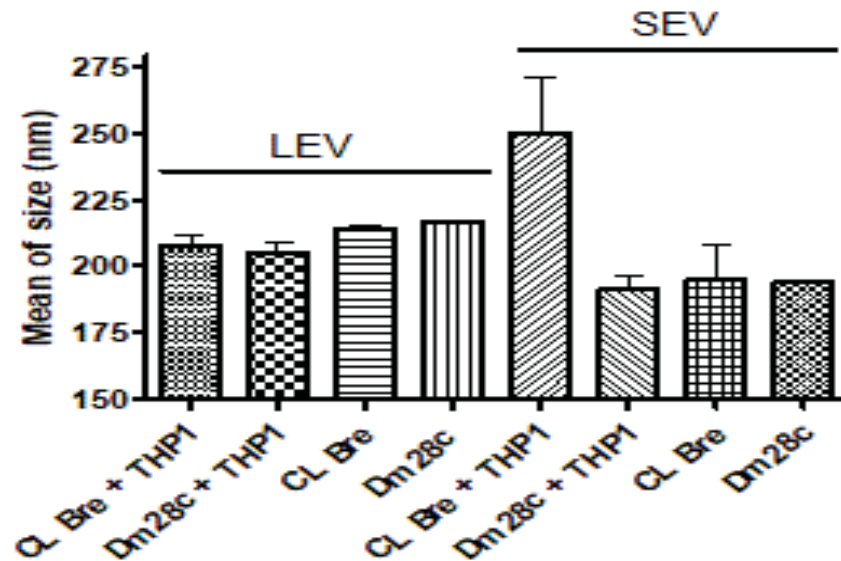


Fig. 15. Tamanho médio das VEs de CL Brener e Dm28c mensuradas por NTA.

4.4 ENSAIOS FENOTÍPICOS DE INVASÃO CELULAR NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE VESÍCULAS EXTRACELULARES

Em razão da polaridade das cepas CL Brener e Dm28c, resolvemos analisar o processo de invasão celular, através de infecções de tripomastigotas de cultura em células VERO, contando o número de amastigotas intracelulares. Os ensaios foram realizados plaqueando células VERO 24h antes da infecção com 1×10^5 células/mL e infectadas com 5×10^5 TCT/mL por 3h em meio carenciado à 37°C das cepas CL Brener e Dm28c, depois coradas com Giemsa e contabilizadas em microscopia óptica. Observamos que a cepa Dm28c foi capaz de invadir 80% das células VERO, uns 25-30% a mais em relação a CL Brener (50-60%) nas mesmas condições (Fig.16).

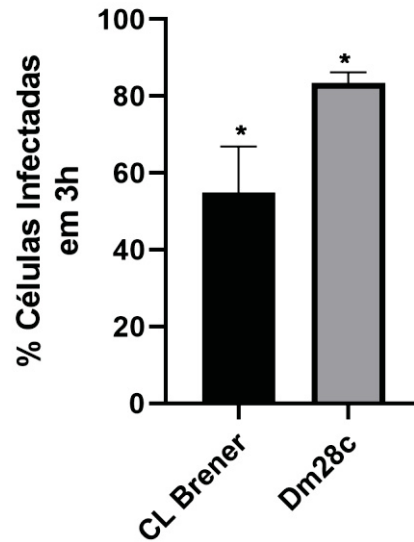


Fig.16. Percentual de células infectadas das cepas CL Brener e Dm28c à 37° por 3h.

Além disso, a contagem do número de amastigotas no interior das células mostrou que a cepa Dm28c foi capaz de infectar uma proporção maior de células, com presença de 1 até 5 amastigotas intracelulares em cada célula contada (Fig.17).

