

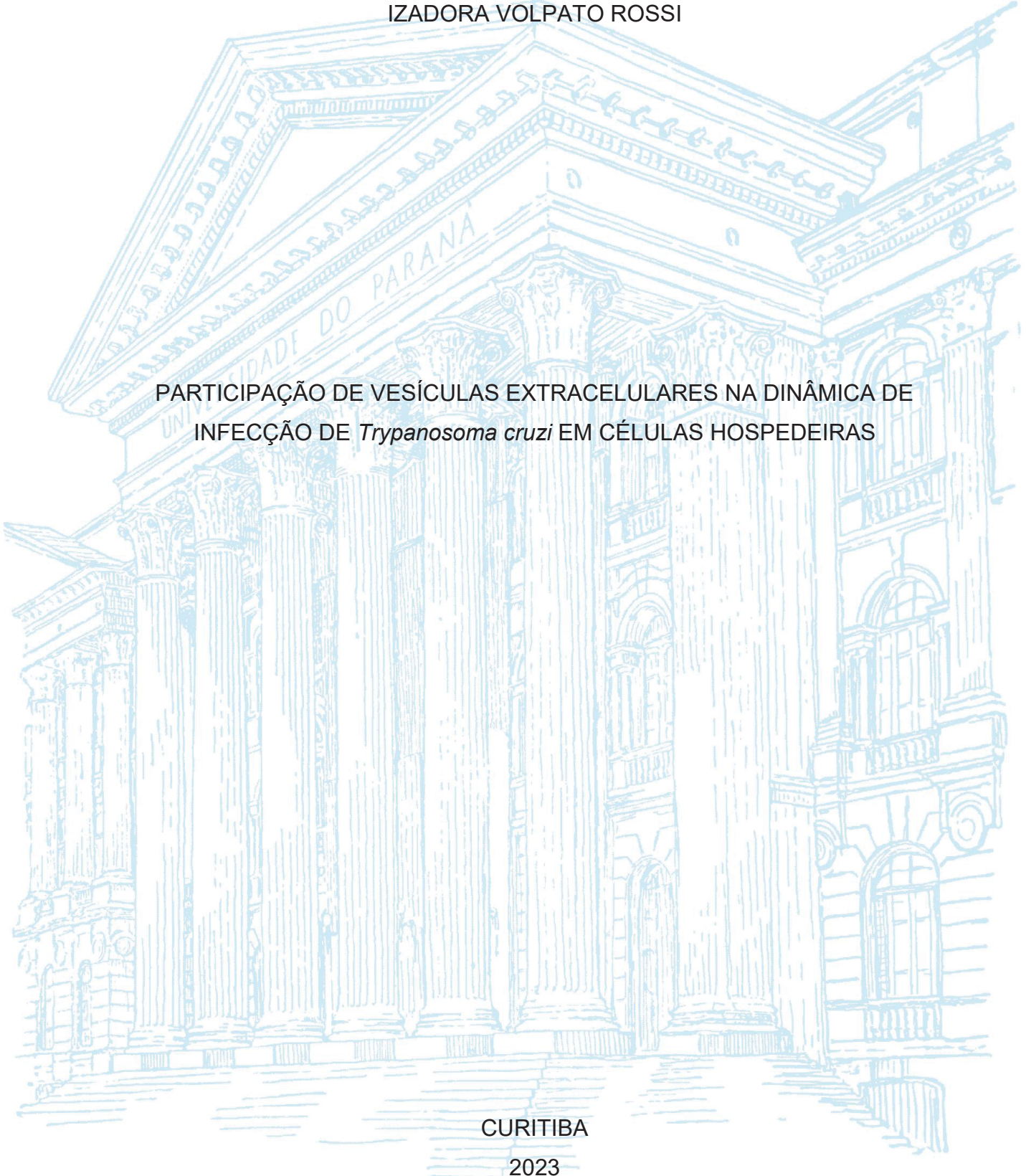
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

IZADORA VOLPATO ROSSI

PARTICIPAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES NA DINÂMICA DE  
INFECÇÃO DE *Trypanosoma cruzi* EM CÉLULAS HOSPEDEIRAS

CURITIBA

2023



IZADORA VOLPATO ROSSI

PARTICIPAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES NA DINÂMICA DE  
INFECÇÃO DE *Trypanosoma cruzi* EM CÉLULAS HOSPEDEIRAS

Tese 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 Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Marcel Ivan Ramirez

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Rossi, Izadora Volpato

Participação de vesículas extracelulares na dinâmica de infecção de *Trypanosoma cruzi* em células hospedeiras / Izadora Volpato Rossi. – Curitiba, 2023.

1 recurso on-line : PDF.

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

Orientador: Prof. Dr. Marcel Ivan Ramirez.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Chagas, Doença de. 3. Vesículas extracelulares. 4. Interações hospedeiro-patógeno. I. Ramirez, Marcel Ivan. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. III. Título.



## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **IZADORA VOLPATO ROSSI** intitulada: **Participação de vesículas extracelulares na dinâmica de infecção de Trypanosoma cruzi em células hospedeiras**, 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 doutora 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, 29 de Junho de 2023.

Assinatura Eletrônica

19/07/2023 08:47:07.0

MARCEL IVAN RAMÍREZ ARAYA  
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

01/08/2023 16:12:13.0

DARIO SIMÕES ZAMBONI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO)

Assinatura Eletrônica

06/07/2023 15:28:22.0

ALVARO ACOSTA SERRANO

Avaliador Externo (UNIVERSITY OF NOTRE DAME)

Assinatura Eletrônica

05/07/2023 12:00:00.0

CAROLINA VERONICA PONCINI

Avaliador Externo (UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES)

Assinatura Eletrônica

04/07/2023 10:30:46.0

MELYSSA FERNANDA NORMAN NEGRI GRASSI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ)

Aos meus pais, meus maiores incentivadores.

## AGRADECIMENTOS

Esta tese marca o encerramento de um ciclo que começou seis anos atrás, quando decidi fazer o mestrado em Curitiba. Escrevi e-mails para alguns professores, mas uma resposta me fez sentir que eu tinha encontrado o laboratório ideal. Desde aquele momento o Prof. Marcel Ramirez mostrou que fazer ciência era mais que escrever trabalhos e fazer experimentos. E até hoje a gente ainda aprende que fazer ciência é aprender algo todo dia, é ser curioso, é procurar soluções e é trabalhar juntos buscando o melhor. Fica aqui minha gratidão por ter confiado em mim e aberto essa porta (ou esse universo, melhor dizendo) que mudou minha forma de ver o mundo.

Nesses anos também tive a sorte de conhecer pessoas no mundo da ciência que tornaram meus dias muito melhores. Bruna Sabatke, minha amiga e meu equilíbrio no trabalho, sócia da entidade Izadora Sabatke que eu me orgulho muito em participar... Trabalhar do seu lado torna tudo mais leve e divertido. Meus amigos de EVAHPI, com quem compartilhamos tantas conversas, tantas reuniões e tantos horários no fluxo: Letícia Bonato, Abel Sana, Maria Alice Ferreira e Bruno Gavinho. Agradeço muito o apoio que sempre fomos uns dos outros.

Durante esses anos também tive a oportunidade de passar por algumas instituições que me receberam de braços abertos e em cada uma delas compartilhei momentos com pessoas que sou grata. Certa de que não poderei agradecer a todos, nomearei alguns grupos com quem tive mais contato e que foram muito importantes na minha trajetória. Gostaria de agradecer ao Dr. Jameel Inal e seus alunos Mahamed A., Sajida e Purva (London Metropolitan University e University of Hertfordshire), que me acolheram enquanto estive na Inglaterra. Agradeço a Professora Gessilda Melo e Dr. Max Jean e seus grupos (muito unidos e gentis) da UEM, com quem começamos uma parceria nos experimentos *in vivo*. A Professora Carolina Poncini (Universidad de Buenos Aires), que me recebeu por algumas semanas para os experimentos com células dendríticas e com quem aprendi muito. Também aos alunos da UBA que foram incríveis comigo: Lucas e Sebas. Ao grupo da Profa. Dra. Sheila Winnischofer (UFPR), em especial a Mallu e Carol, que sempre me ajudaram muito. Agradeço também o apoio dos grupos da Dra. Larissa Alvarenga (UFPR), Dr. Wanderson da Rocha (UFPR), Dr. Silvio Zanata (UFPR), Dr. Glaucio Valdameri (UFPR), Dr. Ciro Ribeiro (UFPR) e aos professores e alunos do

LabTryp (ICC) e LBC (ICC). Não posso me esquecer também da linda amizade que encontrei em um grupo de meninas durante a disciplina de Biologia Celular e que se tornaram amigas que quero levar para a vida toda: Roberta Pozzan, Jordana de Lima, Maria Alice e Bru S. São muitos outros que participaram desses anos, então fica aqui a minha gratidão a todos que de alguma forma me ajudaram e me fizeram ver que juntos somos mais fortes. Desejo sucesso a todos!

Agradeço também a Universidade Federal do Paraná, ao Instituto Carlos Chagas e as instituições de financiamento que fizeram possível essa pesquisa.

Por fim, mas não menos importante, quero agradecer aos meus pais e meu irmão, que sempre me incentivaram a buscar o melhor e me ensinaram que o conhecimento é a única coisa que não pode ser roubada. Obrigada por sempre estarem do meu lado. Também quero agradecer ao meu companheiro, Andre Bernardi, que teve paciência comigo quando nem eu mais tinha. Obrigada pelo seu amor.

*Somos una especie en viaje*  
*No tenemos pertenencias sino equipaje*  
*Vamos con el polen en el viento*  
*Estamos vivos porque estamos en movimiento*  
Jorge Drexler - Movimiento

## RESUMO

O protozoário *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da Doença de Chagas, que inicialmente se restringia às Américas, porém tem se disseminado pelo mundo todo, atingindo milhões de indivíduos. Durante a infecção no hospedeiro, as diferentes formas evolutivas do parasito enfrentam distintos cenários: enquanto as formas metacíclicas são responsáveis pelo primeiro contato com o hospedeiro e devem sobrepassar o ataque do sistema imunológico inato do mamífero, as formas tripomastigotas sanguíneas (ou, experimentalmente, as formas tripomastigotas derivadas de cultivo) são responsáveis pela persistência da infecção e lidam com uma resposta imune adquirida. Para o sucesso da infecção, *T. cruzi* apresenta diferentes mecanismos para evadir ao sistema imune e invadir células do hospedeiro, expressando diferentes moléculas em sua superfície e liberando vesículas extracelulares (VEs). As VEs são pequenas nanopartículas compostas por uma bicamada lipídica, de tamanho, conteúdo e composição de membrana heterogêneos e dinâmicos. Atualmente, as VEs compreendem microvesículas e exossomos, conforme seu tamanho e biogênese. Nosso grupo mostrou que as VEs derivadas da interação entre *T. cruzi* e células hospedeiras tem capacidade de inibir o sistema complemento e aumentam a invasão de formas metacíclicas de *T. cruzi* às células de mamíferos. Visto que as diferentes formas infectivas do parasito enfrentam diferentes cenários durante a infecção e que as VEs representam um importante componente da comunicação celular entre patógenos com o hospedeiro, o presente projeto objetivou caracterizar VEs derivadas da interação de formas tripomastigotas de cultura celular de *T. cruzi* com células hospedeiras, com intuito de avaliar seu papel na modulação da resposta imune e sua influência sobre a dinâmica de infecção e permanência intracelular do parasito. Para isso, foram utilizadas duas cepas com diferentes características genéticas e de virulência (CL Brener e Dm28c), sendo que Dm28c é mais infectiva e possui maior taxa de liberação de TCTs a partir de células infectadas. Nós mostramos também que *T. cruzi* interage diferentemente com células de mioblasto e células de epitélio intestinal, o que poderia simular os ambientes encontrados pelo parasito no hospedeiro. As VEs derivadas da interação de *T. cruzi* com mioblasto e epitélio intestinal se diferem na ação sobre a infecção e na composição. Além disso, vimos que VEs possuem papel modulatório sobre células dendríticas e mostramos resultados iniciais do efeito das VEs sobre a infecção *in vivo*. Assim, estes resultados podem contribuir para a compreensão dos mecanismos de virulência e persistência do parasito, abrindo caminhos para os avanços no entendimento da Doença de Chagas.

Palavras-chave: Doença de Chagas. *Trypanosoma cruzi*. Vesículas extracelulares. Interação patógeno-hospedeiro.

## ABSTRACT

The protozoan *Trypanosoma cruzi* is the etiological agent of Chagas disease, which was initially restricted to the Americas, but has spread throughout the world, reaching millions of individuals. During host infection, the different evolutionary forms of the parasite face different scenarios: while the metacyclic forms are responsible for the first contact with the host and must overcome the attack of the mammal's innate immune system, the blood trypomastigotes (or, experimentally, the culture-derived trypomastigotes) are responsible for the persistence of the infection and deal with an acquired immune response. For successful infection, *T. cruzi* has different mechanisms to evade the immune system and invade host cells, expressing different molecules on its surface and releasing extracellular vesicles (EVs). EVs are small nanoparticles composed of a lipid bilayer, with heterogeneous and dynamic size, content and membrane composition. Currently, EVs comprise microvesicles and exosomes, depending on their size and biogenesis. Our group showed that EVs derived from the interaction between *T. cruzi* and host cells have the capacity to inhibit the complement system and increase the invasion of metacyclic forms of *T. cruzi* to mammalian cells. Since the different infective forms of the parasite face diverse scenarios during infection and that EVs represent an important component of cellular communication between pathogens and the host, the present project aimed to characterize EVs derived from the interaction of tissue-derived trypomastigotes forms of *T. cruzi* with host cells, in order to evaluate its role in modulating the immune response and its influence on the dynamics of infection and intracellular permanence of the parasite. For this, two strains with distinct genetic and virulence characteristics were used (CL Brener and Dm28c), with Dm28c being more infective and having a higher TCTs release rate from infected cells. We also showed that *T. cruzi* interacts differently with myoblast cells and intestinal epithelial cells, which could simulate the environments found by the parasite in the host. EVs derived from the interaction between *T. cruzi* and myoblast or intestinal epithelium differ in their action during infection and composition. Furthermore, we saw that EVs have a modulatory role on dendritic cells and we showed initial results of the effect of EVs on *in vivo* infection. Thus, these results can contribute to the understanding of the mechanisms of virulence and persistence of the parasite, paving the way for advances in the understanding of Chagas disease.

Keywords: Chagas Disease. *Trypanosoma cruzi*. Extracellular vesicles. Host-pathogen interaction.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Ciclo biológico de <i>T. cruzi</i> .....  | 20 |
| Figura 2. As formas infectivas de <i>T. cruzi</i> enfrentam diferentes cenários na infecção .....   | 23 |
| Figura 3. VEs participam da interação parasito-hospedeiro .....   | 28 |
| Figura 4. Fluxograma do desenho experimental desenvolvido durante esta tese....   | 36 |
| Figura 5. Dinâmica de liberação de parasitos a partir de infecções realizadas com formas tripomastigotas metacíclicas (A) e tripomastigotas derivadas de cultura (B) das cepas CL Brener e Dm28c .....                          | 37 |
| Figura 6. Avaliação da sobrevivência de parasitos expostos ao sistema complemento .....   | 38 |
| Figura 7. Caracterização da produção de VEs de diferentes condições .....   | 39 |
| Figura 8. Linhagens celulares utilizadas na estratégia experimental para avaliar interação de <i>T. cruzi</i> com os tecidos de interesse (células Caco-2 - epitélio intestinal humano e C2C12 - mioblasto de camundongo) ..... | 40 |
| Figura 9. Ensaio de invasão de TCTs sobre células Vero, C2C12 e Caco-2 .....  | 41 |
| Figura 10. Dinâmica de liberação de TCTs a partir de células Vero, C2C12 e Caco-2 .....   | 42 |
| Figura 11. Caracterização de VEs derivadas de células C2C12 e Caco-2 em contato com <i>T. cruzi</i> .....   | 44 |
| Figura 12. Ensaio de invasão em células Vero com pré-incubação de VEs .....   | 45 |
| Figura 13. Contagem de TCTs no sobrenadante de células C2C12 infectadas por 2 horas com TCTs CL Brener e depois adicionadas VEs de diferentes condições. ....   | 46 |
| Figura 14. Imagens dos géis corados com Coomassie Blue r-450 nos quais foram corridas as amostras de VEs para serem analisadas por espectrometria de massas.....  | 47 |
| Figura 15. Quantidade e proporção de proteínas identificadas nas VEs de <i>T. cruzi</i> e hospedeiro. ....  | 49 |
| Figura 16. Diagrama de Venn mostrando a sobreposição das proteínas identificadas nas amostras de VEs provenientes das linhagens celulares na ausência de <i>T. cruzi</i> . ....   | 50 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 17. Diagramas de Venn mostrando a sobreposição das proteínas do hospedeiro e de <i>T. cruzi</i> .....  | 51 |
| Figura 18. Diagrama de Venn mostrando a sobreposição das proteínas do hospedeiro (humanas ou de camundongo) identificadas nas VEs vindas de interação (2h).....                 | 51 |
| Figura 19. Diagrama de Venn mostrando a sobreposição de proteínas encontradas em VEs liberadas das células após 24 h de infecção. ....  | 52 |
| Figura 20. Clusterização hierárquica de proteínas de <i>T. cruzi</i> .....  | 54 |
| Figura 21. Clusterização hierárquica de proteínas hospedeiras.....  | 55 |
| Figura 22. Predição da localização subcelular das proteínas identificadas nas VEs de 2h e 24 h.p.i avaliada pela ferramenta Deeploc.....  | 56 |
| Figura 23. Predição da localização subcelular das proteínas identificadas nas VEs de C2C12 e Caco-2 na interação ou não com CL Brener e Dm28c. ....                             | 57 |
| Figura 24. Análise de enriquecimento de GO para processos biológicos em VEs de C2C12.....   | 60 |
| Figura 25. Análise de enriquecimento de GO para processos biológicos nas proteínas encontradas em VEs de Caco-2 .....   | 61 |
| Figura 26. Análise de enriquecimento de GO para processos biológicos nas proteínas encontradas em VEs de 24 h.p.i de C2C12 .....  | 63 |
| Figura 27. Análise de enriquecimento de GO para processos biológicos nas proteínas encontradas em VEs de 24 h.p.i de Caco-2.....  | 64 |
| Figura 28. análise de enriquecimento de go para processos biológicos nas proteínas encontradas em VEs de 24 h.p.i de Caco-2 controle, Caco-2 + CL Brener e Caco-2 + Dm28c. .... | 65 |
| Figura 29. Modulação de CDs por VEs de <i>T. cruzi</i> .....  | 68 |
| Figura 30. Avaliação do efeito das VEs <i>in vivo</i> .....   | 70 |
| Figura 31. Estratégia experimental utilizada nos experimentos <i>in vivo</i> . ....   | 72 |
| Figura 32. Dados de sobrevivência (A) e parasitemia (B) dos animais. ....   | 72 |
| Figura 33. Dados de peso (A), percentual de redução do peso em relação ao máximo (B) e ingestão de ração (C) dos experimentos <i>in vivo</i> .....                              | 74 |
| Figura 34. Média do peso (g) do coração (A), estômago (B) e fígado (C) de cada grupo de animais. ....   | 75 |
| Figura 35. Média do tamanho dos órgãos do trato gastrointestinal.....   | 75 |
| Figura 36. Média do comprimento (A) e largura (B) em cm do cólon dos animais ....   | 76 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 37. Ensaio de resistência das cepas CL Brener e Dm28c ao benzonidazol.  | 77 |
| Figura 38. Imagens de microscopia de células Vero infectadas com CL Brener ou Dm28c na presença de benzonidazol após 48 horas da infecção (coradas com Giemsa) ..... | 78 |
| Figura 39. Liberação de TCTs de CL Brener e Dm28c em células C2C12 e Caco-2 na presença ou ausência de BZ 2 ug/ml por 72 horas.....                                  | 78 |
| Figura 40. Microscopia das células C2C12 (acima) e Caco (abaixo) infectadas por TCTs marcados com CFSE e fixadas após 72 horas e coradas com DAPI.....               | 80 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1. Análise de enriquecimento de GO para processos biológicos nas proteínas encontradas em VEs de 2 hpi (à esquerda, VEs de C2C12 e à direita, Caco-2). Todos os termos mostrados estão super-representados com significância estatística..... | 62 |
| Tabela 2. Intersecção entre as 300 proteínas mais comumente identificadas em VEs de humanos e de camundongo com as proteínas encontradas nas VEs de C2C12 e Caco-2 (com ou sem <i>T. cruzi</i> ).....  | 66 |
| Tabela 3. Média, desvio padrão (SD), N e p-value dos dados de parasitemia dos animais. ....  | 73 |
| Tabela 4. Média, desvio padrão (SD), N e p-value dos dados de peso (g) dos animais. ....   | 74 |

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ATCC - inglês, American Type Culture Collection

C2C12 – Célula de mioblasto de camundongo

Caco-2 - Adenocarcinoma de cólon humano

CFSE - Diacetato carboxifluoresceína succinimidyl éster

DAPI - 4',6'-diamino-2-fenil-indol

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucléico

ESCRT - Complexo de endereçamento endossomal necessário ao transporte

ILV - Vesículas intraluminais

MOI - inglês, Multiplicity of infection

MVB - Corpos multivesiculados

NTA - Rastreamento de nano-partículas

P - Probabilidade de significância

PBS - inglês, Phosphate-buffered saline solution

pH - Potencial Hidrogeniônico

RPMI - inglês, Roswell Park Memorial Institute Medium

SFB - Soro fetal bovino

THP-1 – Célula monocítica humana

Vero - Células de rim de maCaco verde

VEs - Vesículas extracelulares

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\mu\text{g}$  - microgramas

$\mu\text{l}$  - microlitros

$\mu\text{M}$  – micromolar

$\text{Ca}^{2+}$ - Íon de cálcio

M - molar

$\text{mg/ml}$  - miligramas/mililitros

ml – mililitros

mM – milimolar

nm - nanômetro

$^{\circ}\text{C}$  - graus Celsius

xg - unidade de força relativa centrifugacional

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....  | <b>16</b> |
| 1.1 JUSTIFICATIVA .....  | 17        |
| 1.2 OBJETIVOS .....  | 18        |
| 1.2.1 Objetivo geral .....   | 18        |
| 1.2.2 Objetivos específicos.....   | 18        |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....   | <b>19</b> |
| 2.1 <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> E A DOENÇA DE CHAGAS .....  | 19        |
| 2.2 OS PARASITOS ENFRENTAM DIFERENTES CENÁRIOS DURANTE A<br>INFECÇÃO.....  | 21        |
| 2.3 AS ESTRATÉGIAS DE <i>T. CRUZI</i> PARA EVADIR AO SISTEMA IMUNE DO<br>HOSPEDEIRO .....                                  | 23        |
| 2.4 AS VESÍCULAS EXTRACELULARES .....  | 26        |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | <b>30</b> |
| 3.1 CULTIVO CELULAR .....  | 30        |
| 3.2 ENSAIO DE LISE PELO SISTEMA COMPLEMENTO .....  | 30        |
| 3.3 INDUÇÃO DA LIBERAÇÃO DE VES A PARTIR DA INTERAÇÃO ENTRE<br>CÉLULAS MAMÍFERAS E PARASITOS .....                         | 30        |
| 3.4 PURIFICAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES .....   | 31        |
| 3.5 QUANTIFICAÇÃO DAS VES: .....   | 31        |
| 3.5.1 Análise de VEs por Nanosigth.....  | 31        |
| 3.5.2 Dosagem de proteínas .....   | 31        |
| 3.6 ENSAIOS DE INVASÃO.....  | 32        |
| 3.7 ENSAIOS DE DINÂMICA DE LIBERAÇÃO DE TCTS .....   | 32        |
| 3.8 PROTEOMA DE VES.....   | 32        |
| 3.9 ENSAIOS FUNCIONAIS COM AS VES PURIFICADAS .....  | 33        |
| 3.9.1 Efeito das VEs no processo de invasão de parasitos em células hospedeiras:<br>Ensaio de invasão a células Vero ..... | 33        |
| 3.9.2 Efeito de VEs na ativação de células dendríticas.....  | 33        |
| 3.9.3 Ensaios <i>in vivo</i> .....   | 34        |
| 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....   | 35        |
| <b>4 RESULTADOS</b> .....  | <b>36</b> |
| 4.1 PERFIL DE VIRULÊNCIA DE DUAS CEPAS DE <i>T. CRUZI</i> .....  | 36        |
| 4.2 INFECÇÃO DE <i>T. CRUZI</i> SOBRE MIOBLASTOS E CÉLULAS INTESTINAIS ..  | 39        |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES PRODUZIDAS DURANTE A INTERAÇÃO DE <i>T. CRUZI</i> COM MIOBLASTOS OU ENTERÓCITOS ..... | 42        |
| 4.4 CARACTERIZAÇÃO PROTEÔMICA DAS VES PRODUZIDAS POR MIOBLASTOS E CÉLULAS INTESTINAIS EM CONTATO COM <i>T. CRUZI</i> .....            | 46        |
| 4.4.1 PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NAS VES DE C2C12 E CACO-2 EM CONTATO COM <i>T. CRUZI</i> .....  | 48        |
| 4.4.2 LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NAS VES .....  | 55        |
| 4.4.3 ANÁLISE DOS PROCESSOS BIOLÓGICOS RELACIONADOS ÀS PROTEÍNAS ENCONTRADAS NAS VES .....  | 58        |
| 4.4.4 COMPARAÇÃO DAS PROTEÍNAS ENCONTRADAS NAS VES COM OUTROS TRABALHOS .....   | 65        |
| 4.5 MODULAÇÃO DE VES SOBRE O SISTEMA IMUNE .....  | 67        |
| 4.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS VES SOBRE RESISTÊNCIA AO BENZONIDAZOL E DORMÊNCIA .....   | 76        |
| <b>5 DISCUSSÃO .....</b>  | <b>81</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>  | <b>96</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

*Trypanosoma cruzi* é o protozoário causador da Doença de Chagas, parasitose considerada endêmica em 21 países da América Latina, com mais de 6 milhões de infectados (PAHO, 2022). *T. cruzi* possui um ciclo biológico heteroxeno bastante complexo envolvendo insetos vetores da família Reduviidae e hospedeiros mamíferos. Diferentes aspectos tornam o estudo deste patógeno mais complexo: a biologia peculiar do parasito e as transformações que ele sofre com diferentes estágios evolutivos, sua capacidade adaptativa em diferentes ambientes, os perfis distintos das diferentes cepas existentes e a fisiopatologia deste sistema que envolve uma fase aguda rápida (que pode passar inadvertida) e a persistência do patógeno por muitos anos no hospedeiro.

Durante a infecção por *T. cruzi*, o parasito enfrenta diferentes cenários no hospedeiro. As formas metacíclicas participam apenas do primeiro contato com o hospedeiro após serem liberadas nas excretas dos vetores e, uma vez dentro das células do hospedeiro, sofrem a diferenciação a amastigotas, se replicam e dão origem então as formas tripomastigotas sanguíneas. Essas serão as formas responsáveis pela disseminação da infecção no organismo, reinfectando novas células por um longo período. As formas tripomastigotas metacíclicas e sanguíneas diferem entre si na expressão de diferentes moléculas e também no mecanismo de invasão utilizado para ganhar acesso às células do hospedeiro (Caradonna and Burleigh, 2011; Pech-Canul et al., 2017).

Pouco se sabe sobre os fatores que influenciam a persistência do parasito em reservatórios no hospedeiro e de forma silenciosa (com baixa parasitemia), enquanto a patologia é estabelecida e evolui-se para a forma crônica da infecção. Nesse contexto, vesículas extracelulares (VEs) podem estar atuando como comunicadores entre o parasito e células do hospedeiro, mediando o tropismo por diferentes tecidos, facilitando a invasão, interferindo na taxa de replicação do parasito e modulando o sistema imune. Inicialmente, nosso grupo se dedicou a entender o papel das VEs durante os momentos iniciais da infecção no qual a forma metacíclica adentra o hospedeiro. Neste modelo, as VEs são capazes de inibir a lise do parasito pelo sistema complemento e aumentar sua invasão às células hospedeiras, o que acontece nos primeiros momentos da infecção (Cestari et al, 2012). Neste projeto, objetiva-se caracterizar o momento posterior do contato das

formas metacíclicas com o hospedeiro, no trânsito entre a fase aguda e a fase crônica. Analisaremos VEs derivadas da interação das formas tripomastigotas derivadas de tecido de cultura de *T. cruzi* com linhagens celulares de mamíferos, com intuito de avaliar o papel dessas estruturas na modulação do sistema imune e sua influência na dinâmica de invasão e persistência da infecção. Acreditamos que o conhecimento gerado poderá abrir caminho para futuros aportes para melhoria do tratamento, diagnóstico e prevenção desta doença.

## 1.1 JUSTIFICATIVA

As VEs têm ganhado atenção por se mostrarem como uma forma de comunicação celular em diferentes modelos, tanto fisiológicos quanto patológicos. Durante a infecção por *T. cruzi*, as VEs parecem criar um ambiente pró-parasítico, facilitando a infecção, protegendo os parasitos da lise e modulando a resposta imune do hospedeiro. O modelo biológico da Doença de Chagas é bastante complexo em diferentes aspectos: a biologia peculiar do parasito e as transformações que ele sofre com diferentes estágios, sua capacidade adaptativa em diferentes ambientes, os perfis distintos das diferentes cepas existentes e a compreensão da fisiopatologia deste sistema para persistência do patógeno por muitos anos no hospedeiro (Osorio et al, 2012). Inicialmente, nosso grupo se dedicou a entender o papel das VEs durante os momentos iniciais da infecção no qual a forma metacíclica adentra o hospedeiro. Neste modelo, as VEs são capazes de inibir a lise do parasito pelo sistema complemento e aumentar sua invasão às células hospedeiras, o que acontece nos primeiros momentos da infecção (Cestari et al, 2012). Uma vez dentro da célula, o parasito sofre uma série de transformações e evolui em um ciclo intracelular sendo o tripomastigota sanguíneo o responsável pela disseminação da doença e persistência da infecção no hospedeiro, que é liberado das células e reinfecta novas células. Este estágio está diretamente relacionado ao estabelecimento da fase crônica da doença, na qual a infecção pode permanecer de forma assintomática por muito tempo e apresentar manifestações clínicas somente após 20-30 anos da infecção (Perez-Molina e Molina, 2018). Pouco se sabe sobre os fatores que influenciam a persistência do parasito em reservatórios por longos anos de forma silenciosa no hospedeiro, enquanto a patologia é estabelecida. Sendo assim, entender como as VEs secretadas por *T. cruzi* podem participar da virulência

e da interação entre patógeno-hospedeiro pode colaborar para a compreensão deste complexo organismo e assim abrir caminho para melhorias no manejo da Doença de Chagas.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

Caracterizar vesículas extracelulares (VEs) derivadas da interação de formas tripomastigotas de cultura celular de *T. cruzi* com células hospedeiras, com intuito de avaliar seu papel na modulação da resposta imune e sua influência sobre a dinâmica de infecção e permanência intracelular do parasito.

### 1.2.2 Objetivos específicos

1 – Caracterizar o perfil de infectividade das cepas CL Brener e Dm28c de *T. cruzi* sobre mioblasto e células intestinais

2 - Isolar VEs de interação de diferentes cepas (CL Brener e Dm28c) de tripomastigotas metacíclicos ou tripomastigotas derivados de cultura (TCT) de *T. cruzi* e células de mioblasto e intestino.

3 – Separar e caracterizar populações de VEs em duas faixas de tamanho, derivadas de diferentes cepas de *T. cruzi* e células mamíferas.

4 – Realizar a caracterização proteômica das VEs de diferentes cepas em contato com células de mioblasto e células intestinais.

5 - Determinar o efeito das VEs de TCTs no processo de invasão e replicação de *T. cruzi* em células hospedeiras.

6 – Avaliar o papel das VEs na dinâmica de infecção e liberação de TCTs às células hospedeiras

7 - Determinar a ativação e função de células dendríticas e macrófagos em contato com VEs de diferentes cepas de *T. cruzi*

8 – Avaliar o efeito de VEs de interação das células hospedeiras e *T. cruzi* sobre a parasitemia, tropismo celular e estabelecimento da resposta imune em infecção experimental de Doença de Chagas em animais experimentais.

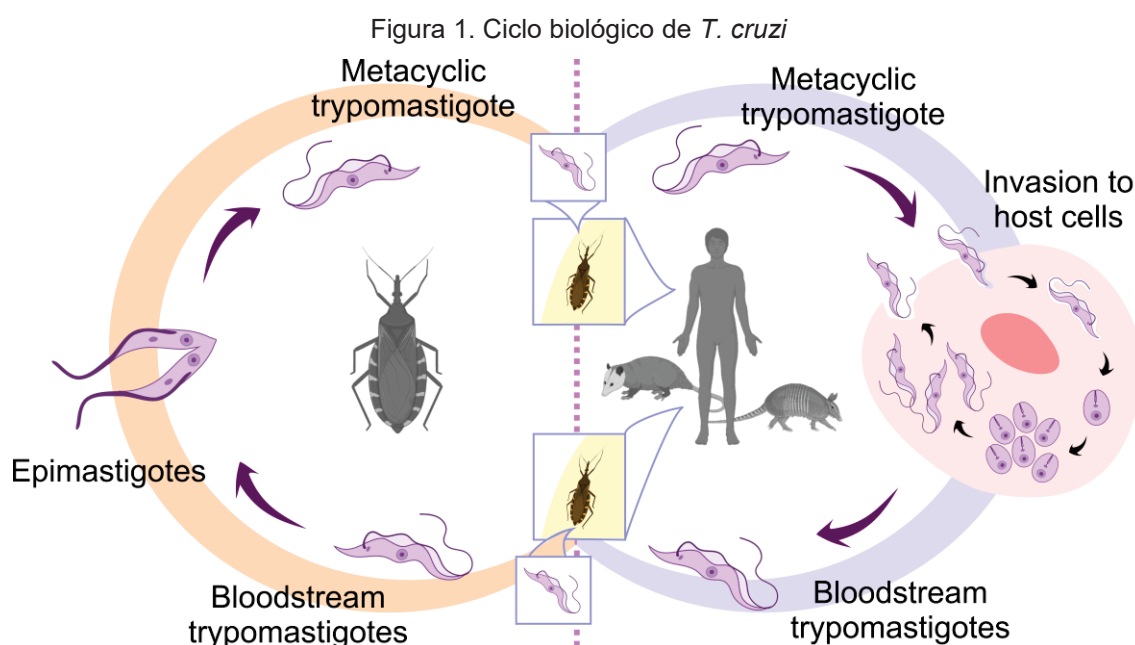
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

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

*Trypanosoma cruzi* é o protozoário causador da Doença de Chagas (DC), parasitose endêmica em 21 países da América Latina, com mais de 6 milhões de infectados, principalmente em regiões pobres e rurais (PAHO, 2022, Ministério da Saúde, 2022). Estima-se que cerca de 70 milhões de pessoas na América Latina vivam em áreas propensas à contaminação pela doença e que 70% dos infectados não saibam que estão doentes (PAHO, 2022). O tratamento para DC é eficaz somente em sua fase inicial, porém, como os sintomas podem ser gerais e indiscerníveis de outras infecções (como febre e mal-estar), grande parte dos pacientes infectados passam pela fase aguda sem diagnóstico e só descobrirão a doença décadas depois. Além da dificuldade de diagnóstico da DC na fase aguda, se soma outras complicações como o aumento de casos letais por infecção oral, a carga permanente sobre os serviços de saúde por ser uma doença crônica e lenta e o fato da disseminação para outras regiões do globo por fluxo migratório (Bern, 2015). Esses fatores colocam a DC como uma pauta importante mesmo após mais de 110 anos da sua descoberta. De fato, a Agenda de Prioridades de Pesquisa elaborada pelo Ministério da Saúde em 2018 inclui como tema de importância o desenvolvimento e avaliação de estratégias para a ampliação da atenção às doenças negligenciadas (Ministério da Saúde, 2018), o que abrange a DC. Tendo em vista estes fatores, justifica-se mais estudos que contribuam para o entendimento desta doença.

Ao longo de seu ciclo biológico heteroxênico, *T. cruzi* apresenta quatro formas evolutivas que alternam entre hospedeiros invertebrados (o inseto-vetor) e hospedeiros vertebrados: amastigota, epimastigota, tripomastigota metacíclico e tripomastigota sanguíneo. Os tripomastigotas metacíclicos são liberados nas fezes ou urina do vetor triatomíneos após o repasto sanguíneo e infectam o hospedeiro mamífero pela membrana mucosa ou pelas regiões de descontinuidade no epitélio (comumente lesão cutânea devido ao prurido intenso no local da picada) (Jr and Rassi, 2012). Uma vez dentro do hospedeiro, o parasito invade rapidamente uma grande variedade de células de mamíferos. Durante a invasão, ocorre a formação de um compartimento endocítico, o vacúolo parasitóforo, no qual o parasito se mantém até haver acidificação do ambiente (pela fusão de lisossomos) e a ativação de

mecanismos parasitários (como a liberação de hemolisina e a proteína Tc-Tox, formadora de poros) que resultam no escape do parasito ao citoplasma (Albertti et al., 2010; Ley et al., 1988). No citoplasma, os tripomastigotas metacíclicos se diferenciam para a forma amastigota, onde se replicam e posteriormente sofrem a diferenciação em tripomastigotas sanguíneos, podendo reinfectar novas células e reiniciar o ciclo a partir de uma nova picada do inseto vetor (Fig. 1). O modo de transmissão natural da doença é vetorial, sendo os principais hospedeiros invertebrados os insetos-vetor hematófagos da família Reduviidae (subfamília Triatominae). Ainda existem outras formas de infecção: oral (ingestão de alimentos contaminados com parasitos provenientes de triatomíneos infectados), vertical (pela passagem de parasitos de mulheres infectadas para seus bebês durante a gravidez ou o parto), transfusão de sangue ou transplante de órgãos de doadores infectados a receptores saudáveis, ou acidental (pelo contato da pele ferida ou de mucosas com material contaminado durante manipulação em laboratório ou na manipulação de caça (Dias et al., 2016).



Fonte: a autora.

O ciclo biológico de *T. cruzi* envolve um vetor triatomíneo (painel esquerdo) e um hospedeiro mamífero (painel direito). Durante seu ciclo, o parasito passa por 4 estágios evolutivos: epimastigotas, tripomastigotas metacíclicas, amastigotas e tripomastigotas sanguíneas.

O curso clínico da DC geralmente compreende uma fase aguda e uma fase crônica. A fase aguda pode ser sintomática ou assintomática (de acordo com o estado imunológico do hospedeiro). Os sinais clínicos da fase aguda, quando aparente (entre 10-30% dos pacientes), são: febre, dores musculares e reação inflamatória no local da picada do inseto (chagoma) (Bonney, 2014; Rassi et al., 2010). A mortalidade na fase aguda pode chegar a até 10% dos indivíduos sintomáticos (Rassi et al., 2010). Outra característica dessa fase, é que devido ao alto grau de multiplicação dos parasitos, a parasitemia chega a ser suficientemente alta que as formas sanguíneas do parasito podem ser facilmente detectadas no sangue através do exame microscópico do mesmo (Bonney, 2014; Dias et al., 2016). A fase aguda se resolve espontaneamente e os pacientes permanecem infectados cronicamente, caso não tratados. Parte dos pacientes não manifestam sinais patológicos por toda a vida (correspondente a forma indeterminada da Doença de Chagas), mas entre 30 a 40% dos infectados podem desenvolver alterações como megacárdio, megaesôfago e megacólon após muitos anos da infecção (Simões et al., 2018).

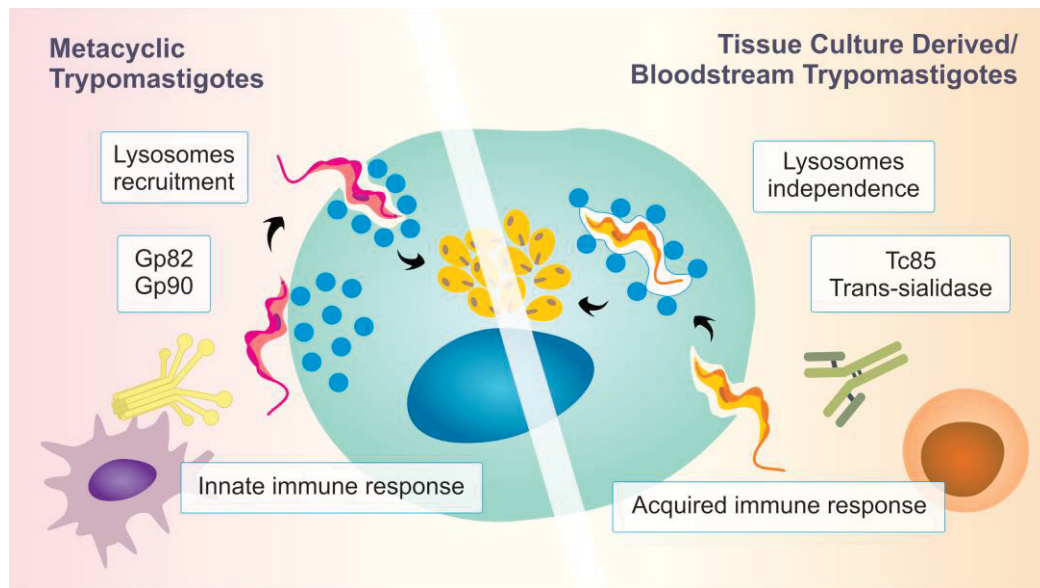
Diferentes grupos têm investigado a variabilidade intraespecífica de *T. cruzi* por diferentes técnicas. Há uma grande diversidade genética e fenotípica de *T. cruzi*, que refletem em sua virulência, infectividade, perfil antigênico, sensibilidade a drogas, resistência ao sistema imune, e tropismo tecidual (Bradwell et al., 2018; Domagalska and Dujardin, 2020; Herreros-Cabello et al., 2019; Kalem et al., 2018; Lewis et al., 2016; Medina et al., 2018; Messenger et al., 2015). Assim, como uma forma de uniformizar a literatura, as diferentes cepas que circulam em hospedeiros vertebrados e/ou vetores foram classificadas entre sete Discrete Typing Units (DTUs), chamadas de TcI a Tc VI e TcBat, baseando-se nos padrões genéticos, bioquímicos ou marcadores biológicos destes parasitos (Zingales, 2017; Zingales et al., 2009). As diferenças existentes entre as cepas continuam a ser estudadas por diversos grupos dentro de suas linhas de pesquisa.

## 2.2 OS PARASITOS ENFRENTAM DIFERENTES CENÁRIOS DURANTE A INFECÇÃO

Durante a infecção por *T. cruzi*, o parasito enfrenta diferentes cenários no hospedeiro. As formas metacíclicas participam de um recorte temporal bastante curto durante a infecção: são as responsáveis pelo primeiro contato com o

hospedeiro e pelas primeiras células infectadas. Uma vez dentro das células, o parasito segue em seu ciclo intracelular, se replicando como amastigotas e dando origem aos tripomastigotas sanguíneos, que serão os responsáveis pela disseminação da infecção no organismo, reinfectando novas células e silenciosamente evoluindo para a forma crônica da infecção. Nos momentos iniciais, as formas metacíclicas precisam resistir ao sistema imune inato do vertebrado e passar pelo momento crucial de invadir células para produzir a infecção, enquanto as formas tripomastigotas sanguíneas são alvo da resposta imune adquirida, que necessitam superar para persistir no hospedeiro. Além disso, o parasito sofre diversas transformações morfológicas, bioquímicas e na expressão de diferentes moléculas (Caradonna and Burleigh, 2011; Pech-Canul et al., 2017). Enquanto as formas metacíclicas empregam principalmente as moléculas gp82, gp90, gp35/50 e mucinas para a infecção, os tripomastigotas sanguíneos (ou tripomastigotas derivados de cultura, possíveis de obter *in vitro* após infecção de células) usam majoritariamente Tc-85, mucinas e trans-sialidases (Yoshida, 2006; Yoshida et al., 2000). Essas características levam a um processo de invasão celular que difere para cada uma das formas infectivas. Enquanto as formas metacíclicas recrutam lisossomos para a superfície da célula imediatamente após o contato com a membrana plasmática e adentram se aproveitando da membrana doado pelo fusão de lisossomos, os tripomastigotas de cultura e sanguíneos invadem em um mecanismo lisossomo-independente, no qual os lisossomos se fusionam diretamente ao vacúolo parasitóforo (Cortez et al., 2016) (Fig. 2).

Figura 2. As formas infectivas de *T. cruzi* enfrentam diferentes cenários na infecção



Fonte: a autora.

Os tripomastigotas metacíclicos são responsáveis pelo primeiro contato com o hospedeiro e devem resistir ao sistema imune inato, os tripomastigotas sanguíneos e tripomastigotas derivados de cultivo são responsáveis pela persistência no hospedeiro e lidam com a resposta imune adquirida. As moléculas empregadas durante a invasão e, consequentemente, o modo de invasão também diferem: metacíclicos usam principalmente as moléculas Gp82, Gp90, Gp35/50 e mucinas e seu contato com a célula mamífera recruta lisossomos para a superfícies, enquanto os tripomastigotas sanguíneos empregam Tc85 e trans-sialidases e não requerem lisossomos periféricos para sua entrada.