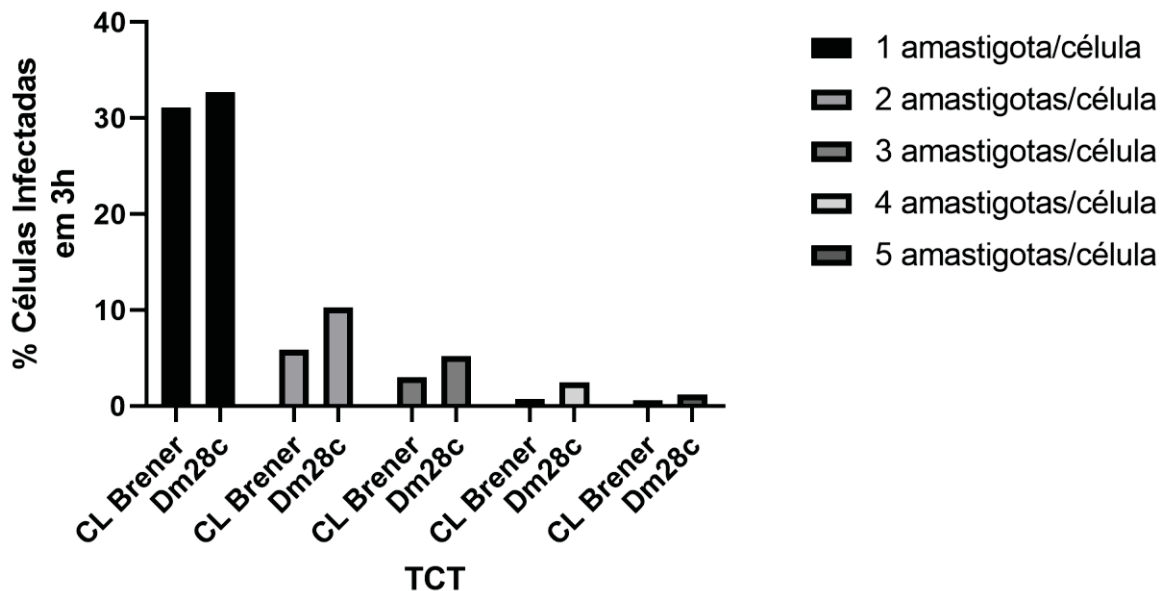


Fig. 17. Percentual de células infectas por TCTs CL Brener e Dm28c por 3h à 37°C em células VERO.

Com o intuito de verificar se as VES advindas da interação parasito/célula hospedeira aumentavam ou diminuam o número de parasitas que infectavam células

VERO, realizamos ensaio de invasão celular na presença de VES da cepa CL Brener sobre a infecção de CL Brener por um período de 1h em meio carenciado à 37° com MOI 5:1. Observamos um aumento de infecção dose dependente, na qual 5ug de vesículas purificadas aumentaram 2 vezes mais a infecção em células em relação a infecção controle por meio da contagem de amastigotas intracelulares no interior das células (Fig.18). O efeito de aumento da invasão, foi visto também contabilizando o número de amastigotas intracelulares por célula, onde há uma tendência de aumento no número de células infectadas tendo 1 ou dois amastigotas por célula (Fig.19).

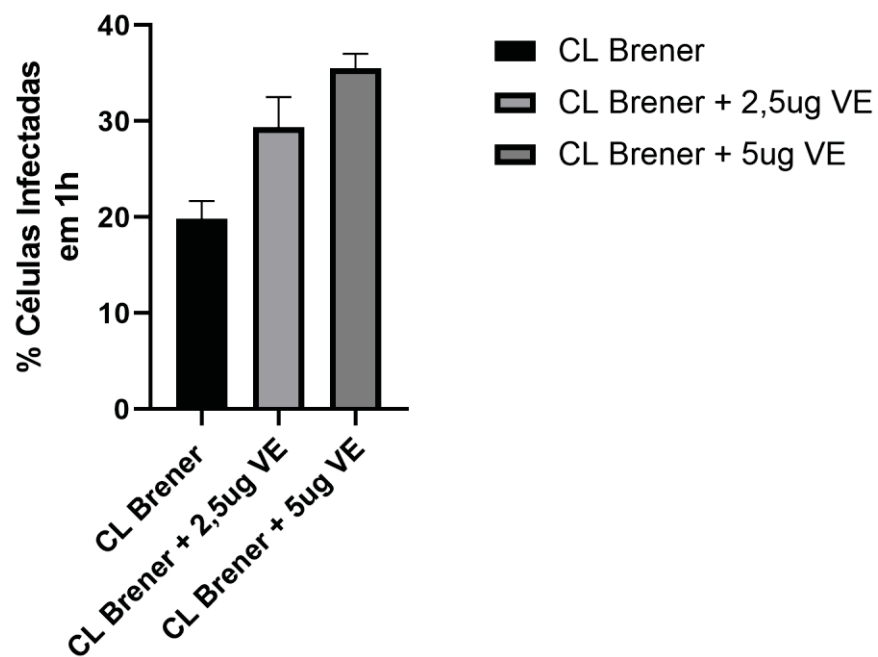


Fig.18. Percentual de células infectadas por 1h da cepa CL Brener à 37°C na presença de vesículas extracelulares.