### 2.3 AS ESTRATÉGIAS DE *T. CRUZI* PARA EVADIR AO SISTEMA IMUNE DO HOSPEDEIRO

Para superar a resposta imune do hospedeiro e persistir na infecção, *T. cruzi* possui um arsenal de estratégias de evasão, que alternam conforme as formas proliferativas intracelulares e tripomastigotas extracelulares infectantes. Diferentes componentes e glicoproteínas de membrana de *T. cruzi* são críticos para diminuir a imunidade protetora do hospedeiro. A superfície do parasita é coberta por moléculas semelhantes à mucina, denominados de aceptores de ácido siálico, devido a receber resíduos de ácido siálico que são transferidos dos glicoconjugados do hospedeiro pela trans-sialidase do parasita (Schenkman et al, 1992).

Durante os momentos iniciais da infecção, os mecanismos do sistema imune mais relevantes contra os 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 atração de

células de outras células e ativação da resposta imune (Kayama and Takeda, 2010). Além disso, células dendríticas que patrulham os tecidos são ativadas e coordenam a apresentação de antígenos e a montagem de uma resposta contra o patógeno (Cardoso et al., 2016).

O sistema complemento consiste no principal mecanismo de defesa inata humoral dos vertebrados. O sistema complemento de mamíferos consiste em um conjunto de proteínas que são ativadas em cascata na presença de um estímulo, resultando na formação de um poro na membrana de patógenos, provocando sua lise (Lidani et al., 2017). O sistema complemento pode ser ativado por meio de três vias diferentes (Via Clássica, Via das Lectinas e Via Alternativa), que convergem para uma via comum, gerando, por fim, um poro na membrana e a lise do patógeno (Evans-Osses et al., 2013).

Ao contrário do que se tinha como um “paradigma” científico, já foi mostrado que o sistema complemento é capaz de lisar formas tripomastigotas de *T. cruzi* em variados graus de suscetibilidade conforme a cepa (Cestari and Ramirez, 2010). Já foi demonstrado que, embora haja a ativação das três vias do sistema complemento, o processo é parcialmente inibido devido a expressão de proteínas reguladoras do complemento pelo parasito, como calreticulina, o T-DAF (Trypomastigote-Decay Accelerating Factor), o CRP (Complement Regulatory Protein), o CRIT (Complement C2 Receptor Inhibitor Trispanning) e a Gp58/68 (Ramirez-Tolosa e Ferreira, 2010; Lidani et al., 2017).

A fase aguda da DC é caracterizada por forte inibição da resposta imune do hospedeiro pelos fatores de virulência do *T. cruzi*, que são cruciais para criar uma infecção persistente e estabelecer a doença crônica. Nos momentos iniciais da infecção, o hospedeiro passa por um estado de imunossupressão, envolvendo a indução de células dendríticas regulatórias (Overtvelt et al, 1999; Poncini et al, 2008) e anergia e deleção clonal no compartimento de células T. Além das respostas limitadas das células T, ocorre uma extensa expansão policlonal dos linfócitos das células B, porém, grande parte delas secretam anticorpos com baixa afinidade para antígenos do parasito. Assim, o parasito passa pela fase aguda da infecção e se dissemina no organismo, onde irá se manter como formas amastigotas intracelulares (Cardoso, Reis-Cunha e Bartholomeu, 2016).

Nesses momentos posteriores da infecção, no qual *T. cruzi* passará a maior parte do tempo como formas amastigotas em seus hospedeiros e apenas

transientemente como tripomastigotas sanguíneos para reinfestar outras células, as células T CD8+ capazes de reconhecer células infectadas por *T. cruzi* são essenciais para o controle da infecção (Padilla, Bustamante e Tarleton, 2009). Em momentos crônicos da infecção, a capacidade do hospedeiro de controlar a infecção por *T. cruzi* limita a circulação dos parasitos, porém é parcialmente eficaz, pois são incapazes de eliminar completamente a infecção. Dessa maneira, *T. cruzi* tem sucesso em sua infecção, se mantendo por longos anos no hospedeiro de maneira silenciosa.

A virtual ausência de parasitas no coração de indivíduos cronicamente infectados tem estimulado uma discussão sobre a patogênese da Doença de Chagas crônica. Diferentes cepas do parasita têm sido associadas a resultados clínicos distintos de infecção em modelos experimentais. Vários mecanismos distintos foram propostos para explicar as variações clínicas da Doença de Chagas: lise das células pela entrada e saída dos parasitos, dano resultante da exposição a respostas imunes específicas contra o parasita, dano celular devido aos efeitos de respostas imunes não específicas no microambiente local, microvasculopatia levando a isquemia e inflamação, e autoimunidade e comprometimento do sistema nervoso central e autônomo (Lopez, Tanowitz e Garg, 2018). Determinar as contribuições de um ou outro mecanismo é extremamente difícil, já que é aceito que múltiplos mecanismos podem estar operando em conjunto (Bonney e Engman, 2015).

Ainda não se sabe muito bem se a presença do parasito é fundamental para produzir a doença crônica. Por muito tempo se levantou hipóteses de que haveria componentes de autoimunidade (Kaplan et al, 1997; Motran et al, 2000, Cunha-Neto et al, 2006) baseados em auto-anticorpos que reconheceriam o tecido cardíaco e também o sistema nervoso (Avila, 1992; Van Voorphis et al, 1993). Alguns indícios mostram que determinadas cepas podem ter um maior tropismo para o coração e pouco foi visto de cepas que teriam destino ao sistema gastrointestinal. Recentemente os grupos do Dr. Tarleton e do Dr. Kelly colocaram dois conceitos na literatura. O grupo de Tarleton mostrou que uma forma do parasito persistir poderia ser o estado de dormência (Sanchez-Valdez et al, 2018). O grupo de Kelly usando parasitas bioluminescentes mostrou que em um começo a infecção é pantrópica (atinge diversos órgãos), no entanto na fase crônica os parasitas estariam restritos ao trato gastrointestinal (Lewis et al, 2016).

Estes conjuntos de evidências deixam em aberto questões fundamentais na definição da Doença de Chagas, como que fatores determinam o tropismo das cepas por alguns órgãos ou talvez predileção por órgãos imunologicamente privilegiados e como os parasitos persistem no organismo até definir a doença crônica, talvez usando a dormência para persistir no organismo ou outros mecanismos.

## 2.4 AS VESÍCULAS EXTRACELULARES

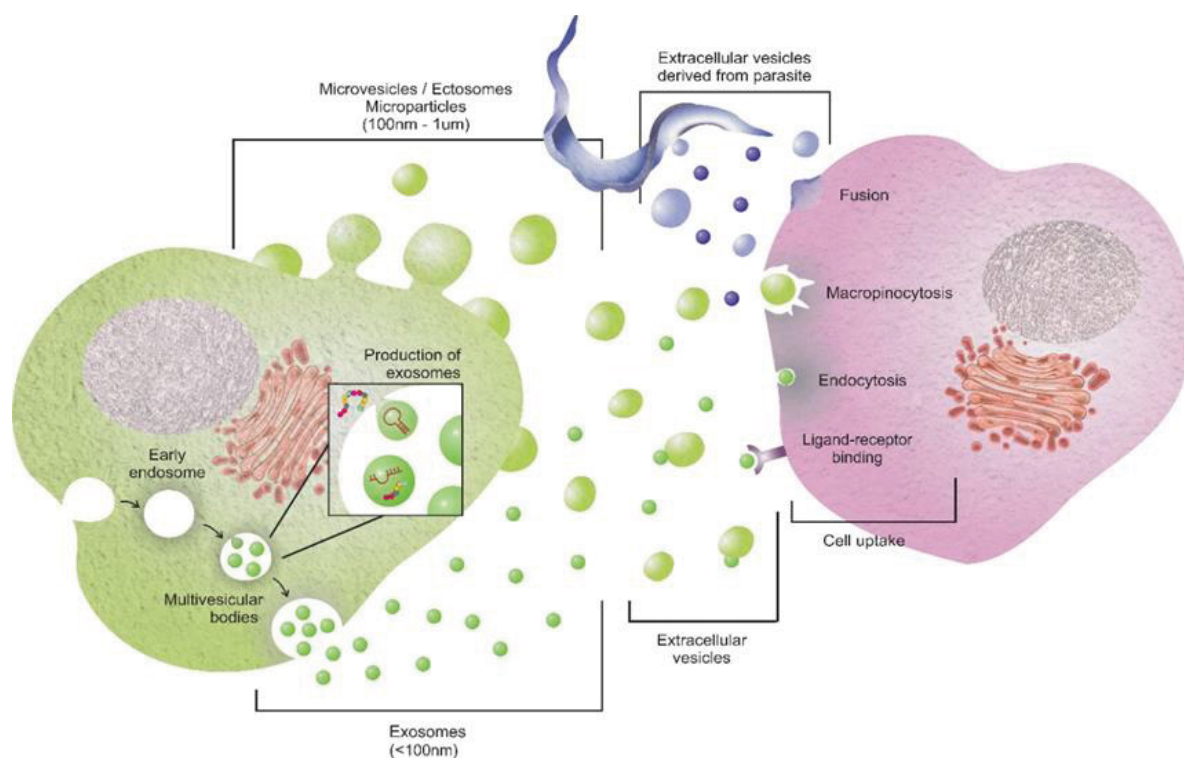
Nas últimas décadas, as vesículas extracelulares (VEs) tem sido descritas como um importante componente dos fenômenos de comunicação celular. VEs compreendem um grupo heterogêneo de nanopartículas envoltas por bicamada lipídica secretado por todos os tipos celulares (Raposo and Stahl, 2019). Antes vistas apenas como “debris” celulares, atualmente essas estruturas compõe linhas de pesquisas em diferentes áreas, dada sua importância em condições fisiológicas e patológicas (Buzas et al, 2023). A designação “vesículas extracelulares” foi sugerida em 2011 como um termo coletivo para partículas que hoje compreendem as microvesículas e os exossomos, que se distinguem por sua biogênese (Gyorgy et al, 2011).

Os exossomos são vesículas intraluminais (ILVs) formadas pelo brotamento interno da membrana endossomal durante a maturação dos endossomos multivesiculares (MVEs) com participação do complexo ESCRT (que envolve um conjunto de mais de 30 proteínas que participam das vias de formação de corpos multivesiculares), sendo secretados após a fusão dos MVEs com a superfície celular. A outra rota básica da biogênese de EV é a partir do brotamento externo da membrana plasmática, que envolve diferentes estímulos que provocam uma mobilização de cálcio intracelular com participação de calpaína, clivagem de actina, ativação de scramblase e inibição de flipases e flopases, desencadeando a formação de microvesículas. Apesar de derivarem de vias distintas, não há marcadores moleculares definitivos e exclusivos de microvesículas ou exossomos. Por essa razão, a Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV – *International Society for Extracellular Vesicles*) sugere o uso de termos operacionais para distinguir os tipos de EV com base em suas propriedades biofísicas ou bioquímicas, como tamanho ou densidade (Théry et al, 2018).

As VEs podem variar amplamente em termos de composição e podem transportar proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e outras biomoléculas. Uma vez liberadas no espaço extracelular, as VEs podem atingir as células receptoras e entregar seu conteúdo para eliciar respostas funcionais e promover alterações fenotípicas, atuando como unidades sinalizadoras. As interações das vesículas extracelulares com as células receptoras podem ter vários efeitos na célula-alvo, por exemplo disparando vias de sinalização, dependendo do modo de interação e do destino intracelular das vesículas no caso de sua captação (French et al, 2017).

A comunicação intercelular mediada por VEs requer ancoragem na membrana plasmática, seguida pela ativação de receptores de superfície e sinalização, internalização de vesículas (endocitose) ou sua fusão com células-alvo. O processo de interação da VE com a superfície celular é complexo e dependem tanto da origem das vesículas extracelulares como do estado e tipo das células receptoras. A ação das VEs sobre células receptoras, sua captação e tráfego intracelular geralmente se dá por alguma destas vias: ligação com receptores de superfícies, fusão de membranas, endocitose, macropinocitose. As VEs podem permanecer ligadas à superfície, desencadeando vias de sinalização intracelular ou podem ser internalizadas, atingindo endossomos multivesiculares (MVEs) e sendo degradadas. Ainda, as VEs podem fundir-se diretamente com a membrana da célula receptora, liberando seu cargo diretamente no citoplasma (Fig. 3) (Mathieu et al, 2019).

Figura 3. VEs participam da interação parasito-hospedeiro



Fonte: Gavinho et al. (2018)

As VEs derivadas de *T. cruzi* começaram a ser exploradas em 1979 (Silveira et al., 1979) e continuam sendo estudadas até o presente. Diversos estudos sugerem que as VEs desempenham um papel importante na dinâmica das células parasitas-hospedeiras e na fisiopatologia da Doença de Chagas. Nos estágios iniciais da infecção, o contato de *T. cruzi* com as células do hospedeiro na corrente sanguínea promove a liberação de VEs capazes de inibir o ataque do sistema complemento (Cestari et al., 2012) e aumentar a infecção de parasitas às células do hospedeiro (Cestari et al., 2017; Garcia-Silva et al., 2014; Moreira et al., 2019). 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 (Torrecilhas et al., 2009). Alguns trabalhos apresentam resultados contraditórios a respeito da cepa-especificidade das VEs: Wyllie e Ramirez (2017) mostraram que os fenômenos de resistência à lise pelo complemento e invasão em células eucariótica são cepa-específico em formas metacíclicas (Wyllie e Ramirez, 2017), enquanto Ribeiro et al (2018) demonstraram que VEs derivadas de TCTs de

uma cepa podem afetar a taxa de infectividade de outra cepa de *T. cruzi* (Ribeiro et al., 2018).

Análises transcriptômicas e proteômicas mostraram que as VEs de *T. cruzi* são enriquecidas em proteínas envolvidas no metabolismo, sinalização, ligação de ácidos nucleicos e sobrevivência do parasito e virulência, sendo o conteúdo de exossomos e microvesículas diferentes (Bayer-Santos et al., 2013; Gaur and Chaturvedi, 2016; Ribeiro et al., 2018; Prescilla-Ledezma et al, 2022). De fato, foi encontrada uma imunorreatividade de soros de pacientes chagásicos com proteínas presentes nas VEs (Bautista-lópez et al., 2017; Cestari et al., 2017). A avaliação do conteúdo de ácidos nucléicos presentes nas VEs de *T. cruzi* mostraram que os RNAs presentes nas VEs das diferentes formas de parasitas são diferentes e que também se diferem dos encontrados em sua célula de origem (Bautista-lópez et al., 2017; Bayer-Santos et al., 2014), indicando um direcionamento específico desses RNAs (Fernandez-Calero et al., 2015). Além disso, destaca-se 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; Nogueira et al., 2015).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 CULTIVO CELULAR

As linhagens celulares Vero (epitelial – macaco), C2C12 (mioblasto – camundongo), Caco-2 (epitélio intestinal – humano) e THP-1 (monócito – humano) foram mantidas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. Formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, cepas CL Brener (DTU TcVI) e Dm28c (DTU TcI) foram mantidas em meio LIT a 28 °C. Formas tripomastigotas metacíclicas foram obtidas de fase estacionária após metaciclogênese induzida em meio TC100 (aproximadamente 8 a 10 dias) e purificadas em coluna de troca iônica DEAE-celulose equilibrada em tampão fosfato, pH 8,0. Formas tripomastigotas derivadas de tecido (TCT) foram obtidas do sobrenadante de células Vero após 4-5 dias da infecção das células com TCTs (mantidas com trocas diárias de meio RPMI 5% SFB). Para iniciar a obtenção de TCTs, foi realizada a infecção com formas metacíclicas, na qual os parasitos foram diferenciados e foi utilizado  $2 \times 10^7$  metacíclicos para infectar células Vero em garrafas de 75 cm<sup>2</sup>. O meio foi substituído todos os dias usando RPMI 5% SFB e os parasitos no sobrenadante foram contados em câmara de Neubauer.

#### 3.2 ENSAIO DE LISE PELO SISTEMA COMPLEMENTO

Parasitos (tripomastigotas metacíclicos e tripomastigotas de cultura) foram lavados com RPMI sem SFB e a cultura ajustada para  $5 \times 10^6$  parasitos/ml. Então, 100 ul de parasitos foram misturados com 100 ul de soro normal humano (SNH) por 30 minutos, resultando em uma concentração de 50% SNH. Os parasitos foram incubados por 30 min a 37°C e então foi adicionado 800 ul de RPMI sem SFB para parar a lise, e então foi realizada a contagem de parasitos sobreviventes e calculado o percentual de parasitos sobreviventes baseando-se nos controles (0% SNH).

#### 3.3 INDUÇÃO DA LIBERAÇÃO DE VES A PARTIR DA INTERAÇÃO ENTRE CÉLULAS MAMÍFERAS E PARASITOS

A indução de vesiculação foi feita incubando-se as células mamíferas (VERO, C2C12, Caco-2 ou THP1) com as formas metacíclicas ou TCTs de *T. cruzi* em uma proporção de 5:1 (parasitos:célula) em meio RPMI na ausência de SFB. Para células aderentes, o plaqueamento foi realizado em placas de 24 ( $1 \times 10^5$  células) ou 6 poços

( $5 \times 10^5$  células) 16-24 horas antes da interação. As amostras foram incubadas a 37 °C por 2 horas, em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub> durante 2 horas. Após este período, foi realizada a purificação das VEs produzidas na interação coletando o sobrenadante e submetendo-o a centrifugação diferencial.

### 3.4 PURIFICAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES

Após o período de incubação entre células e parasitos, a obtenção das vesículas extracelulares foi realizada por centrifugação diferencial do sobrenadante da interação. Primeiramente, as células foram centrifugadas a 500 xg durante 5 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e centrifugado a 4.000 xg durante 30 minutos, para remover debris celulares. A partir do sobrenadante, foi feita a separação de subpopulações de VEs: LEVs foram obtidas por 11.000 xg / 120 min e o sobrenadante foi ultracentrifugado a 100.000 xg durante 90 minutos para isolamento de SEVs. Os pellets contendo as VEs foram ressuspensos em PBS.

### 3.5 QUANTIFICAÇÃO DAS VES:

#### 3.5.1 Análise de VEs por Nanosigth

O tamanho e concentração das VEs foi determinado por análise de rastreamento de nanopartículas (Nanoparticle Tracking Analysis – NTA, modelo LM10 – Malvern UK). O equipamento combina microscopia de espalhamento de luz com uma câmera de carga acoplada (CCD). As partículas são visualizadas pelo espalhamento da luz refletida por elas quando iluminadas por um laser e vídeos da luz espalhada pelas partículas são captados com a câmera CCD. O software NTA é capaz de identificar e rastrear cada nanopartícula que se desloca sob movimento browniano e relacionar o movimento ao tamanho da partícula. Para as leituras foram utilizados os seguintes parâmetros: diluição da amostra: 20 vezes; aquisição de 3 vídeos de 60 segundos cada; screen gain: 1, câmera level: 14, threshold: 5. A partir dos dados foi calculado o tamanho médio das partículas e a concentração de partículas por ml.

#### 3.5.2 Dosagem de proteínas

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

### 3.6 ENSAIOS DE INVASÃO

Células Vero, C2C12 e Caco-2 foram tripsinizadas a partir de cultura semi-confluyente e plaqueadas ( $5.0 \times 10^4$ /poço) sobre lamínulas redondas de 13 mm em placas de 24 poços por 16-24 horas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. As células foram lavadas e adicionado  $2,5 \times 10^5$  TCTs (MOI 5) CL Brener e Dm28c. O ensaio foi incubado por 2 h a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. Então, as células foram lavadas 3 vezes para remover parasitos não internalizados e foi adicionado RPMI 5% SFB. As células foram incubadas por mais 24 horas e então seguiu-se para fixação em paraformaldeído 4% e coloração com Giemsa. Células aderidas na lamínula foram montadas em lâminas com Entellan. A taxa de infecção foi determinada em percentual. O número de parasitas intracelulares foi determinado contando no mínimo 300 células randomicamente. As imagens mostradas foram capturadas em microscópio Leica DMi8 (Plataforma de microscopia – Instituto Carlos Chagas).

### 3.7 ENSAIOS DE DINÂMICA DE LIBERAÇÃO DE TCTS

Células Vero, C2C12 e Caco-2 foram tripsinizadas a partir de cultura semi-confluyente e foram plaqueadas em placas de 24 poços ( $5.0 \times 10^4$ /poço) por 16-24 horas para adesão (37°C e 5% CO<sub>2</sub>). As células foram lavadas e adicionado  $2,5 \times 10^5$  TCTs (MOI 5) CL Brener e Dm28c. O ensaio foi incubado por 2 h a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. Então, as células foram lavadas 3 vezes para remover parasitos não internalizados e foi adicionado RPMI 5% SFB. As células foram incubadas e o sobrenadante foi visualizado diariamente para contagem de TCTs liberados antes da troca de meio.

### 3.8 PROTEOMA DE VES

As VEs foram induzidas em diferentes condições como descrito previamente em uma escala maior de produção. As VEs foram processadas conforme protocolos definidos pela Plataforma de Espectrometria de Massas do Instituto Carlos Chagas. Brevemente, TCTs das cepas CL Brener e Dm28c foram colocados em contato com as linhagens celulares de interesse (C2C12 – mioblasto e Caco-2 – epitélio intestinal) por duas horas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Após a incubação, o sobrenadante da interação foi coletado para isolamento de LEVs (chamadas então de LEVs 2 h – obtidas por centrifugação de 11.000 xg por 2 horas). Como controle foram utilizadas

as células na ausência de contato com TCTs. Também foram analisadas as VEs vindas dos TCTs “isolados” (sem contato com células) por duas horas/37°C. Após a coleta, as células (controle ou que estiveram em contato com os parasitos) receberam meio (5% SFB) e foram incubadas por mais 24 horas. Ao dia seguinte, o meio foi substituído por RPMI sem SFB e repetido o isolamento de VEs por mais 2 horas (chamadas de LEVs 24h). Os sobrenadantes coletados foram submetidos a centrifugação diferencial para isolamento de LEVs. As amostras foram obtidas em duplicatas. Posteriormente os pellets foram ressuspensas em PBS e foi realizada a dosagem de proteínas das VEs por Pierce BCA. 5 ug de proteínas de VEs foram fervidas em sample buffer e aplicado em gel SDS-PAGE (12% precast gel, 10 well comb, corrida em 200 V, 40 mA). Posteriormente os géis foram corados com Coomassie Blue R-450 para visualização das bandas. Os peptídeos foram extraídos do gel ao cortar as lanes de cada amostra e posteriormente digeridas por tripsina e analisados pelo equipamento LTQ Orbitrap XL (Plataforma de Espectrometria de Massas – ICC).

### 3.9 ENSAIOS FUNCIONAIS COM AS VES PURIFICADAS

#### 3.9.1 Efeito das VEs no processo de invasão de parasitos em células hospedeiras:

##### Ensaio de invasão a células Vero

Células Vero ( $5.0 \times 10^4$ ) foram crescidas sobre lâminas de 13 mm em placas de 24 poços. As células foram lavadas e acrescido 10 ug de VEs sobre as células em meio sem SFB por 1 hora. Então, foi adicionado  $2,5 \times 10^5$  TCTs CL Brener em cada condição. O ensaio foi incubado por mais 2 h a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. Então, as células foram lavadas 3 vezes com meio RPMI sem SFB para remover parasitos não internalizados e foi adicionado RPMI 5% SFB. As células foram incubadas por mais 24 horas e então seguiu-se para fixação em paraformaldeído 4% e coradas com Giemsa. Células aderidas na lamínula foram montadas em lâminas com Entellan. A taxa de infecção foi determinada em percentual. O número de parasitas intracelulares foi determinado contando no mínimo 300 células randomicamente e expressados em percentual de invasão.

#### 3.9.2 Efeito de VEs na ativação de células dendríticas

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

diferenciadas como detalhado por Poncini e col. (2008). Brevemente, as células obtidas de medula óssea de fêmur e tíbia de camundongos saudáveis, foram cultivadas por 7 dias em meio IMDM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 20% de meio condicionado com GM-CSF. Foi avaliado o estado de ativação de CDs por citometria de fluxo (MHC II, CD86) e a indução de citocinas pelas vesículas por ELISA.

### 3.9.3 Ensaio *in vivo*

i) Imunização de camundongos com VEs: foram utilizados camundongos Balb/c do Biotério do IMPaM UBA-CONICET da Facultad de Medicina - Universidad de Buenos Aires. Os camundongos foram inoculados com VEs (5 ug) 15 dias antes da infecção, depois 1 ug 3 dias antes infecção por via intradérmica palmar. Então os animais foram infectados com TCTs de CL Brener ou tripomastigotas sanguíneos da cepa RA ( $1 \times 10^3$  tripomastigotas) por via intradérmica palmar. A parasitemia dos animais infectados foi aferida por exame de sangue afresco.

ii) Infecção na presença de VEs: Camundongos Balb/c foram obtidos no biotério da Universidade Estadual de Maringá. Camundongos foram alocados em seis grupos experimentais de sete animais cada ( $n=7$ ): o grupo 1 recebeu a inoculação (via intravenosa) de  $1 \times 10^5$  tripomastigotas derivados de cultura celular (clone CL Brener) em solução salina estéril (PBS); além da infecção, o grupo 2 recebeu 5 ug de VEs provenientes do contato de *T. cruzi* (clone CL Brener) com células de mioblasto (C2C12); o grupo 3 recebeu 5 ug de VEs provenientes do contato de *T. cruzi* (clone CL Brener) com células Caco-2; o grupo 4 recebeu 5 ug de VEs provenientes do contato de *T. cruzi* (cepa Dm28c) com C2C12; o grupo 5 recebeu 5 ug de VEs provenientes do contato de *T. cruzi* (cepa Dm28c) com células de epitélio intestinal (Caco-2); e o grupo 6 foi o controle de ausência de infecção, recebendo somente solução salina estéril, também por via intravenosa. O peso dos animais e ingestão de ração foi avaliada a cada 2 dias. A parasitemia dos animais foi avaliada por coleta de sangue a partir da cauda do animal e visualização de tripomastigotas circulantes conforme Araújo-Jorge e Castro (2000). Após 28 dias de infecção os animais foram anestesiados com vapor de isoflurano para coleta de sangue e posteriormente foram submetidos a eutanásia por aprofundamento com o mesmo anestésico seguida de deslocamento cervical. Foram coletados os seguintes órgãos: coração, músculo esquelético, trato gastrointestinal incluindo esôfago, estômago, intestino delgado e grosso, fígado e pele.

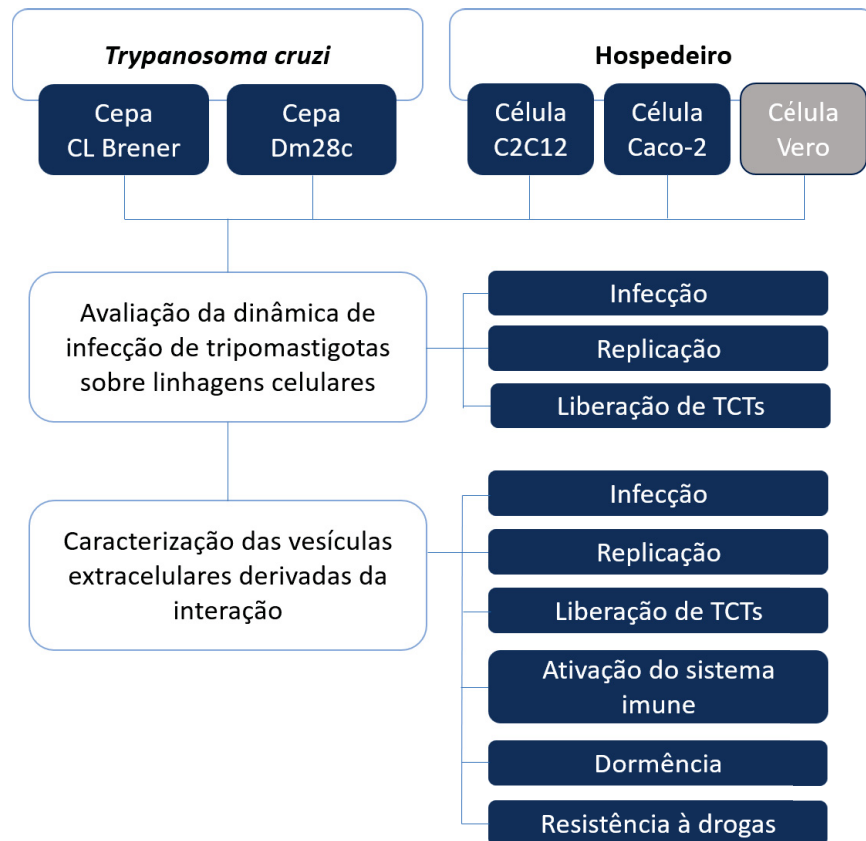
### 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão e submetidos a análise estatística, utilizando o programa GraphPad Prism 4.0. Para avaliar a significância dos resultados, foi aplicada a análise de variância (ANOVA) de duas vias para diferenças estatísticas entre três ou mais médias. Uma vez detectada a diferença significativa, foi aplicado o teste de Tukey. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 5% ( $p > 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS

Os resultados desta tese serão divididos em seções seguindo o fluxograma experimental contido na Fig. 4.

Figura 4. Fluxograma do desenho experimental desenvolvido durante esta tese.

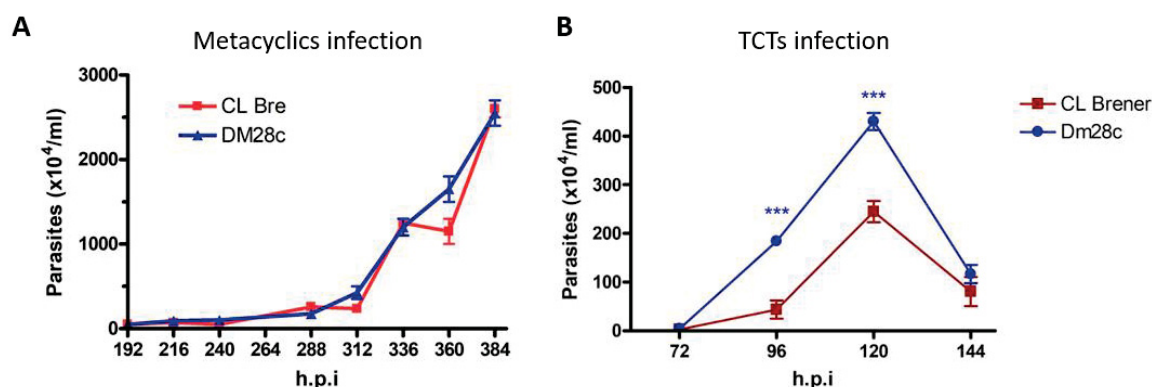


### 4.1 PERFIL DE VIRULÊNCIA DE DUAS CEPAS DE *T. CRUZI*

Nosso grupo de pesquisa por muito tempo se dedicou a entender a interação entre *T. cruzi* e o hospedeiro nos momentos iniciais da infecção nos quais as formas tripomastigotas metacíclicas (METAs) adentram o mamífero e representariam a fase aguda da infecção. Com o objetivo de compreender os mecanismos utilizados pelo parasito para persistir no hospedeiro durante a infecção crônica, nós estabelecemos um modelo de obtenção de formas tripomastigotas derivadas de cultivo celular (TCTs – *tissue culture-derived trypomastigotes*), que representaria a contraparte experimental *in vitro* das formas sanguíneas vistas *in vivo*. Para este estudo, nós escolhemos utilizar duas cepas com características fenotípicas diferentes e pertencentes a dois distintos DTUs: CL Brener (DTU VI) e Dm28c (DTU I). Para isso,

nós padronizamos infecções iniciais utilizando METAs obtidos a partir de formas epimastigotas das duas cepas expostas a condição indutora de metaciclogênese (meio pobre em nutrientes). Nessas condições, não houve diferença entre a diferenciação das duas cepas, com uma taxa superior a 80% de formas metacíclicas em relação ao total após 8 dias de incubação. Após a diferenciação, essas formas metacíclicas ( $2 \times 10^7$  totais) foram utilizadas para infectar células VERO aderidas em garrafas de cultivo, e a liberação de TCTs foi acompanhada pela contagem dos parasitos presente no sobrenadante em câmara de Neubauer. A infecção por METAs gerou a liberação de TCTs de forma contínua e progressiva a partir de 13 d.p.i. (dias pós infecção), com liberação máxima no 16º dia após infecção de aproximadamente  $2,5 \times 10^7$  e  $1,8 \times 10^7$  TCTs totais de CL Brener e Dm28c, respectivamente (Fig. 5 A). Então, os TCTs liberados das células infectadas foram usados para infectar novas células VERO e a liberação de TCTs obteve um padrão bastante distinto em comparação ao originado por METAs (Fig. 5 B). Infecções realizadas com 10 vezes menos parasitos ( $2 \times 10^6$  TCTs) levaram a um pico de liberação de TCTs no sobrenadante entre 4 e 6 d.p.i em quantidades superiores às obtidas nas infecções com METAs. Além disso, foi possível detectar que os parasitos vindos da cepa Dm28c levam a uma maior liberação de TCTs a partir de células infectadas em relação à cepa CL Brener.

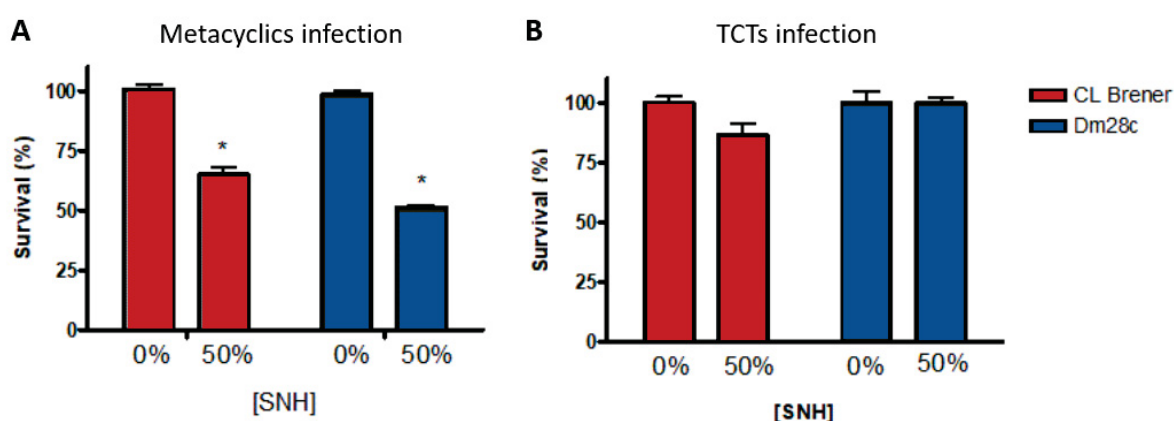
Figura 5. Dinâmica de liberação de parasitos a partir de infecções realizadas com formas tripomastigotas metacíclicas (A) e tripomastigotas derivadas de cultura (B) das cepas CL Brener e Dm28c



Um dos temas investigado em nosso grupo de pesquisa é a resistência de *T. cruzi* ao sistema complemento. Inicialmente avaliamos a taxa de sobrevivência de TCTs frente a exposição com soro normal humano (SNH) em uma concentração de soro próxima à fisiológica do sangue humano (50%) juntamente a análise da lise de

formas metacíclicas. Foi visto que, enquanto os METAs apresentavam sensibilidade a lise mediada pelo SNH (Fig. 6 A), os TCTs se apresentavam resistentes e mantinham-se com alta taxa de sobrevivência (>95%) após 30 minutos de incubação (Fig. 6 B). Esse resultado era previsível visto que essas são as formas circulantes no sangue e resistentes a lise mediada pelo sistema complemento, ao menos na ausência de anticorpos específicos após indução de resposta imune adaptativa. Assim, percebemos que seria difícil avaliar a resistência ao sistema complemento usando soro normal humano, e por isso estes experimentos não foram explorados posteriormente.

Figura 6. Avaliação da sobrevivência de parasitos expostos ao sistema complemento

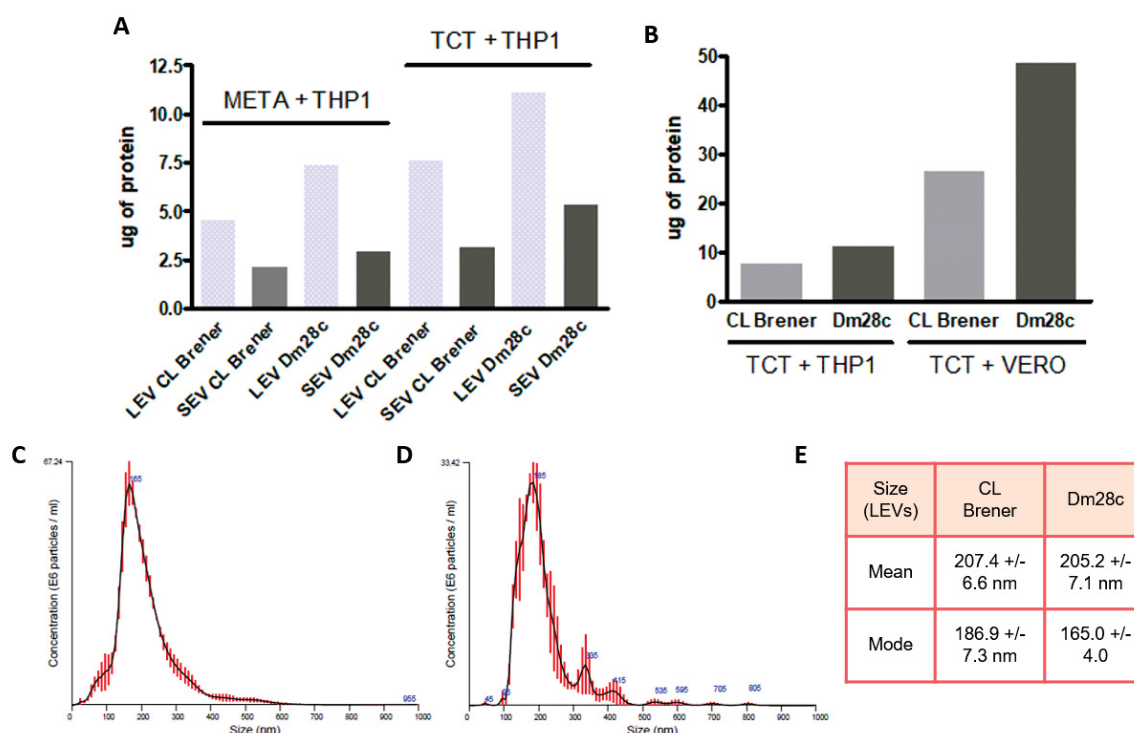


Taxa de sobrevivência de formas metacíclicas (A) e tripomastigotas derivadas de cultura (B) após exposição ao SNH (50% por 30 min).

Um foco da linha de pesquisa do nosso grupo é caracterizar e entender os papéis das vesículas extracelulares (VEs) durante a infecção por *T. cruzi*. Assim, a estratégia experimental utilizada neste trabalho para indução de VEs consiste na interação entre *T. cruzi* e células hospedeiras de mamíferos, simulando uma exposição do hospedeiro ao patógeno. Os resultados prévios do grupo descrevem majoritariamente VEs provenientes da interação de células THP-1 (monócitos) com formas metacíclicas de *T. cruzi*. Dessa forma, com o intuito de entender os diferentes cenários enfrentados pelas formas metacíclicas e tripomastigotas de cultura, começamos também a avaliar a participação de outras linhagens celulares na liberação de VEs. Nossos resultados mostram que, em comparação às formas metacíclicas, os TCTs são capazes de induzir uma maior secreção de VEs, tanto LEVs (Large EVs, majoritariamente microvesículas) quanto SEVs (Small EVs, majoritariamente exossomos) (Fig. 7 A). Em ambas formas infectivas das cepas (CL

Brener e Dm28c), destaca-se que as LEVs constituem aproximadamente 60%-70% da população total de VEs. Também foi visto que TCTs induzem maior liberação de LEVs na interação com células VERO em comparação à células THP-1 (Fig. 7 B). Uma observação interessante é que há uma tendência de maior secreção de VEs por parasitos da cepa Dm28c em comparação à cepa CL Brener, em ambos estágios infectivos e na interação tanto com THP1 quanto com células VERO. Verificou-se por NTA que o método de isolamento de LEVs era capaz de isolar principalmente vesículas maiores que 100 nm, com tamanho médio de  $207.4 \pm 6.6$  nm e  $205.2 \pm 7.1$  nm para VEs de CL Brener e Dm28c respectivamente (Fig. 7 C -E)

Figura 7. Caracterização da produção de VEs de diferentes condições



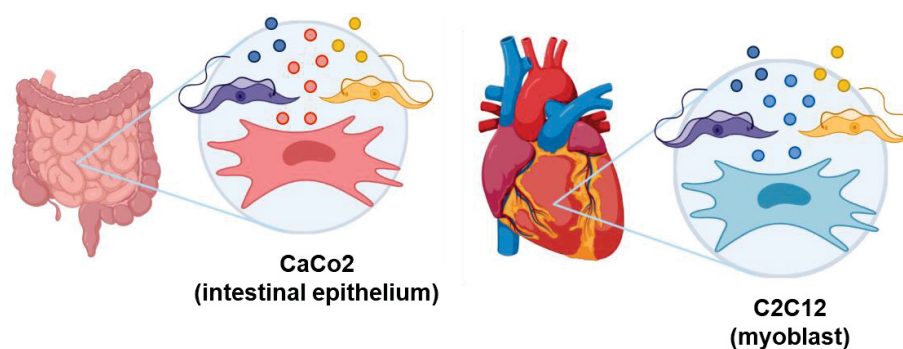
A) Quantificação de proteínas em VEs (LEVs e SEVs) da interação de Metas e TCTs com THP-1. B) Caracterização de proteínas de LEVs durante a interação de TCTs com Vero e THP1. C) Perfil da Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA) de LEVs de CL Brener D) NTA de LEVs de Dm28c. E) Tamanho médio e moda do tamanho das LEVs.

#### 4.2 INFECÇÃO DE *T. CRUZI* SOBRE MIOBLASTOS E CÉLULAS INTESTINAIS

Após ter estabelecido o modelo de obtenção de tripomastigotas derivados de cultivo celular *in vitro* e ter iniciado o estudo das VEs produzidas na interação de TCTS com diversas linhagens celulares. Passamos a investigar uma questão relevante na Doença de Chagas: o tropismo de *T. cruzi* nos tecidos do hospedeiro. Recentemente, o grupo do Dr. John Kelly mostrou através de ensaios *in vivo* usando

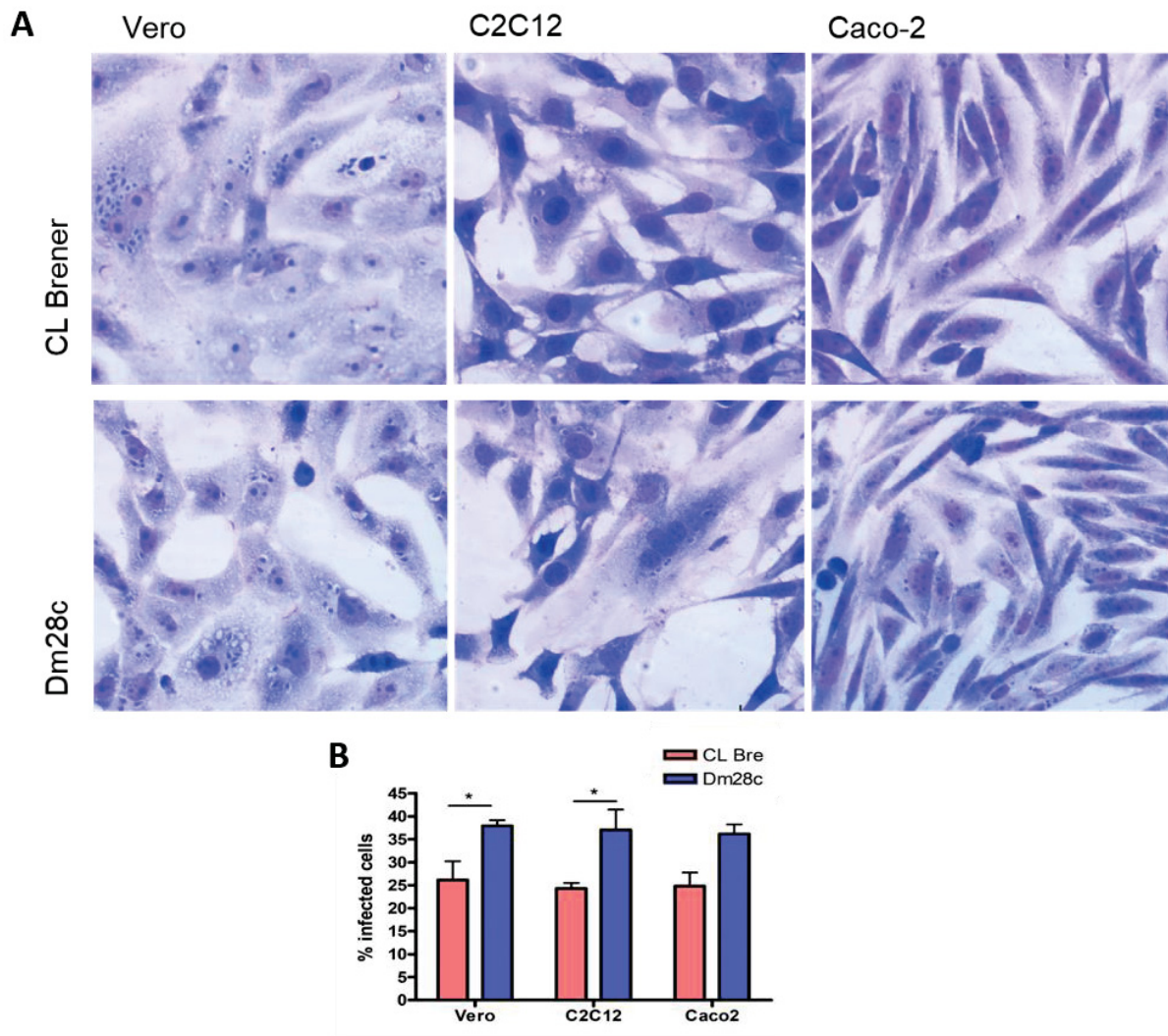
parasitos luminescentes que o trato gastrointestinal representa o principal reservatório de *T. cruzi* na fase crônica da infecção, enquanto surpreendentemente o coração tem baixa carga parasitária (Lewis et al, 2014). Com base nesses achados, decidimos explorar se as VEs poderiam modular a dinâmica de infecção nos diferentes tecidos usando duas linhagens celulares para simular a infecção do parasito no intestino e em músculos. As linhagens escolhidas foram a Caco-2 (epitélio intestinal humano) e a C2C12 (mioblasto de camundongo) e utilizamos células Vero como controle (Fig. 8).