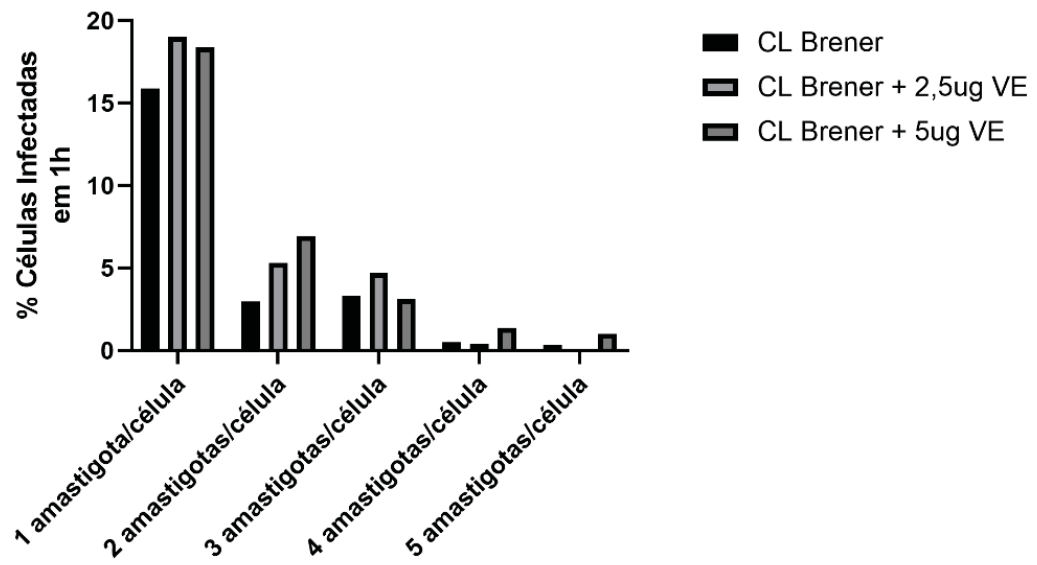


Fig.19 Percentual de células infectas por 1h da cepa CL Brener à 37°C contabilizados o número de amastigotas por célula.

5. DISCUSSÃO

O ciclo de *T. cruzi* é complexo e envolve diferentes cenários, passando desde o inseto vetor até o hospedeiro mamífero. As adaptações evolutivas/ecológicas de *T. cruzi* permitiram que este sofresse uma série de transformações morfológicas e em sua composição, na qual geralmente são classificadas em 4 formas evolutivas, epimastigotas, tripomastigotas metacíclicas, amastigotas e tripomastigotas sanguíneos. Diversos grupos tem tentado compreender a biologia deste complexo protozoário, sendo não muito comum os grupos que contemplam o ciclo completo em suas linhas de pesquisa.

Nosso grupo tem trabalhado amplamente com epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas, e neste trabalho, objetivamos obter formas tripomastigotas de cultivo em nosso laboratório, permitindo acompanhar aspectos de momentos posteriores/crônicos da infecção, no qual os parasitos são liberados das células infectadas e podem reiniciar seu ciclo invadindo novas células do hospedeiro. O nosso objetivo central foi caracterizar fenotipicamente as vesículas extracelulares liberadas durante a interação parasito-célula hospedeira.

É possível simular o ciclo de T. cruzi in vitro

Estudos realizados por Gonçalves et al (2018) mostraram que o protozoário *T. cruzi* utiliza várias estratégias para sobreviver em diferentes hospedeiros. Uma dessas estratégias do parasita é a metaciclogênese, que envolve várias mudanças morfológicas, bioquímicas e genéticas, na qual induzem a diferenciação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas. A metaciclogênese ocorre no trato digestivo do inseto-vetor triatomíneo, após a adesão dos epimastigotas à parede intestinal. Dessa forma, a metaciclogênese tem sido simulada *in vitro*, sendo que fatores como adesão a um substrato e carência nutricional são relatados como indutores da diferenciação do parasito (CONTRERAS et al., 1985).

A adesão ao substrato é desencadeada pelo estresse nutricional, e as proteínas acumuladas nos reservossomos são utilizadas como fonte de energia durante a diferenciação. Foi visto que na adição de soro fetal bovino induziu o crescimento de epimastigota, mas inibiu a metaciclogênese, e poucos parasitas aderiram ao substrato, além disso o estresse nutricional parece ativar a adenil ciclase

e o conteúdo de AMP cíclico intracelular. Os níveis de AMP cíclico pode melhorar a resistência do epimastigota ao estresse oxidativo (Figueiredo et al., 2000; Hamedi et al., 2015; Sternlieb et al., 2020).

Após a diferenciação, é empregada a metodologia de purificação dos metacíclicos *in vitro*, através de uma coluna de troca iônica, no qual os epimastigotas se aderem a matriz de DEAE celulose equilibrada a pH 8,0, enquanto o metacíclicos são “eluídos” devido ao seu diferente ponto isoelétrico de membrana (TEIXEIRA e YOSHIDA, 1986). Neste estudo, nós submetemos as cepas CL Brener e Dm28c ao processo de diferenciação por carência nutricional, e observamos a adesão dos epimastigotas no substrato. Foi possível observar a mudança de uma forma mais arredondada e de menor movimento do corpo em EPIs, para uma forma mais delgada e com movimentos flagelares concisos em METAs (Fig.6). Durante o processo de diferenciação, ocorre a indução da expressão de diferentes moléculas relacionadas aos tripomastigotas. Um exemplo é a cruzipaina, que parece favorecer a metaciclogênese (TOMAS et al., 1997). Além disso, também foi analisada o tráfego de gp82 e gp90 durante o processo (BAYER-SANTOS e SILVEIRA, 2013).

Os tripomastigotas metacíclicos utilizam um conjunto de diferentes moléculas em relação aos tripomastigotas sanguíneos (tripomastigota de cultura de tecido *in vitro*) no processo de invasão celular. Os tripomastigotas metacíclicos expressam moléculas relacionadas a invasão como a gp82, gp90 e mucinas como ag 35-50, enquanto que para os tripomastigotas sanguíneos utilizam Tc-85, mucinas e trans-sialidases (Yoshida, 2006; Yoshida et al., 2000). Além disso, parece haver dois mecanismos de invasão celular, lisossomo-dependente e lisossomo-independente, conforme revisado por (ALVES e COLLI, 2007).

Em METAs a invasão celular é principalmente lisossomo-dependente. O parasita invade as células a partir do reparo de membrana plasmática, uma exocitose de lisossomo regulada por Ca^{2+} e cinesina, ativando o vacúolo parasitóforo. Enquanto que em TCTs ocorre predominantemente por lisossomo-independente. O processo envolve a invaginação na membrana plasmática da célula hospedeira, originando no vacúolo intracelular e posterior fusão com lisossomos independente de actina. O processo desencadeia o acúmulo de Inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) na membrana plasmática por meio do contato com os parasitas (BURLEIGH BA, WOOLSEY AM, 2002; ANDRADE LO, ANDREWS NW, 2005; CORTEZ et al., 2016).

Posteriormente, no vacúolo parasitóforo ocorre a acidificação lisossomal, fator que permite a fuga dos metacíclicos do ambiente extremamente oxidativo do fagolisossomo para o citoplasma, onde se diferenciam em formas amastigotas (CARDOSO et al., 2016). As amastigotas além de serem a forma replicativa intracelular, elas podem ser infecciosas às células por mecanismo dependente de actina (MORTARA et al., 2008).

Características das cepas CL Brener e Dm28c de T. cruzi

O protozoário apresenta grande diversidade genética. Atualmente o *T. cruzi* está dividido em sete unidades de tipagem discreta (DTUs) TcI- TcVI e Tcbat, na qual a cepa CL Brener pertence a DTU (VI) e Dm28c a DTU (I) (ZINGALES et al., 2009; ZINGALES et al., 2018). Sendo assim, nesse trabalho estudamos e caracterizamos cepas polares, na qual se diferenciam no processo de invasão celular e na liberação de vesículas extracelulares. No processo de invasão celular, os tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa CL Brener foram capazes de detectar a presença de células mamíferas, e alteraram seus padrões de motilidade, aumentando sua eficiência na invasão celular (ARIAS-del-ANGEL et al., 2020). Além disso, ensaios com esferóides em cultura 3D evidenciaram que os tripomastigotas de CL Brener apresentavam grande capacidade de transmigrar dentro de esferóides (RODRÍGUEZ et al., 2020).