Figura 8. Linhagens celulares utilizadas na estratégia experimental para avaliar interação de *T. cruzi* com os tecidos de interesse (células Caco-2 - epitélio intestinal humano e C2C12 - mioblasto de camundongo)



Decidimos começar com o nosso estudo avaliando infecções nas linhagens celulares por apenas 2 horas utilizando as cepas CL Brener e Dm28c de *T. cruzi*. Após este tempo, os parasitos que não invadiram as células foram removidos e o meio de cultura foi substituído. As células foram incubadas por mais 24 horas e foi realizada a contagem de amastigotas no interior das células após coloração de Giemsa, conforme visto na Figura 9 A. Apesar de nesse período não haver diferença entre a taxa de infecção das três linhagens celulares analisadas (Vero, C2C12 e Caco-2), é possível notar a maior infectividade da cepa Dm28c em todas as linhagens (Figura 9 B).

Figura 9. Ensaio de invasão de TCTs sobre células Vero, C2C12 e Caco-2

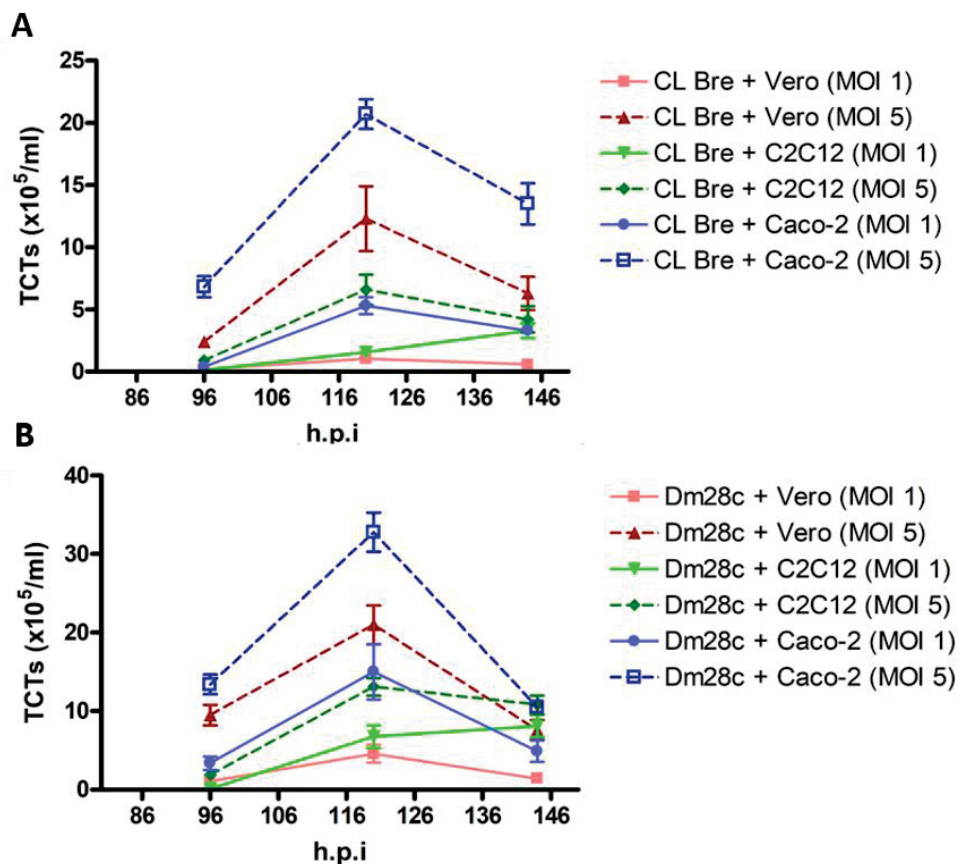


A) Micrografia das células Vero, C2C12 e Caco-2 infectadas por TCTs das cepas CL Brener e Dm28c 24 h.p.i (coloração de Giemsa). É possível visualizar as formas amastigotas como pequenos círculos em coloração azul escuro envoltos por um halo claro. B) Taxas de infecção das três linhagens celulares 24 h.p.i.

Como nosso objetivo é também analisar a dinâmica de infecção do parasito e seu ciclo intracelular desde o momento da entrada até a ruptura da célula culminando na liberação dos TCTs, nós realizamos experimentos de liberação de TCTs a partir das células infectadas. Para poder avaliar e quantificar o processo realizamos infecções comparativas em MOI 1 e 5 sobre as três linhagens celulares e analisamos a liberação dos parasitos contando o sobrenadante das células (Figura 10 A e B). Interessantemente, é possível notar que existe uma maior liberação de parasitos a partir da infecção de células Caco-2, seguida por Vero e em menor quantidade da C2C12, e este padrão se repete tanto para a cepa CL Brener como

Dm28c. Outra informação que o gráfico revela é de que a diferença do número de parasitos na infecção modula também a saída de parasitos, como é visto em que as infecções realizadas em MOI 5 apresentam uma taxa de liberação mais alta em relação ao MOI 1. Nota-se ainda que a liberação de Dm28c é mais alta do que a de CL Brener nas três linhagens celulares, com um pico passando de  $3 \times 10^6$  TCTs/ml na cepa Dm28c enquanto a cepa CL Brener atinge aproximadamente  $2 \times 10^6$  TCTs/ml no pico máximo (120 h.p.i).

Figura 10. Dinâmica de liberação de TCTs a partir de células Vero, C2C12 e Caco-2



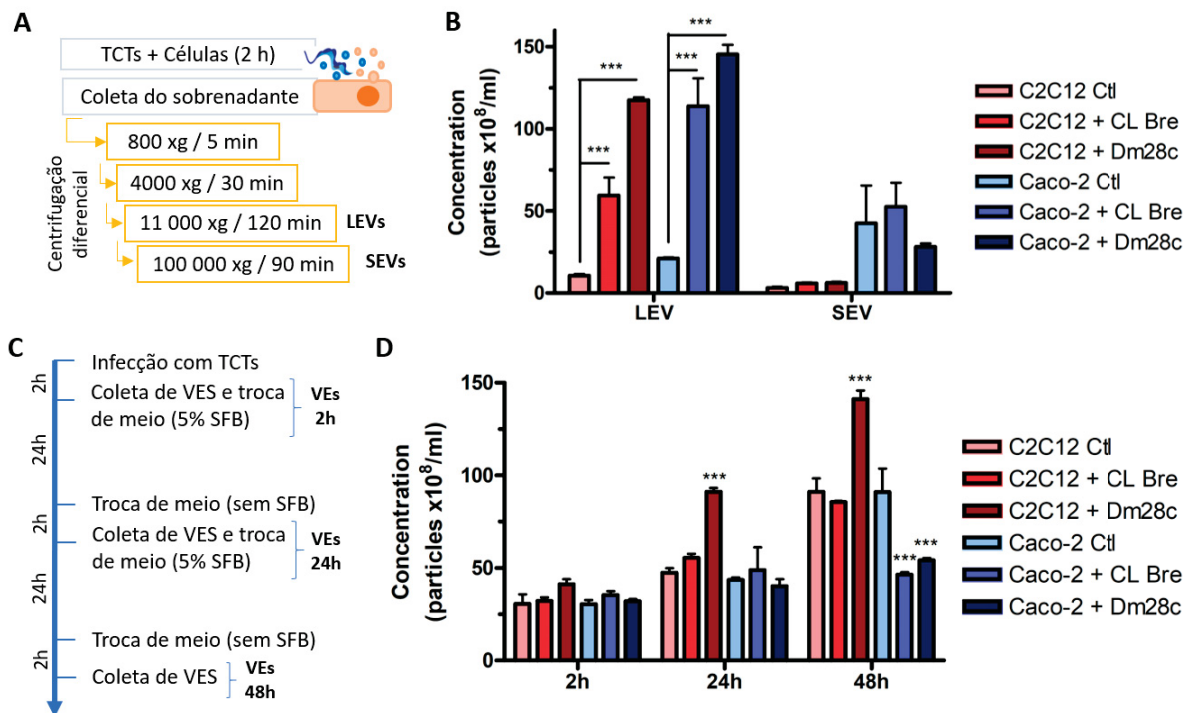
Dinâmica de liberação de TCTs a partir de células infectadas (MOI 1 e 5) por CL Brener (A) e Dm28c (B) nas três linhagens celulares (Vero, C2C12 e Caco-2).

#### 4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES PRODUZIDAS DURANTE A INTERAÇÃO DE *T. CRUZI* COM MIOBLASTOS OU ENTERÓCITOS

Como foi visto uma marcante diferença entre a dinâmica de infecção da linhagem Caco-2 e C2C12, decidimos investigar a liberação de VEs a partir do contato de *T. cruzi* com as linhagens celulares. Para isso, TCTs de ambas as cepas

foram incubados com células em uma relação de 5 parasitos para cada célula por 2 horas (37 °C). O sobrenadante foi coletado e processado para isolamento de LEVs por centrifugação diferencial (LEVs = pellet da centrifugação de 11.000 xg por 2 horas) e o sobrenadante desta centrifugação ainda foi processado para isolamento de SEVs (100.000 xg por 1h30min) (Fig. 11 A). A Figura 11 B mostra os dados de concentração de partículas/ml analisados por NTA. É possível confirmar que a população de LEVs é maior do que de SEVs também na interação de *T. cruzi* com essas linhagens. Verifica-se também que o contato com *T. cruzi* induz uma maior liberação de VEs, como já havia sido mostrado pelo grupo com células THP-1. A fim de avaliar também a liberação de VEs ao longo do tempo, as células C2C12 e Caco-2 foram colocadas em contato com *T. cruzi* por 2 horas para indução de VEs, e depois da coleta do sobrenadante para isolamento de LEVs, receberam RPMI 5% SFB e foram incubadas por mais 24h. O mesmo processo foi repetido (troca do meio por meio sem SFB, incubação por 2 horas a 37°C e coleta de VEs do sobrenadante – VEs 24h). As células então receberam RPMI 5% SFB e foram incubadas por mais 24 horas, e então novamente foi repetido o processo de vesiculação às 48 h.p.i (VEs 48 h) (Fig. 11 C). A figura 11 D mostra a concentração de partículas obtidas nos diferentes momentos da infecção (2 h.p.i, 24 h.p.i, 48 h.p.i). Verifica-se que há uma progressão na secreção de VEs com o tempo, o que poderia ser explicado pela replicação das células após a incubação.

Figura 11. Caracterização de VEs derivadas de células C2C12 e Caco-2 em contato com *T. cruzi*

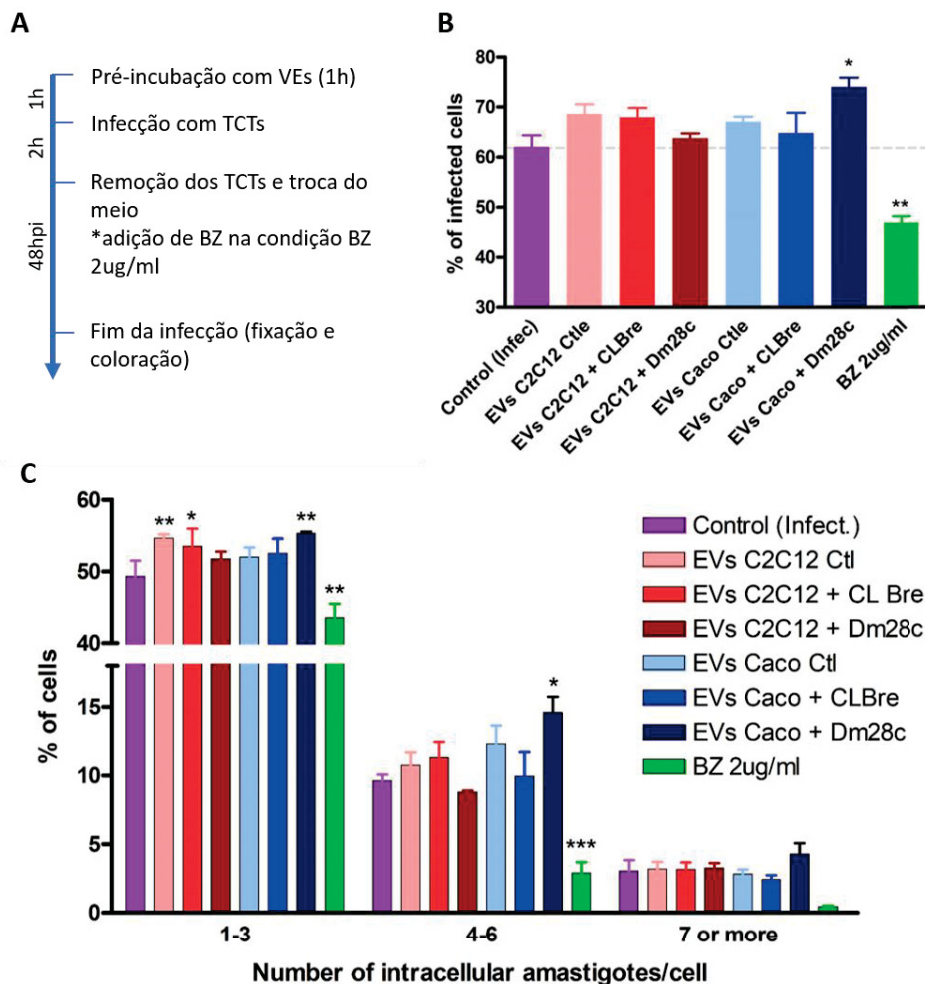


A) Processamento das amostras para isolamento de LEVs e SEVs a partir do sobrenadante da interação. B) Concentração de LEVs e SEVs (em partículas/ml) derivadas do contato de *T. cruzi* (cepas CL Brener e Dm28c) com C2C12 e Caco-2 por 2 horas analisado por NTA. C) Esquema da coleta de VEs de 2h, 24h e 48h após infecção. D) Concentração de LEVs derivadas do contato de *T. cruzi* com C2C12 e Caco-2 por 2, 24 e 48hpi.

Para entender o papel das VEs sobre a infecção de *T. cruzi*, nós realizamos o seguinte experimento: células Vero foram pré-incubadas por 1 hora com 10 ug de VEs vindas de C2C12 e Caco (com e sem contato com *T. cruzi*). Após 1 hora, foram adicionados TCTs da cepa CL Brener (MOI 5) para infecção por 2 horas, totalizando 3 horas de contato da célula com as VEs. Após a infecção, o meio de cultura foi substituído por 5% SFB para remoção dos parasitos não internalizados e a célula foi incubada por mais 24 horas a 37°C, e então fixadas e coradas com Giemsa (Fig. 12 A). Foi realizada a contagem de amastigotas intracelulares e calculada a taxa de infecção (células infectadas/total de células contadas) e a taxa de células com 1-7 amastigotas. Foi adicionada também uma condição de tratamento com benzonidazol (BZ - droga de escolha para tratamento da Doença de Chagas no Brasil). Quando observada a taxa de células infectadas, as VEs vindas do contato de Caco-2 com a cepa Dm28c foram capazes de aumentar em 19% o número de células com pelo menos 1 parasito intracelular, o que não ocorreu com VEs vindas da interação de Dm28c com células C2C12 (Fig. 12 B). Para avaliar se haveria também diferença no

número de amastigotas no interior da célula, as células foram classificadas de acordo com o número de amastigotas. Podemos observar que VEs de C2C12 e C2C12 + CLBRe foram capazes de aumentar o percentual de células com 1-3 amastigotas, porém somente VEs de Caco + Dm28c promoveram aumento tanto em células com 1-3 amastigotas como também de 4-6 (Fig. 12 C), indicando um possível aumento de replicação dos amastigotas nas primeiras 24 horas da infecção ou aumento de células poli-infectadas. Além disso, ressalta-se que o BZ (2ug/ml) foi capaz de reduzir a taxa de infecção e também restringir o número de amastigotas por célula (de 3% de células com 7 ou mais amastigotas para 0,44%).

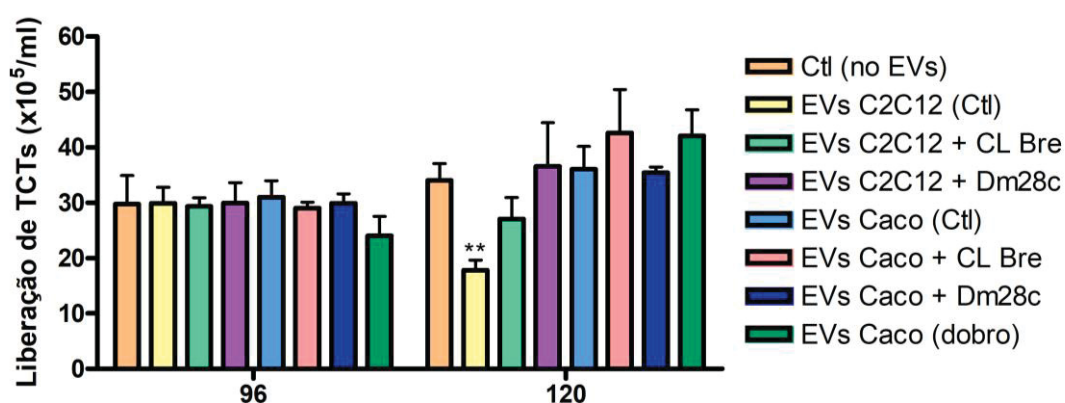
Figura 12. Ensaio de invasão em células Vero com pré-incubação de VEs



A) desenho do experimento de pré-incubação de VEs. B) percentual de infecção de TCTs CL Brener sobre células Vero pré-incubadas com VEs de diferentes origens (10 ug/poço). C) percentual de células contendo amastigotas em seu interior classificados por faixas (1 a 3, 4 a 6 e acima de 7). significância estatística se refere a comparação dos tratamentos com o controle da infecção na ausência de VEs.

Para entender o papel das EVs sobre a dinâmica de infecção de *T. cruzi*, nós decidimos avaliar o efeito de VEs sobre a cepa menos invasiva (CL Brener) sobre a célula menos permissiva (C2C12). Foi realizado o seguinte experimento: células C2C12 foram infectadas por 2 horas em MOI 5 com as cepas CL Brener. Após a incubação, os parasitos remanescentes foram removidos e adicionou-se 5 ug de VEs vindas de diferentes condições. A liberação de TCTs a partir das células infectadas foi acompanhada pela contagem do sobrenadante. Foi observado que a adição de VEs derivadas de C2C12 sem contato com parasitos (C2C12 Ctl) foi capaz de reduzir a liberação de parasitos a partir das células infectadas no 5º d.p.i. (Fig. 13). Estes resultados estão sendo repetidos para confirmação.

Figura 13. Contagem de TCTs no sobrenadante de células C2C12 infectadas por 2 horas com TCTs CL Brener e depois adicionadas VEs de diferentes condições.



#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO PROTEÔMICA DAS VES PRODUZIDAS POR MIOBLASTOS E CÉLULAS INTESTINAIS EM CONTATO COM *T. CRUZI*

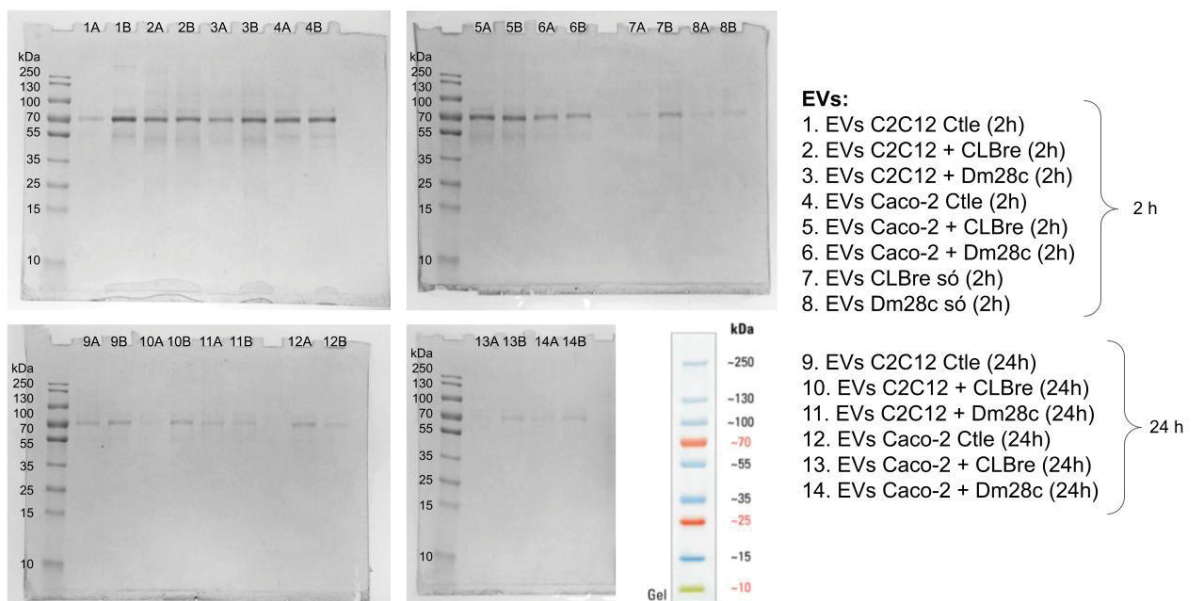
Para caracterização a composição das VEs de interação de *T. cruzi* com as linhagens estudadas, foi realizada uma análise proteômica das VEs por espectrometria de massas na Plataforma de Espectrometria de Massas do Instituto Carlos Chagas – Paraná. Para isso, foi utilizado o seguinte desenho experimental: TCTs das cepas CL Brener e Dm28c foram colocados em contato com as linhagens celulares de interesse (C2C12 – mioblasto e Caco-2 – epitélio intestinal) por duas horas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Após a incubação, o sobrenadante da interação foi coletado para isolamento de LEVs (chamadas então de LEVs 2 h – obtidas por centrifugação de 11.000 xg por 2 horas). Como controle foram utilizadas as células na ausência de contato com TCTs. Também foram analisadas as VEs vindas dos TCTs “isolados” (sem contato com células) por duas horas/37°C. Após a coleta, as células (controle

ou que estiveram em contato com os parasitos) receberam meio (5% SFB) e foram incubadas por mais 24 horas. Ao dia seguinte, o meio foi substituído por RPMI sem SFB e repetido o isolamento de VEs por mais 2 horas (chamadas de LEVs 24h). Os sobrenadantes coletados foram submetidos a centrifugação diferencial para isolamento de LEVs. Posteriormente os pellets foram ressuspendidas em PBS e foi realizada a dosagem de proteínas das EVs por Pierce BCA.

Para analisar a composição das VEs, 5 ug de proteínas de VEs foram fervidas em sample buffer e aplicado em gel SDS-PAGE (12% precast gel, 10 well comb, corrida em 200 V, 40 mA). Posteriormente os géis foram corados com Coomassie Blue R-450 e a descrição das amostras aplicadas encontra-se na figura 14.

As amostras foram obtidas em duplicatas (representadas pelo A e B na figura). É possível identificar algumas bandas que aparecem com frequência nas amostras nos tamanhos de aproximadamente 80, 70 e 55 kDa. Os peptídeos foram extraídos do gel ao cortar as lanes de cada amostra e posteriormente digeridas por tripsina e analisados pelo equipamento LTQ Orbitrap XL (Plataforma de Espectrometria de Massas – ICC).

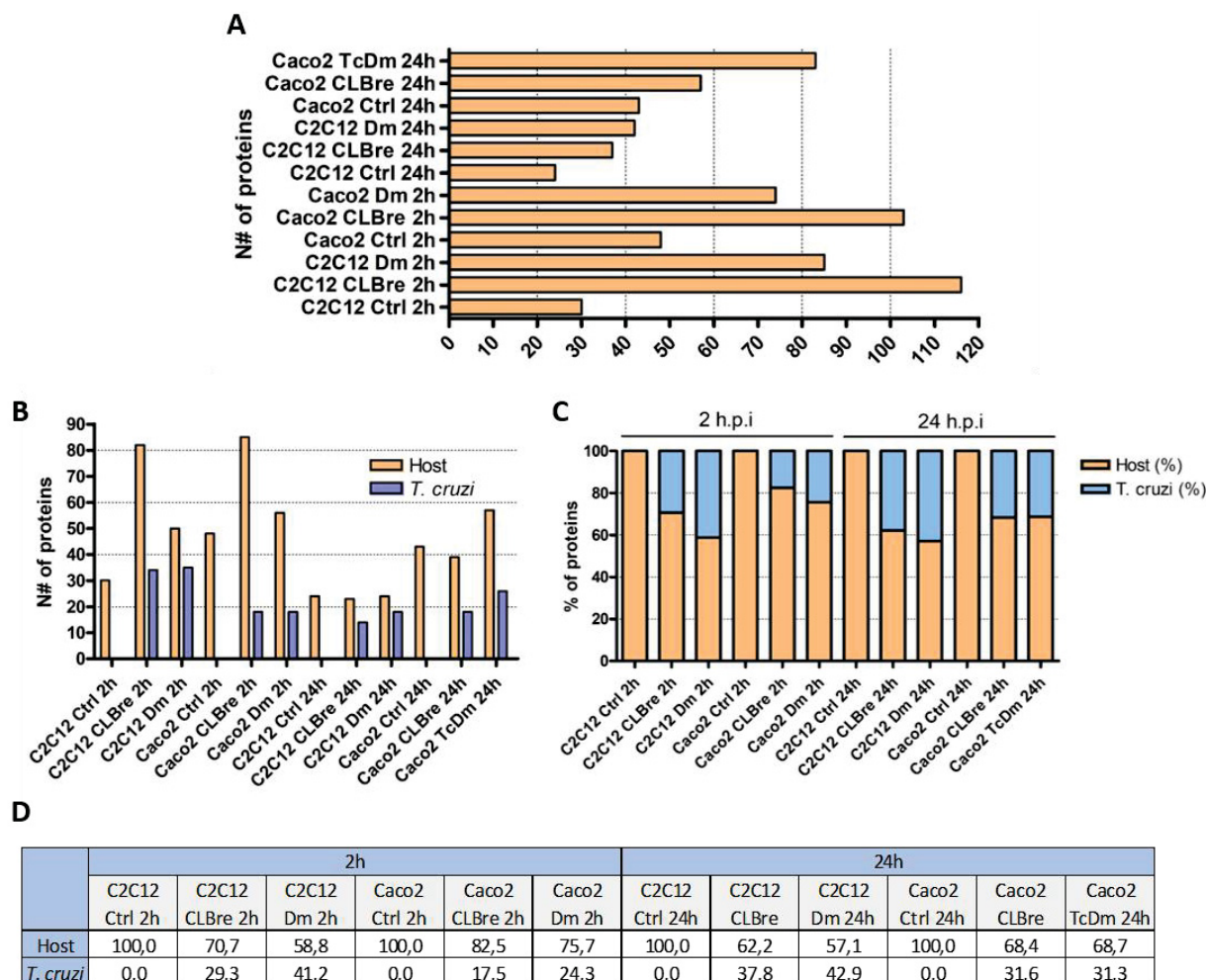
Figura 14. Imagens dos géis corados com Coomassie Blue R-450 nos quais foram corridas as amostras de VEs para serem analisadas por espectrometria de massas.



#### 4.4.1 PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NAS VES DE C2C12 E CACO-2 EM CONTATO COM *T. CRUZI*

Para identificar as proteínas presentes nas amostras foram utilizados os bancos de dados de camundongos (*Mus musculus*) para C2C12, humanos (*Homo sapiens*) para Caco-2, e *T. cruzi* CL Brener e Dm28c para cada cepa analisada. A figura 15 A mostra o número de proteínas identificadas (entre hospedeiro e *T. cruzi*) em cada uma das amostras. É possível identificar que há uma maior variedade de proteínas nas amostras vindas das primeiras duas horas de interação em comparação às de 24 horas após a infecção, com exceção da amostra de VEs de Caco-2 com Dm28. Quando separadas em proteínas de origem do hospedeiro e proteínas do parasito, é possível notar que o contato com o parasito por 2 h induz uma maior secreção de proteínas nas VEs hospedeiras, o que se “estabiliza” nas VEs vindas após 24 h de infecção (Fig. 15 B). Nota-se ainda que a interação com Caco-2 induz VEs contendo maior proporção de proteínas hospedeiras quando comparadas as VEs de C2C12 (Fig. 15 C-D).

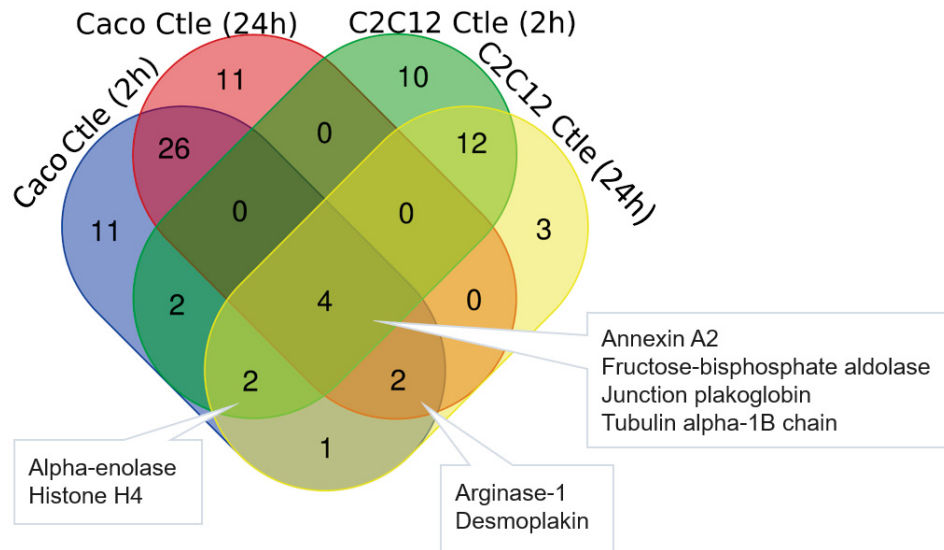
Figura 15. Quantidade e proporção de proteínas identificadas nas VEs de *T. cruzi* e hospedeiro.



A) Número total de proteínas identificados nas amostras de VEs. Relação do número absoluto (B) e proporção de proteínas de *T. cruzi* e do hospedeiro nas VEs de 2h e 24h em gráfico de barras (C) e tabela (D).

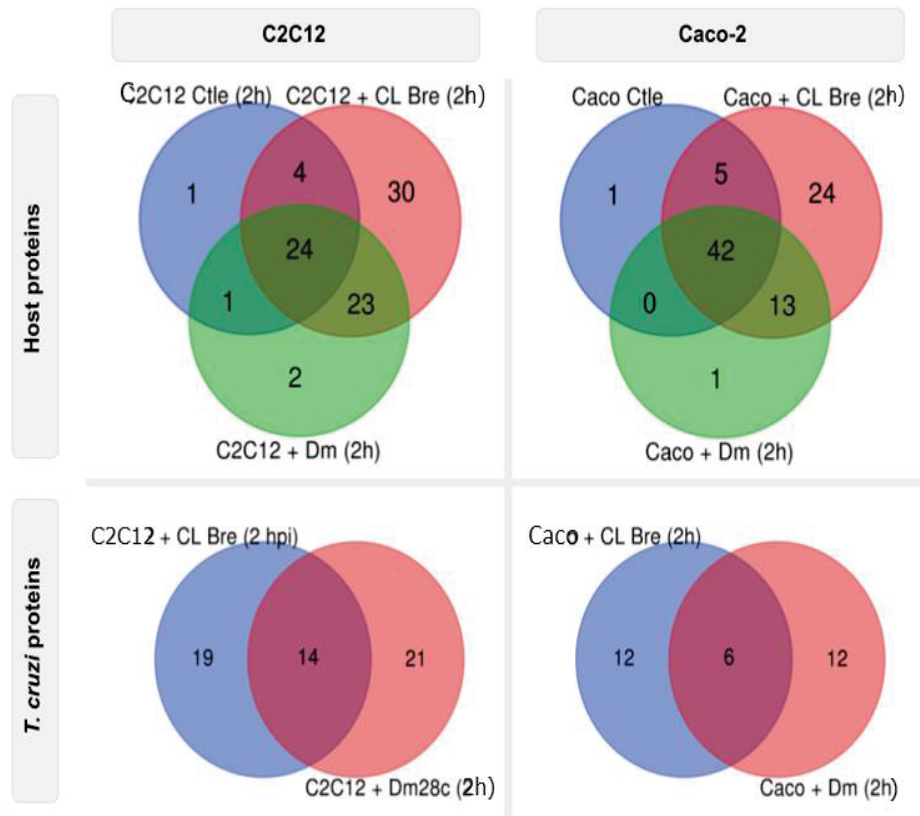
Inicialmente, analisamos as proteínas identificadas nas VEs em termos de variedade (mas não de abundância). A figura 16 mostra que, entre as VEs controles (células sem contato com parasitos), 4 proteínas são comuns a todas (anexina A2, frutose-bifosfato alfolase, placoglobina e tubulina alfa 1-B). Também se identifica que alfa-enolase, histona H4, arginase-1 e desmoplaquina estão presentes em pelo menos 3 dos 4 grupos de VEs controle analisados. Nota-se que esta sobreposição é muito maior entre as amostras controle de cada linhagem celular (32 proteínas comuns em Caco-2 e 18 em C2C12).

Figura 16. Diagrama de Venn mostrando a sobreposição das proteínas identificadas nas amostras de VEs provenientes das linhagens celulares na ausência de *T. cruzi*.



A seguinte análise foi comparar as proteínas identificadas nas VEs obtidas durante as primeiras duas horas de interação. Analisando separadamente as amostras de C2C12 (Figura 17 C, à esquerda) e Caco-2 (à direita), é possível identificar que, das 85 proteínas do hospedeiro presentes nas amostras, 24 encontram-se nas 3 condições. Esta intersecção é maior nas amostras de VEs de Caco-2 (42 proteínas comuns de 86 totais). Observando as proteínas de *T. cruzi*, 14 das 54 proteínas de *T. cruzi* identificadas durante interação com C2C12 são compartilhadas (25,9%), enquanto em Caco-2 são 6 proteínas de 30 totais (30%)

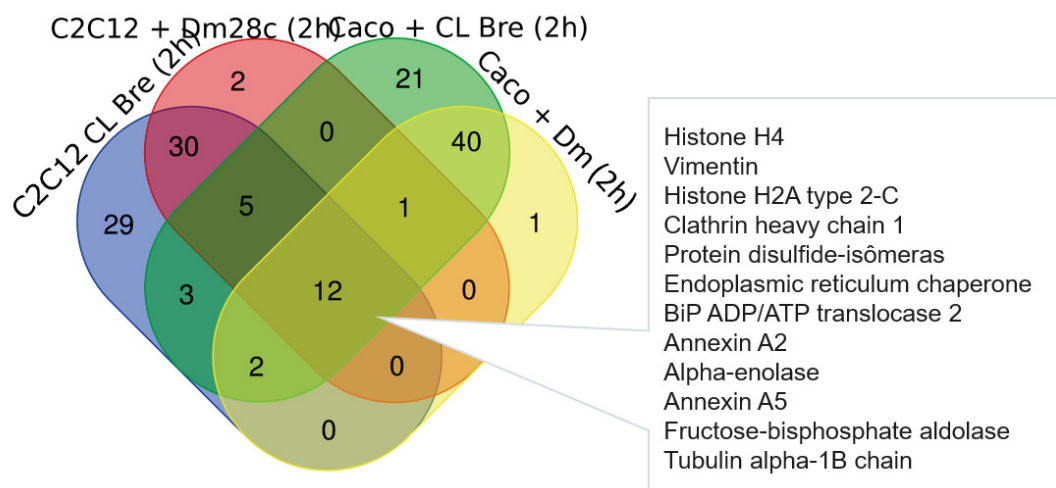
Figura 17. Diagramas de Venn mostrando a sobreposição das proteínas do hospedeiro e de *T. cruzi*



Diagramas de Venn mostrando a sobreposição das proteínas do hospedeiro (parte superior do gráfico) e de *T. cruzi* (inferior) nas amostras de VEs. À esquerda estão as amostras de VEs vindas da interação com C2C12 e à direita de Caco-2.

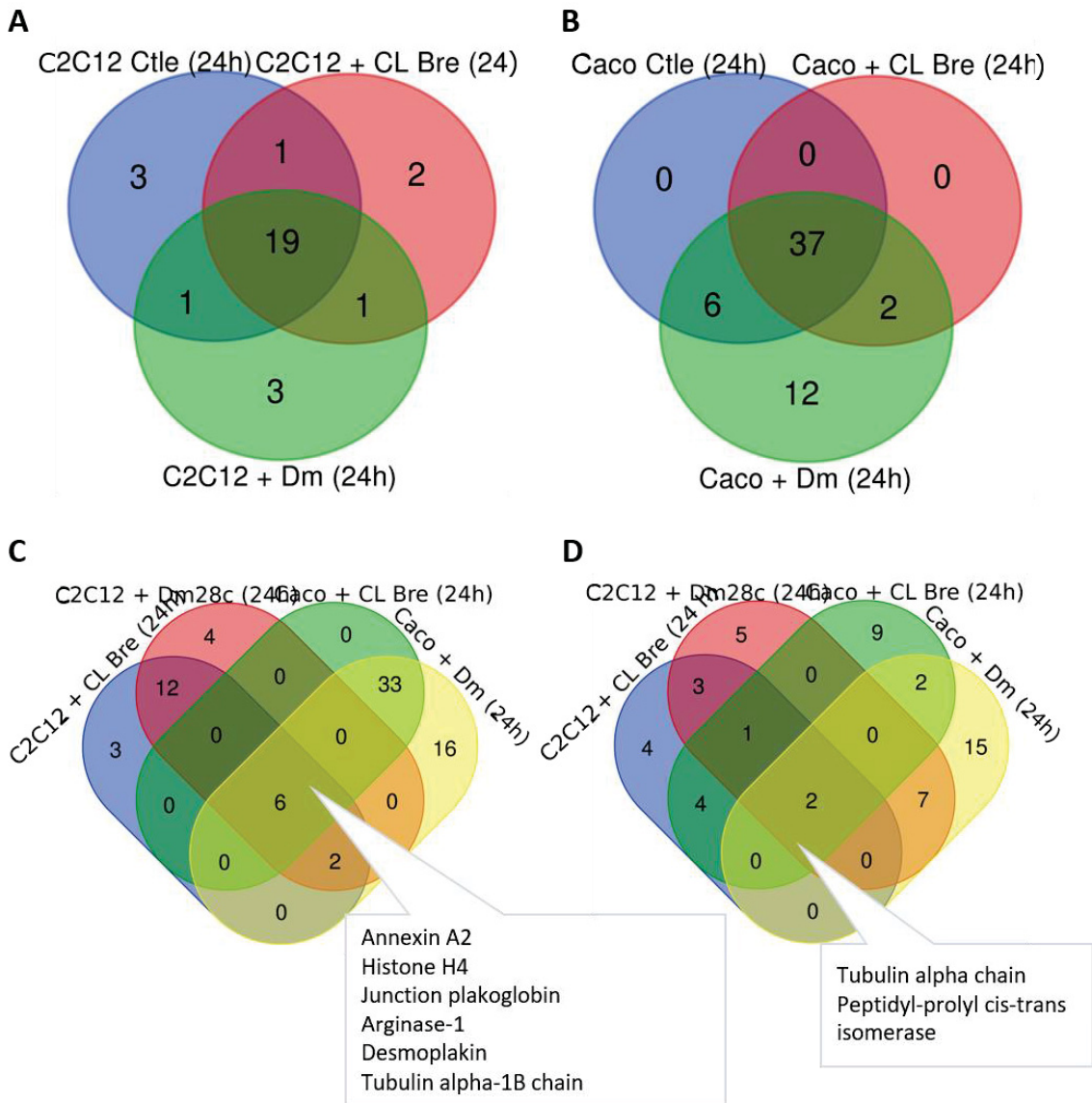
Analisando-se somente as amostras vindas de interação (hospedeiro + TC por 2h), encontram-se 12 proteínas do hospedeiro compartilhadas em todas, listadas na figura 18.

Figura 18. Diagrama de Venn mostrando a sobreposição das proteínas do hospedeiro (humanas ou de camundongo) identificadas nas VEs vindas de interação (2h)



Quando analisadas as VEs liberadas 24 horas após o contato inicial com parasitos, vemos uma grande sobreposição de proteínas do hospedeiro tanto nas VEs de C2C12 (19/30, 63,3%) como de Caco-2 (37/57, 64,9%) (Fig. 19 A e B). Quando comparadas as 4 amostras vindas da interação com *T. cruzi* (24 hpi), são apenas 6 proteínas do hospedeiro compartilhadas, e 2 proteínas parasitárias (Fig. 19 C e D).

Figura 19. Diagrama de Venn mostrando a sobreposição de proteínas encontradas em VEs liberadas das células após 24 h de infecção.



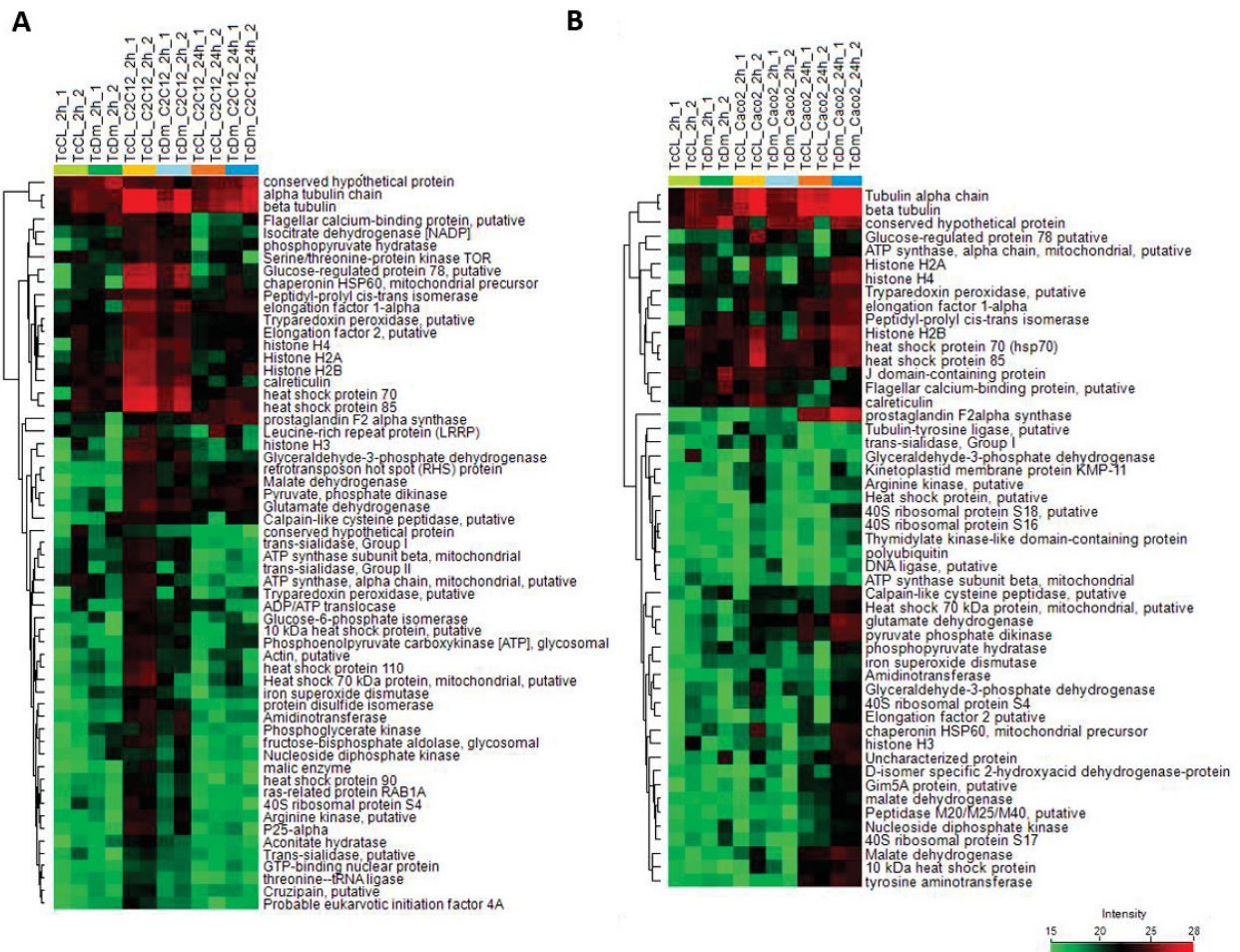
A) VEs de C2C12. B) VEs de Caco-2. C) comparação das proteínas hospedeiras nas 4 amostras vindas de interação (24h). D) comparação das proteínas parasitárias nas 4 amostras vindas de interação (24h).