Estudos realizados em camundongos com as cepas CL Brener e Dm28c apresentaram baixa mortalidade em camundongos, porém demonstraram uma redução da motilidade intestinal em camundongos infectados (de MELO MEDEIROS et al., 2010). Além disso, foi observado que a cepa Dm28c exibe maior taxa de replicação em relação a CL Brener. Considerando a replicação intracelular de Dm28c, houve um aumento na taxa do ciclo de replicação quando comparado com CL Brener. Em ensaio de invasão celular foi observado que a cepa Dm28c é mais infectiva quando comparado a CL Brener (Fig. 16) (RESENDE et al., 2020).

Vesículas extracelulares representam um mecanismo de virulência de T. cruzi

O protozoário *T. cruzi* tem a capacidade de liberar vesículas extracelulares, nas formas epimastigotas, tripomastigotas metacíclicas e tripomastigotas derivados de cultura de tecidos (Da SILVEIRA et al., 1979; BAYER-SANTOS et al., 2013;

GONÇALVES et al., 1991; CESTARI et al., 2012; NEVES et al., 2014). A secreção de VEs tem efeitos biológicos que resultam na transferência de proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e muitas outras moléculas bioativas que podem modificar as funções das células alvo (Szempruch et al., 2016). Além disso, as VEs participam da comunicação celular e da interação parasito-célula hospedeira. Nessa interação, a liberação de VEs são capazes de modificar o fenótipo e função da célula alvo (EVANS-OSES et al., 2015).

Estudos anteriores do nosso grupo relatam que as microvesículas de interação (MVs) evade o sistema imunológico do hospedeiro. Essas microvesículas se ligam à enzima C3 convertase e inibem sua atividade catalítica, fornecendo proteção contra a lise mediada pelo complemento. Além disso, as MVs foram capazes de causar resistência na lise mediada pelo sistema complemento e aumentar a invasão celular das formas metacíclicas. VEs de interação entre *T. cruzi* e células THP-1 foram capazes de aumentar a invasão celular em células VERO infectadas pelo protozoário (CESTARI et al., 2012; RAMIREZ et al.; 2017; WYLLIE e RAMIREZ, 2017).

Nos ensaios de invasão celular na presença de VEs de interação, CL Brener e THP-1, observamos que a cepa CL Brener teve a capacidade de aumentar a invasão em células hospedeiras. Nós observamos um aumento de infecção dose dependente, na qual 5ug de vesículas purificadas aumentaram duas vezes mais a infecção em células em relação a infecção controle (Fig.18). Estudos relatam que as VEs possuem a capacidade de interagir com os tecidos do hospedeiro, aumentar a invasão e modular a resposta inata do hospedeiro, além de estar envolvido na adesão do parasita às células hospedeiras e participam da comunicação intracelular por meio do transporte de moléculas funcionais (MOREIRA et al.; 2019; CRONEMBERGER-ANDRADE et al., 2020).

Além disso, a cepa Dm28c demonstrou ter uma tendência maior de microvesiculação em relação a CL Brener. Diferenças na produção de VEs entre diferentes cepas de tripomastigotas derivados de cultura de células também foram observados por Nogueira et al., (2015). Conforme descrito anteriormente, as VEs podem ser produzidas pelos diferentes estágios do parasito. Estudos realizados por Moreira et al (2021), mostram que as VEs de tripomastigotas de cultura de células apresentam maior adesão em comparação VEs de epimastigotas.

Em camundongos, foi visto que a inoculação prévia com vesículas liberadas por *T. cruzi* acelerou e aumentou a taxa de mortalidade. Esses camundongos

infectados com vesículas desenvolveram uma patologia cardíaca grave com uma reação inflamatória intensa e um maior número de ninhos de amastigotas. Além disso, foi relatado que as VEs aumentaram o parasitismo cardíaco, e a imunomodulação e evasão da resposta imune do hospedeiro, diminuição do óxido nítrico plasmático e modulação da produção de citocinas (TROCOLI-TORRECILHAS et al., 2009; LOVO-MARTINS et al.; 2018). Dessa forma, a liberação de VEs auxiliam o parasita na invasão celular, evasão do sistema imunológico e indução de respostas inflamatórias.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho

1. Fomos capazes de cultivar *in vitro* as cepas CL Brener e Dm28c de *Trypanosoma cruzi* em todos os seus estágios.
2. A cepa Dm28c demonstrou ter uma tendência maior de replicação em relação a CL Brener.
3. Avaliamos a dinâmica de liberação do parasito, quando as células VERO foram infectadas com TCTs.
4. Observamos que a cepa Dm28c foi capaz de invadir 80% das células VERO, sendo mais infectiva do que a cepa CL Brener.
5. Produzimos, purificamos e caracterizamos as vesículas extracelulares (VEs) de interação entre parasito-hospedeiro, por meio de células THP-1 e VERO.
6. Observamos que as VEs derivadas da interação entre TCTs da cepa CL Brener e THP-1 foram capazes de aumentar a invasão celular.

7. REFERÊNCIAS

- HAMEDI Afsaneh, Larisse Botelho, Constança Britto, Stenio Perdigão Fragoso, Adriana Castilhos Souza Umaki, Samuel Goldenberg, Guy Bottu, Didier Salmon, In vitro metacyclogenesis of *Trypanosoma cruzi* induced by starvation correlates with a transient adenylyl cyclase stimulation as well as with a constitutive upregulation of adenylyl cyclase expression, **Molecular and Biochemical Parasitology**, Volume 200, Issues 1–2, 2015, Pages 9-18, ISSN 0166-6851,
- 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.
- 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.
- ANDRADE, L. O., and Andrews, N. W. (2005) The *Trypanosoma cruzi* – host-cell interplay: location, invasion, retention. **Nat. Rev. Microbiol.** 3, 819 – 823.
- 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.
- ARIAS-del-ANGEL, J.A., Santana-Solano, J., Santillán, M. *et al.* Motility patterns of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes correlate with the efficiency of parasite invasion in vitro. **Sci Rep** 10, 15894 (2020)
- BARBOSA, Maria das Graças Vale et al. Chagas disease in the State of Amazonas: history, epidemiological evolution, risks of endemicity and future perspectives. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** Uberaba, v. 48, p. 27-33, June, 2015.
- BARILE, Lucio; VASSALLI, Giuseppe. Exosomes: Therapy delivery tools and biomarkers of diseases. **Pharmacology & Therapeutics**, [s.l.], v. 174, p.63-78, jun. 2017.
- BARR SC, Han W, Andrews NW, Lopez JW, Ball BA, Pannabecker TL, Gilmour RF Jr. A factor from *Trypanosoma cruzi* induces repetitive cytosolic free Ca²⁺ transients in isolated primary canine cardiac myocytes. *Infect Immun.* 1996 May;64(5):1770-7.
- 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., Aguilar-Bonavides, C., Rodrigues, S. P., Cordero, E. M.,

Marques, A. F., Varela-Ramirez, A., Choi, H., Yoshida, N., Da Silveira, J. F., & Almeida, I. C. (2013). Proteomic analysis of trypanosoma cruzi secretome: Characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins. **Journal of Proteome Research**, 12(2), 883–897.

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

BURLEIGH, B. A., and Woolsey, A. M. (2002) Cell signalling and Trypanosoma cruzi invasion. **Cell Microbiol.** 4, 701 – 711. 17.

BURLEIGH BA, Andrews NW. The mechanisms of Trypanosoma cruzi invasion of mammalian cells. **Annu Rev Microbiol.** 49:175–200 1995.

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

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.

CARDOSO MS, Reis-Cunha JL, Bartholomeu DC. Evasion of the Immune Response by Trypanosoma cruzi during Acute Infection. **Front Immunol.** 2016.

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**, p. 594-604, 2011.

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.

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. *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.; 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.

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. **Journal Innate Immun** 9:203-216, 2017.

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.

CONSENSO BRASILEIRO EM DOENÇA DE CHAGAS, 2015 **Epidemiologia**, v.25 n.7 p.86., 2016.

CONTRERAS Victor T., Jussara M. Salles, Neide Thomas, Carlos M. Morel, Samuel Goldenberg, In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions, *Molecular and Biochemical Parasitology*, Volume 16, Issue 3, 1985.

CORTEZ, C., Real, F., Yoshida, N., 2016. Lysosome biogenesis/scattering increases host cell susceptibility to invasion by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms and resistance to tissue culture trypomastigotes. **Cell. Microbiol.** 18, 748–760.

CRONEMBERGER-ANDRADE, A., Xander, P., Soares, R. P., Pessoa, N. L., Campos, M. A., Ellis, C. C., Grajeda, B., Ofir-Birin, Y., Almeida, I. C., Regev-Rudzki, N., & Torrecilhas, A. C. (2020). *Trypanosoma cruzi*-Infected Human Macrophages Shed Proinflammatory Extracellular Vesicles That Enhance Host-Cell Invasion via Toll-Like Receptor 2. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 10(March), 1–15.