Para entender quais eram as proteínas mais representadas nas amostras, realizamos uma análise de clusterização das proteínas de *T. cruzi* e das células hospedeiras com base na intensidade dos peptídeos de cada proteínas nas amostras de VEs (Fig. 20 e 21). Esta análise permite avaliar quais proteínas aparecem com perfil semelhante de intensidade entre as amostras. As análises foram feitas na plataforma Perseus (Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P. *et al.*, 2016). Os valores de intensidade (XICs) das proteínas foram transformados para log2 e em seguida foi feita a substituição dos valores faltantes pelos valores de distribuição normal do conjunto de dados. Após, foi realizada a clusterização hierárquica das intensidades das proteínas usando a distância Euclidiana na clusterização e demais parâmetros *default*.

Para proteínas de *T. cruzi* (Fig. 20), é possível ver que tubulina é uma proteína consistentemente identificada nas amostras analisadas. Proteínas como tryparedoxin peroxidase, fator de alongação 1-alfa e 2, histonas H4, H2A e H2B, calreticulina e heat shock protein 70 e 85 aparecem aumentadas nas VEs de C2C12 com *T. cruzi* nas primeiras 2 horas de contato, porém reduzem após 24 horas. Para amostras de Caco-2, as proteínas heat shock protein 70 e 85 aparecem com um perfil constante em todas as amostras.

Figura 20. Clusterização hierárquica de proteínas de *T. cruzi*

***T. cruzi* proteins**

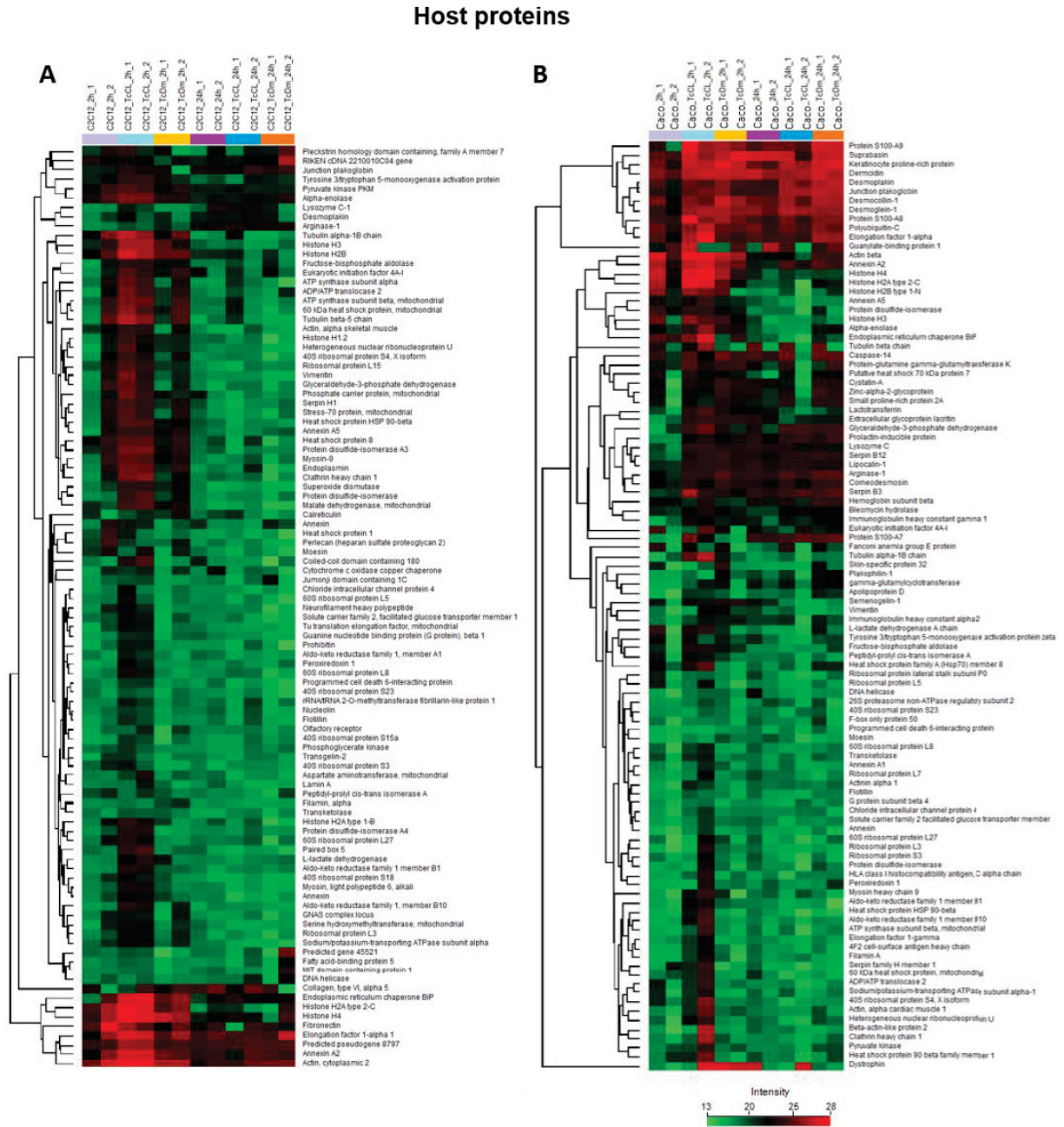


Clusterização hierárquica de proteínas de *T. cruzi* baseada na intensidade em amostras de C2C12 (A) ou Caco-2 (B). Na parte superior dos gráficos encontra-se a identificação da amostra de cada coluna, sendo que TcCL\_2h e TcDm\_2h correspondem à VEs vindas do parasito isolado (sem contato com células hospedeiras) por 2 horas; as seguintes amostras referem-se as VEs vindas do contato de cada cepa com a célula hospedeira por 2h ou 24h. O numeral 1 e 2 ao final da identificação refere-se a replicata biológica.

Quanto às proteínas das células hospedeiras identificadas nas VEs (Fig. 21), é possível reparar que proteínas como actina, anexina A2, fator de alongação 1-alfa e fibronectina mantem-se abundante em todas as VEs vindas de C2C12 (com ou sem contato com *T. cruzi*). Já nas células Caco-2, foi visto uma alta concentração de proteínas como suprabasina, proteína de queratinócito rica em prolina, dermocidina, desmoplaquina, plakoglobina, desmocolina, desmogleína, poliubiquitina-C e fator de alongação 1-alfa em todas as amostras. Interessantemente, algumas dessas proteínas são importantes em processos de adesão celular. Também é possível

notar que certas proteínas são altamente encontradas nas VEs de 2h, porém tem uma baixa detecção nas VEs vindas das células 24 h após a infecção.

Figura 21. Clusterização hierárquica de proteínas hospedeiras



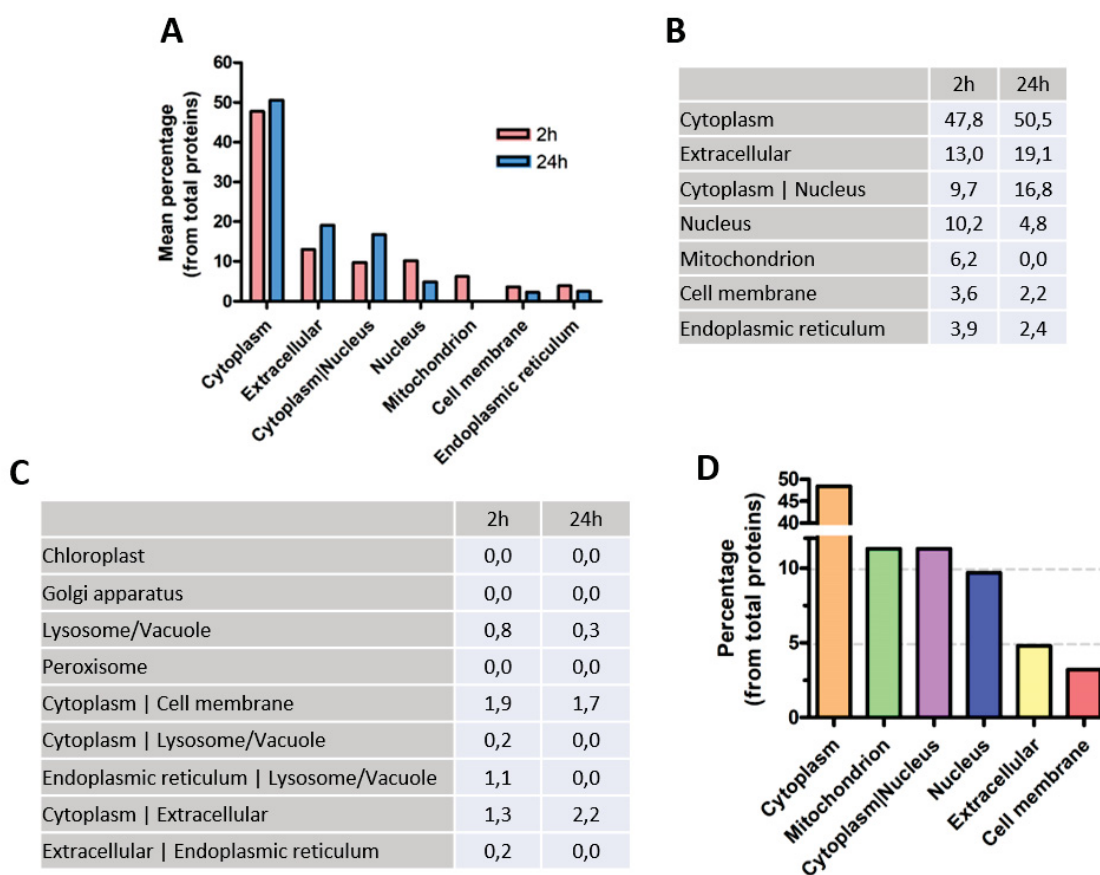
Clusterização hierárquica de proteínas hospedeiras baseada na intensidade em amostras de C2C12 (A) ou Caco-2 (B). Na parte superior dos gráficos encontra-se a identificação da amostra de cada coluna.

#### 4.4.2 LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NAS VES

Em seguida, a predição da localização subcelular das proteínas identificadas nas VEs de 2 e 24 h.p.i foi avaliada utilizando a ferramenta DeepLoc. Para isso,

foram avaliadas somente as proteínas derivadas do hospedeiro e classificadas de acordo com o percentual de proteínas presentes em cada categoria identificada. Inicialmente, foi calculada a média do percentual de proteínas encontradas em todas as categorias separando-se as VEs isoladas das primeiras 2 h das isoladas 24 h.p.i. A figura 22 A mostra as principais sublocalizações das proteínas identificadas, sendo elegidas para os demais gráficos somente as sublocalizações que tiveram média percentual superior à 3% em VEs de 2 ou 24h (Fig. 22 B). A figura 22 C mostra os percentuais das demais categorias que tiveram média inferior à 3% em ambos grupos de VEs. O mesmo foi calculado para proteínas derivadas dos parasitos isolados (sem distinção de cepas). O perfil de sublocalização celular para estas mostrou também uma maioria de proteínas citoplasmáticas (Figura 22 D).

Figura 22. Predição da localização subcelular das proteínas identificadas nas VEs de 2h e 24 h.p.i avaliada pela ferramenta Deeploc

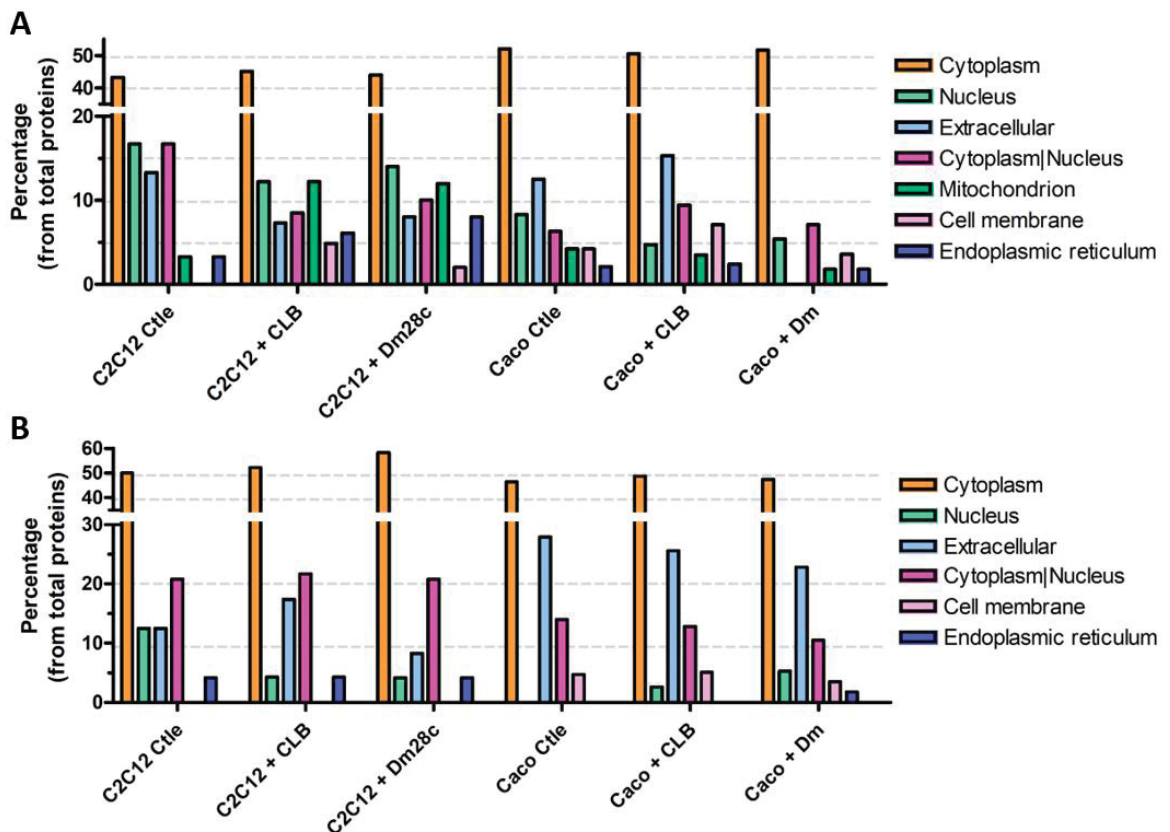


A) Média do percentual de proteínas encontradas em todas as categorias separando-se as VEs isoladas das primeiras 2 h das isoladas 24 hpi (somente proteínas do hospedeiro). B) Valores médios encontrados nas categorias (considerou-se apenas valores superiores a 3% em um dos tempos avaliados). C) Categorias que tiveram percentual médio abaixo de 3% em algum dos tempos avaliados e que não foram consideradas para seguintes análises. D) Predição subcelular das proteínas derivadas de *T. cruzi* (VEs de TCTs sem contato com células hospedeiras por 2h. As

proteínas encontradas nas VEs da cepa CL Brener e Dm28c foram reunidas e analisadas em conjunto).

Nota-se que as proteínas citoplasmáticas são maioria em todas as VEs analisadas (acima de 40% do total de proteínas), tanto de 2 h.p.i quanto 24 h.p.i (Fig. 23 A e B, respectivamente). Nas VEs derivadas de C2C12 das 2 primeiras horas de infecção (com ou sem contato com parasitos), vê-se um número expressivo de proteínas nucleares, superior à 10% das proteínas totais nos 3 grupos. Curioso observar que proteínas extracelulares mostram-se em maior proporção em VEs vindas das células Caco-2, principalmente nas VEs após 24 h de infecção, onde correspondem a mais de 20% das proteínas totais. Não sabemos se essas proteínas podem ter sido “peletadas” junto as VEs (como um contaminante) ou se representam um fenômeno de exportação de proteínas extracelulares nas VEs. Qual é o valor biológico deste dado, ainda precisa ser estudado. Proteínas mitocondriais apareceram somente nas VEs derivadas das duas primeiras horas de infecção. Proteínas membranares e de retículo endoplasmático tiveram menor proporção em todas as VEs.

Figura 23. Predição da localização subcelular das proteínas identificadas nas VEs de C2C12 e Caco-2 na interação ou não com CL Brener e Dm28c.



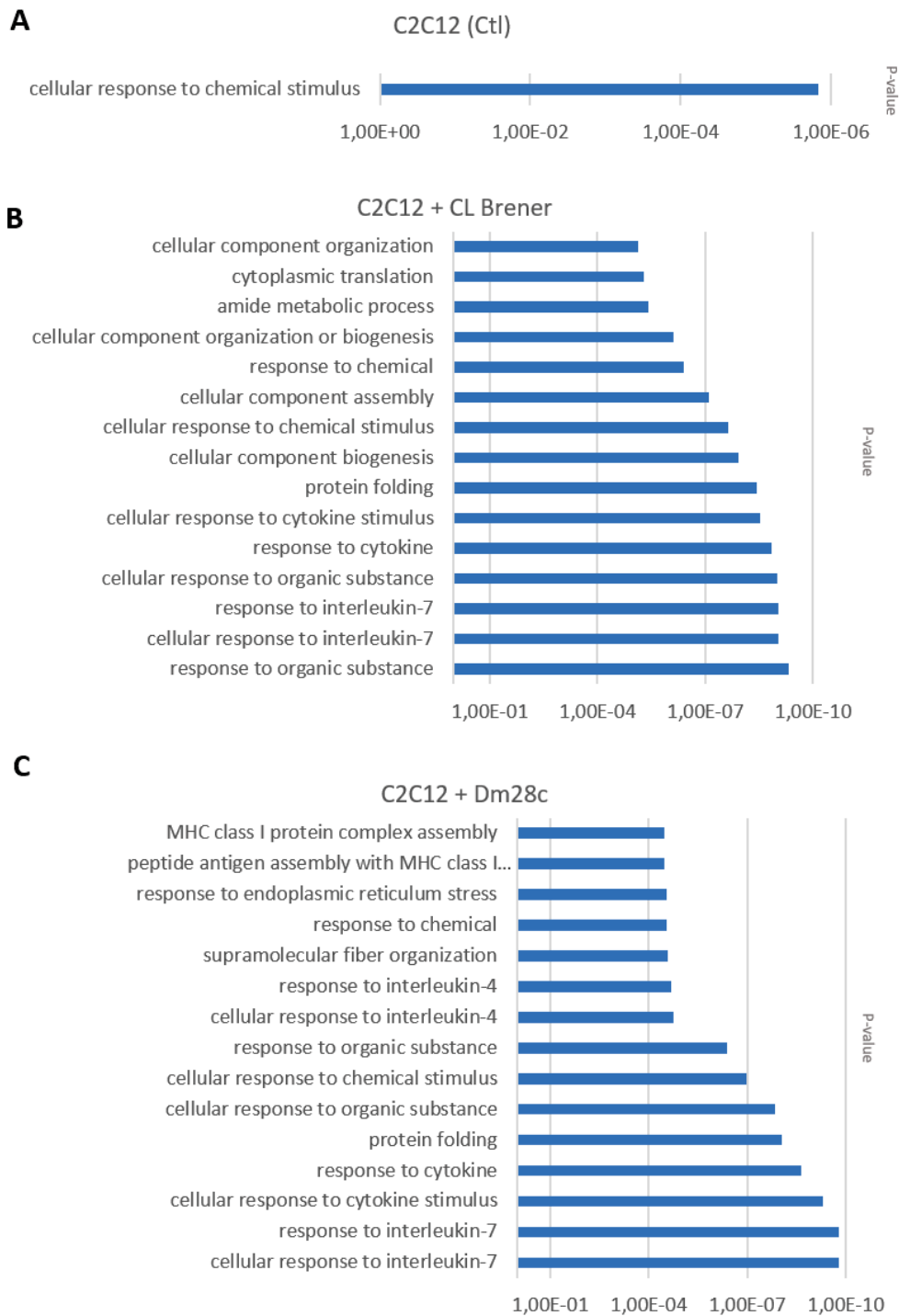
Localização subcelular de proteínas de VEs de 2 h.p.i. (A) e VEs de 24 h.p.i (B).

#### 4.4.3 ANÁLISE DOS PROCESSOS BIOLÓGICOS RELACIONADOS ÀS PROTEÍNAS ENCONTRADAS NAS VES

Para entender um pouco das funções das proteínas analisadas nas VES, analisamos os processos biológicos nos quais as proteínas presentes das VEs estariam envolvidas por meio de análise de ontologia gênica (*gene ontology* - GO). A análise de enriquecimento de GO mostra quais categorias (ou termos) estão significativamente sub ou super-representados em um conjunto de dados. A análise leva em consideração o número de genes anotados para um termo GO em todo o conjunto “*background*”/de fundo (no nosso caso, o conjunto de genes de cada organismo). Na análise, os termos GO compartilhados pelo conjunto de genes analisado são comparados com a distribuição de fundo da anotação daquele organismo. Quanto mais próximo o valor de p estiver de zero, mais significativo é o termo GO específico associado ao grupo de genes (ou seja, menos provável que a anotação observada do termo GO específico para um grupo de genes ocorra por acaso). Em resumo, é verificada a probabilidade de ver pelo menos x número de genes do total de n genes na lista anotada para um determinado termo GO, dada a proporção de genes em todo o genoma que são anotados para esse termo GO. Por exemplo, se a lista de interesse contém 10 genes e o enriquecimento é feito para processo biológico em determinado organismo cujo conjunto de fundo contém 6442 genes, então se 5 dos 10 genes de entrada são anotados para o termo GO: reparo de DNA, então a frequência de amostra para reparo de DNA será 5/10. Considerando que, se houver 100 genes anotados para reparo de DNA em todo o genoma de este organismo, a frequência de fundo será 100/6442 e a amostra estará enriquecida na GO reparo de DNA. Outro exemplo: existem 23.481 genes na lista de referência (ex: o genoma humano), sendo que 125 desses genes são mapeados para a categoria 'empacotamento e remodelação da cromatina' (ou seja, 0,532% dos genes da lista de referência estão envolvidos no empacotamento e remodelamento da cromatina). Se a lista de genes da amostra conter 978 genes, espera-se que 5,21 genes (978 x 0,532%) da lista estejam envolvidos no empacotamento e remodelação da cromatina. Se para este processo biológico for observado mais genes em sua lista carregada do que o esperado, você terá uma super-representação de genes envolvidos no empacotamento e remodelação da cromatina.