Da SILVEIRA, J. F., Abrahamsohn, P. A., & Colli, W. (1979). Plasma membrane vesicles isolated from epimastigote forms of *trypanosoma cruzi*. **BBA - Biomembranes**, 550(2), 222–232.

DE PABLOS, LM; MOREIRA LR; OSUNA A. Extracellular Vesicles in Chagas Disease: A New Passenger for an Old Disease. **Front. Microbiol**, Jun., 2018.

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

DIAS, J.C.P., Ramos, A.N., Gontijo, E.D., Luquetti, A., Shikanai-Yasuda, M.A., Coura, J.R., Torres, R.M., Melo, J.R. da C., Almeida, E.A. de, Oliveira, W. de, Silveira, A.C., Rezende, J.M. de, Pinto, F.S., Ferreira, A.W., Rassi, A., Fragata, A.A., Sousa, A.S. de, Correia, D., Jansen, A.M., Andrade, G.M.Q., Britto, C.F.D.P. de C., Pinto, A.Y. das N., Rassi, A., Campos, D.E., Abad-Franch, F., Santos, S.E., Chiari, E., HasslocherMoreno, A.M., Moreira, E.F., Marques, D.S. de O., Silva, E.L., Marin-Neto, J.A., Galvão, L.M. da C., Xavier, S.S., Valente, S.A. da S., Carvalho, N.B., Cardoso, A.V., Silva, R.A.E., Costa, V.M. da, Vivaldini, S.M., Oliveira, S.M., Valente, V. da C., Lima, M.M., Alves, R.V., 2016. Aspectos Gerais da Epidemiologia da Doença de Chagas com Especial Atenção ao Brasil. **Epidemiol. e Serv. saude Rev. do Sist. Unico Saude do Bras.** 25, 7–86.

DIAS, N; CARVALHO, B; NITZ, N. *et al.*, Congenital Chagas disease: alert of research negligence. **Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine**, 2019.

DVORAK JA, Howe CL 1976. The attraction of *Trypanosoma cruzi* to vertebrate cells *in vitro*. **J Protozool** 23: 534-537.

DVORAK JA, Hyde TP 1973. *Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells *in vitro*. Individual interactions at the cellular and subcellular levels. **Exp Parasitol** 34: 268-283.

EVANS-OSES, I., Reichembach, L. H., & Ramirez, M. I. (2015). Exosomes or microvesicles? Two kinds of extracellular vesicles with different routes to modify protozoan-host cell interaction. **Parasitology Research**, 114(10), 3567–3575.

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.

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.

GONÇALVES, C.S., Ávila, A.R., de Souza, W. *et al.* Revisiting the *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis: morphological and ultrastructural analyses during cell differentiation. **Parasites Vectors** 11, 83., 2018.

GONÇALVES, M. F., Umezawa, E. S., Katzin, A. M., de Souza, W., Alves, M. J. M., Zingales, B., & Colli, W. *Trypanosoma cruzi*: Shedding of surface antigens as membrane vesicles. **Experimental Parasitology**, 72(1), 43–53., 1991.

GONZÁLEZ F. L, Rubio-San-Simón A, González-Tomé MI, Manzanares Á, Epalza C, Santos MdM, et al. Congenital transmission of Chagas disease in a non-endemic area, is an early diagnosis possible. **PLOS ONE** v.14 n.7., 2019.

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.

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.

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

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.

LOVO-MARTINS MI, Malvezi AD, Zanluqui NG, Lucchetti BFC, Tatakihara VLH, Mörking PA, de Oliveira AG, Goldenberg S, Wowk PF, Pinge-Filho P. Extracellular Vesicles Shed By *Trypanosoma cruzi* Potentiate Infection and Elicit Lipid Body Formation and PGE₂ Production in Murine Macrophages. **Front Immunol.** 2018.

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

MARCILI, A; LIMA L; CAVAZANNA M. *et al*, A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. **Parasitology**, v.136 n.6 p.641-55. May., 2009.

MARTINS-MELO, F. R., Ramos, A. N., Alencar, C. H., & Heukelbach, J. (2014). Prevalence of Chagas disease in Brazil: A systematic review and meta-analysis. **Acta Tropica**, 130(1), 167–174.

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

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 Janeiro de 2019 Disponível em <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/doenca-de-chagas>>, último acesso em 15 de maio de 2021

MOREIRA, L. R., Serrano, F. R., & Osuna, A. (2019). Extracellular vesicles of *trypanosoma cruzi* tissue-culture cell-derived trypomastigotes: Induction of physiological changes in non-parasitized culture cells. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 13(2), 1–26.

MORETII NS, Mortara RA, Schenkman S. *Trypanosoma cruzi*. **Trends Parasitol.** Apr;36(4):404-405. doi: 10.1016/j.pt.2019.10.002. Epub 2019 Nov 7. PMID: 31708398. 2020

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.
- NEVES, R. F. C., Fernandes, A. C. S., Meyer-Fernandes, J. R., & Souto-Pradrón, T. (2014). *Trypanosoma cruzi*-secreted vesicles have acid and alkaline phosphatase activities capable of increasing parasite adhesion and infection. *Parasitology Research*, 113(8), 2961–2972.
- 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.
- 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.
- Pan American Health Organization. XVa Reunión de la Comisión Intergubernamental del Cono Sur para la Eliminación de *Triatoma infestans* y la Interrupción de la Transmisión de Tripanosomiasis Transfusional (**INCOSUR-Chagas**), 2006.
- PAHO, Pan American Health Organization. Chagas disease (American Trypanosomiasis). Atualizado em 7 de janeiro de 2019. Disponível em <https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743&lang=en>, último acesso em 15 de maio de 2021.
- 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.
- 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.
- RAMIREZ, M. I. *et al.* Dynamic flux of microvesicles modulate parasite–host cell interaction of *Trypanosoma cruzi* in eukaryotic cells. **Cellular Microbiology**, set., 2016.

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.

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

RESENDE, B.C., Oliveira, A.C.S., Guañabens, A.C.P., Repolês, B.M., Santana, V., Hiraiwa, P.M., Pena, S.D.J., Franco, G.R., Macedo, A.M., Tahara, E.B., Fragoso, S.P., Andrade, L.O., Machado, C.R., 2020. The Influence of Recombinational Processes to Induce Dormancy in *Trypanosoma cruzi*. **Front. Cell. Infect. Microbiol.** 10, 1–13.

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.

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.

RODRÍGUEZ, ME, Rizzi, M, Caeiro, LD, et al. Transmigration of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes through 3D cultures resembling a physiological environment. **Cellular Microbiology**. 2020; 22:e13207.

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.

ROSSI IV, Gavinho B, Ramirez MI. Isolation and Characterization of Extracellular Vesicles Derived from *Trypanosoma cruzi*. *Methods Mol Biol*. 2019;1955:89-104. doi: 10.1007/978-1-4939-9148-8_7. PMID: 30868521.

SANGENITO, L.S.; Branquinha, M.H.; Santos, A.L.S. Funding for Chagas Disease: A 10-Year (2009–2018) Survey. *Trop. Med. Infect. Dis.* 2020, 5, 88.

SANTOS, Fábila Regina dos et al. Systematic neonatal screening for congenital Chagas disease in northeastern Brazil: prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in southern Sergipe. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** Uberaba, vol. 51, n. 3, p. 310-317, 2018.

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**, v.550 p.522-532, 1979.

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.

STERNLIEB, Tamara; Alejandra C. Schoijet, Guillermo D. Alonso, Intracellular cyclic AMP levels modulate differential adaptive responses on epimastigotes and cell culture trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*, *Acta Tropica*, Volume 202, 2020, 105273, ISSN 0001-706X.

TARDIEUX, I. M H Nathanson, N W Andrews; Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic-free Ca²⁺ transients. **J Exp Med** 1 March 1994; 179 (3): 1017–1022.

TARDIEUX, Isabelle; Paul Webster, Jan Ravesloot, Walter Boron, J. Adrian Lunn, John E. Heuser, Norma W. Andrews, Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells, **Cell**, Volume 71, Issue 7, 1992.

TOMAS, A.M.; MILES, M.A.; KELLY, J.M. Overexpression of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, is associated with enhanced metacyclogenesis. **Eur J Biochem**, v. 244, p. 596–603, 1997.

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.

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.

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.

WHO, Chagas Disease (American trypanosomiasis) factsheet n° 340. Atualizado em 17 de abril de 2019. Disponível em [https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Último acesso em 15 de maio de 2021.

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, M.P; RAMIREZ, M.I. 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. **Pathogens and Disease**, v.75, p.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., Favoreto, S., Ferreira, A.T., Manque, P.M., 2000. Signal transduction induced in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes during the invasion of mammalian cells. **Brazilian J. Med. Biol. Res.** 33, 269–278.

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.

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.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. **Acta Tropica**, v.184, p. 38-52, 2018.