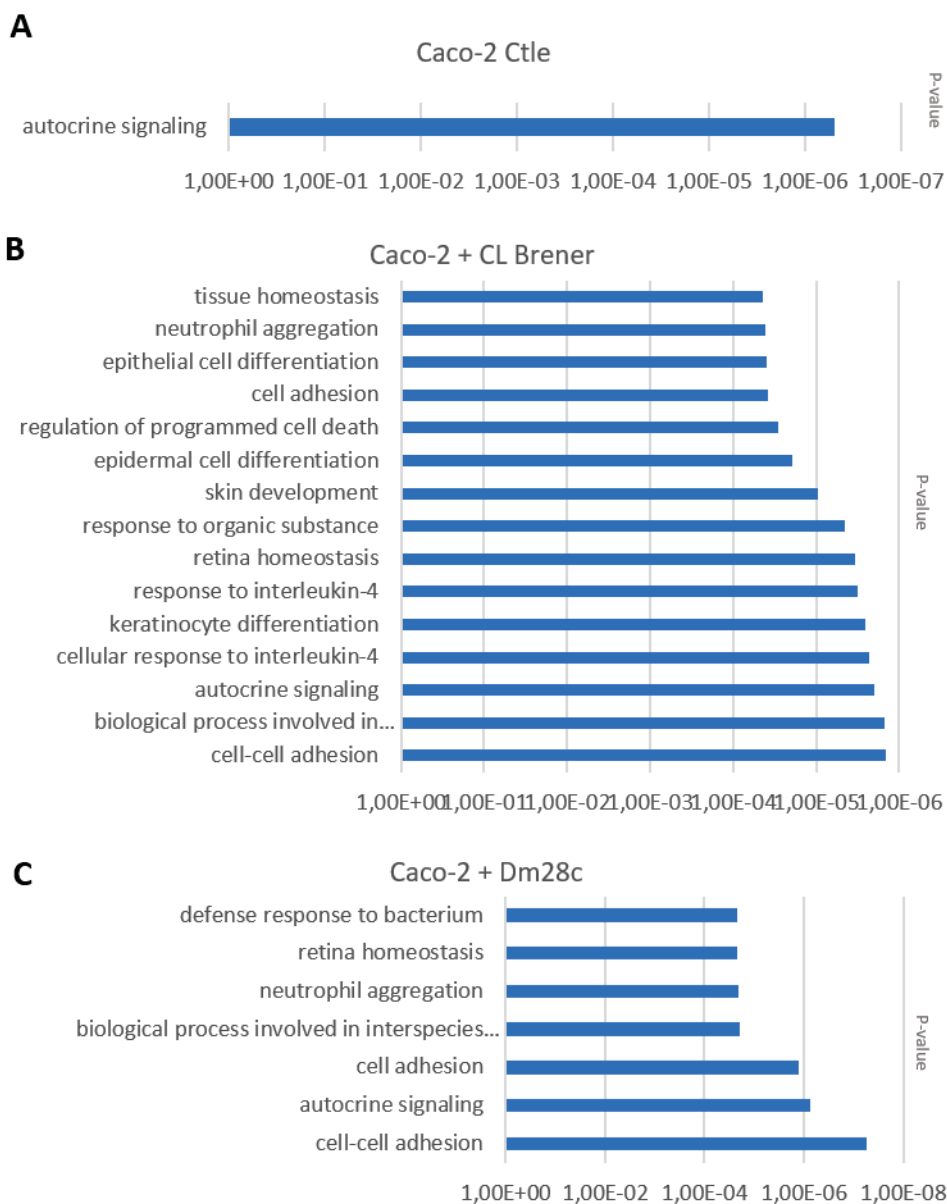
A análise de enriquecimento de GO foi realizada utilizando o site <http://geneontology.org/>, considerando cada conjunto de proteínas identificados nas VEs (Figura 24 e 25). Por padrão, todas as categorias com valor de p menor que 0,05 são exibidas pela análise e estão mostradas na tabela 1. Para os gráficos (Figura 24 e 25), estão sendo mostrados apenas os 15 termos que tiveram maior diferença estatística (considerando o valor de p-value bruto). Todos os termos GO detectados com diferença estatística mostraram super-representação em nossas amostras (aumento da classe de genes na amostra em relação ao anotado para cada organismo). Interessantemente, se vê que VEs das células controle (que não tiveram contato com *T. cruzi*) possuíram enriquecimento para somente um termo de GO: resposta celular à estímulo químico para C2C12 e sinalização autócrina para Caco-2. Este número sobe quando as células interagem com *T. cruzi*, mostrando que a composição das VEs é afetada pela exposição ao patógeno. Processos biológicos de resposta celular, como resposta à citocinas/interleucinas, resposta a substância orgânicas, regulação da morte celular, processos biológicos envolvidos na interação inter-espécies e adesão celular aparecem entre os super-representados em VEs de células em contato com *T. cruzi*.

Figura 24. Análise de enriquecimento de GO para processos biológicos em VEs de C2C12



Análise de enriquecimento de GO para processos biológicos nas proteínas encontradas em VEs de C2C12 (A), C2C12 + CL Brener (B) e C2C12 + Dm28c (C). O eixo Y mostra os processos biológicos enriquecidos e o eixo X mostra o valor de p-value (em escala logarítmica inversa). Mostradas apenas as 15 categorias com menores valores de p.

Figura 25. Análise de enriquecimento de GO para processos biológicos nas proteínas encontradas em VEs de Caco-2



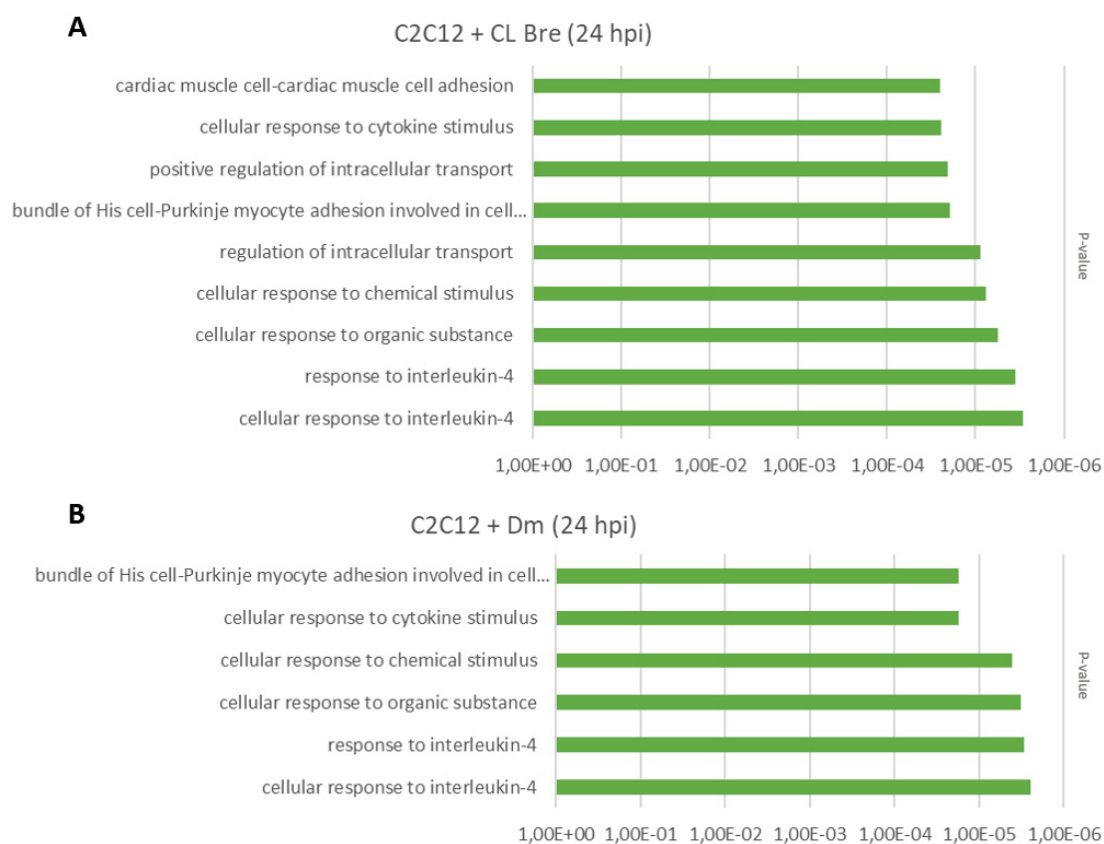
Análise de enriquecimento de GO para processos biológicos nas proteínas encontradas em VEs de Caco-2 (A), Caco-2 + CL Brener (B) e Caco-2 + Dm28c (C). O eixo y mostra os processos biológicos enriquecidos e o eixo x mostra o valor de p-value (em escala logarítmica inversa). Mostradas apenas as 15 categorias com menor valor de p.

Tabela 1. Análise de enriquecimento de GO para processos biológicos nas proteínas encontradas em VEs de 2 hpi (à esquerda, VEs de C2C12 e à direita, Caco-2).

|   | Biological Process  |   | Biological Process                                      |
|---|---|---|---|
| C2C12   |   | Caco-2  |   |
| Ctl   | cellular response to chemical stimulus                    | Ctle  | autocrine signaling                                     |
| C2C12 + CL Bre  | response to organic substance                             | Caco-2 + CL Bre   | cell-cell adhesion                                      |
|   | cellular response to interleukin-7                        |   | biological process involved in interspecies interaction |
|   | response to interleukin-7                                 |   | autocrine signaling                                     |
|   | cellular response to organic substance                    |   | cellular response to interleukin-4                      |
|   | response to cytokine                                      |   | keratinocyte differentiation                            |
|   | cellular response to cytokine stimulus                    |   | response to interleukin-4                               |
|   | protein folding   |   | retina homeostasis                                      |
|   | cellular component biogenesis                             |   | response to organic substance                           |
|   | cellular response to chemical stimulus                    |   | skin development  |
|   | cellular component assembly                               |   | epidermal cell differentiation                          |
|   | response to chemical                                      |   | regulation of programmed cell death                     |
|   | cellular component organization or biogenesis             |   | cell adhesion   |
|   | amide metabolic process                                   |   | epithelial cell differentiation                         |
|   | cytoplasmic translation                                   |   | neutrophil aggregation                                  |
|   | cellular component organization                           |   | tissue homeostasis                                      |
|   | peptide metabolic process                                 |   | anatomical structure homeostasis                        |
|   | protein refolding   |   | antimicrobial humoral response                          |
|   | protein-containing complex assembly                       |   | Caco-2 + Dm28c  |
|   | regulation of biological quality                          | autocrine signaling                                     |   |
|   | cellular response to interleukin-4                        | cell adhesion   |   |
|   | cellular process  | biological process involved in interspecies interaction |   |
|   | response to interleukin-4                                 | neutrophil aggregation                                  |   |
| peptide antigen assembly with MHC class I protein complex | retina homeostasis  |   |   |
| MHC class I protein complex assembly                      | defense response to bacterium                             |   |   |
|   |   |   |   |
| C2C12 + Dm28c   | cellular response to interleukin-7                        |   |   |
|   | response to interleukin-7                                 |   |   |
|   | cellular response to cytokine stimulus                    |   |   |
|   | response to cytokine                                      |   |   |
|   | protein folding   |   |   |
|   | cellular response to organic substance                    |   |   |
|   | cellular response to chemical stimulus                    |   |   |
|   | response to organic substance                             |   |   |
|   | cellular response to interleukin-4                        |   |   |
|   | response to interleukin-4                                 |   |   |
|   | supramolecular fiber organization                         |   |   |
|   | response to chemical                                      |   |   |
|   | response to endoplasmic reticulum stress                  |   |   |
|   | peptide antigen assembly with MHC class I protein complex |   |   |
|   | MHC class I protein complex assembly                      |   |   |
|   | cellular component organization or biogenesis             |   |   |

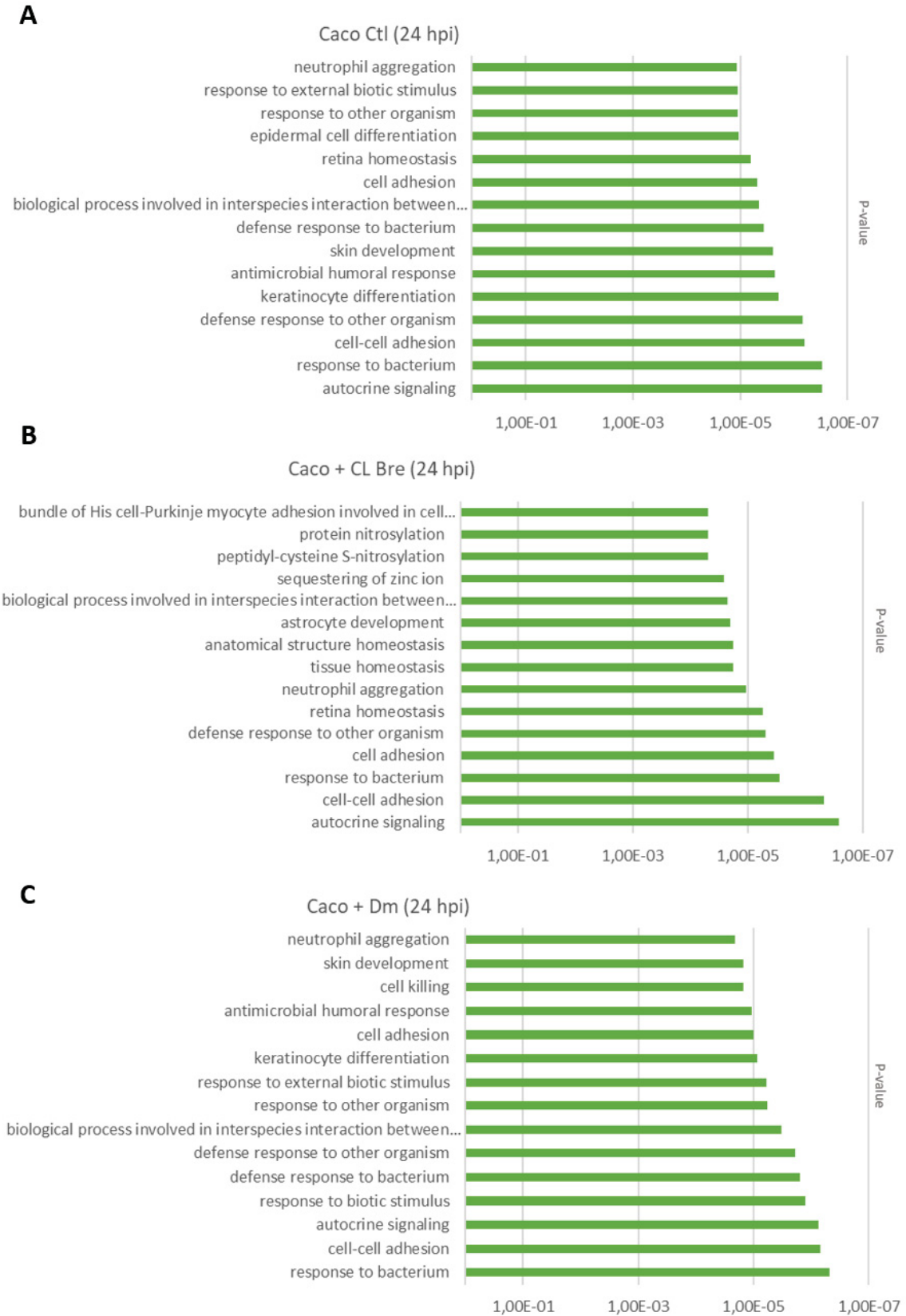
A análise de enriquecimento de GO também foi realizada para amostras de VEs de células 24 horas após a infecção. Os gráficos (Fig. 26 e 27) mostram apenas os 15 termos que tiveram maior diferença estatística (considerando o valor de p-value bruto). Todos os termos GO detectados com diferença estatística mostraram super-representação nestas amostras (aumento da classe de genes na amostra em relação ao anotado para cada organismo). A amostra de C2C12 controle não obteve nenhum termo sub ou super-representado com diferença estatística e por isso não consta na Fig. 26. Categorias como adesão de células cardíacas, resposta a citocinas e regulação de transporte intracelular estão entre os processos super-representados em VEs de C2C12 com parasitos (24 h.p.i.). Para Caco-2 (Fig. 27), tanto amostras controle como vindas de células infectadas tiveram alto número de termos enriquecidos e grande parte deles enriquecido em pelo menos 2 das 3 amostras (28 de 48 totais) (Fig. 28).

Figura 26. Análise de enriquecimento de GO para processos biológicos nas proteínas encontradas em VEs de 24 h.p.i de C2C12



Análise de enriquecimento de GO para processos biológicos nas proteínas encontradas em VEs de 24 h.p.i de C2C12 (A), C2C12 + CL Brener (B) e C2C12 + Dm28c (C). O eixo y mostra os processos biológicos enriquecidos e o eixo x mostra o valor de p-value (em escala logarítmica inversa). Mostradas todas as categorias com diferença estatística.

Figura 27. Análise de enriquecimento de GO para processos biológicos nas proteínas encontradas em VEs de 24 h.p.i de Caco-2



Análise de enriquecimento de GO para processos biológicos nas proteínas encontradas em VEs de 24 h.p.i de Caco-2 controle (A), Caco-2 + CL Brener (B) e Caco-2 + Dm28c (C). O eixo y mostra os

processos biológicos enriquecidos e o eixo x mostra o valor de p-value (em escala logarítmica inversa). Mostradas apenas as 15 categorias com menores valores de p.

Figura 28. Análise de enriquecimento de GO para processos biológicos nas proteínas encontradas em VEs de 24 h.p.i de Caco-2 controle, Caco-2 + CL Brener e Caco-2 + Dm28c.

| Biological process  |          |               |           | Biological process                            |          |               |           |
|---|----------|---------------|-----------|---|----------|---------------|-----------|
|   | Caco Ctl | Caco + CL Bre | Caco + Dm |   | Caco Ctl | Caco + CL Bre | Caco + Dm |
| anatomical structure homeostasis  |          |               |           | neutrophil aggregation                        |          |               |           |
| antimicrobial humoral immune response mediated by antimicrobial peptide     |          |               |           | peptide cross-linking                         |          |               |           |
| antimicrobial humoral response  |          |               |           | peptidyl-cysteine S-nitrosylation             |          |               |           |
| astrocyte development   |          |               |           | positive regulation of endopeptidase activity |          |               |           |
| astrocyte differentiation   |          |               |           | positive regulation of peptidase activity     |          |               |           |
| autocrine signaling   |          |               |           | positive regulation of proteolysis            |          |               |           |
| biological process involved in interspecies interaction between organisms   |          |               |           | protein nitrosylation                         |          |               |           |
| bundle of His cell-Purkinje myocyte adhesion involved in cell communication |          |               |           | regulation of endopeptidase activity          |          |               |           |
| cardiac muscle cell-cardiac muscle cell adhesion                            |          |               |           | regulation of peptidase activity              |          |               |           |
| cell adhesion   |          |               |           | regulation of proteolysis                     |          |               |           |
| cell-cell adhesion  |          |               |           | response to bacterium                         |          |               |           |
| cell killing  |          |               |           | response to biotic stimulus                   |          |               |           |
| cellular response to interleukin-4  |          |               |           | response to external biotic stimulus          |          |               |           |
| defense response  |          |               |           | response to external stimulus                 |          |               |           |
| defense response to bacterium   |          |               |           | response to fungus                            |          |               |           |
| defense response to fungus  |          |               |           | response to interleukin-4                     |          |               |           |
| defense response to other organism  |          |               |           | response to lipopolysaccharide                |          |               |           |
| desmosome organization  |          |               |           | response to molecule of bacterial origin      |          |               |           |
| epidermal cell differentiation  |          |               |           | response to other organism                    |          |               |           |
| epidermis development   |          |               |           | retina homeostasis                            |          |               |           |
| epithelial cell differentiation   |          |               |           | sensory perception of taste                   |          |               |           |
| humoral immune response   |          |               |           | sequestering of zinc ion                      |          |               |           |
| immune response   |          |               |           | skin development                              |          |               |           |
| keratinocyte differentiation  |          |               |           | tissue homeostasis                            |          |               |           |

São mostradas todas as categorias que tiveram diferença estatística, e em azul estão demarcados em quais processos houve diferente representação de cada termo.

#### 4.4.4 COMPARAÇÃO DAS PROTEÍNAS ENCONTRADAS NAS VES COM OUTROS TRABALHOS

A fim de comparar as proteínas encontradas em nossas amostras com as proteínas comumente encontradas em VEs, nós utilizamos uma lista das principais proteínas encontradas em VEs a partir de um repositório chamado EVpedia. O EVpedia ([https://evpedia.info/evpedia2\\_xe/](https://evpedia.info/evpedia2_xe/)) é um banco de dados de proteoma,

transcriptoma e lipidoma de VEs derivados de diferentes origens. Foram listadas as 300 proteínas mais comumente identificadas em VEs de humanos e camundongos e comparadas com a lista completa de todas as proteínas encontradas em C2C12 e Caco-2 (independentemente do contato com *T. cruzi*). Das 77 proteínas de *Homo sapiens* identificadas nas VEs de Caco-2, 24 se sobrepuseram com proteínas listadas no EVpedia. Nas VEs de C2C12, houve uma sobreposição de 34 de um total de 87 proteínas identificadas nas amostras na comparação com o banco de 300 proteínas mais encontradas em VEs (Tabela 2). Entre as proteínas presentes nas sobreposições estão actina, anexina A2 e A5, alfa-enolase, cadeia pesada de clatrina, histonas e tubulinas. Essa sobreposição é importante pois indica possíveis “marcadores” de VEs confirmados em nossas amostras e revela que proteínas que normalmente não seriam supostas como integrantes de VEs (como histonas) são também encontradas em análises proteômica de VEs de outros modelos.

Tabela 2. Intersecção entre as 300 proteínas mais comumente identificadas em VEs de humanos e de camundongo com as proteínas encontradas nas VEs de C2C12 e Caco-2 (com ou sem *T. cruzi*).

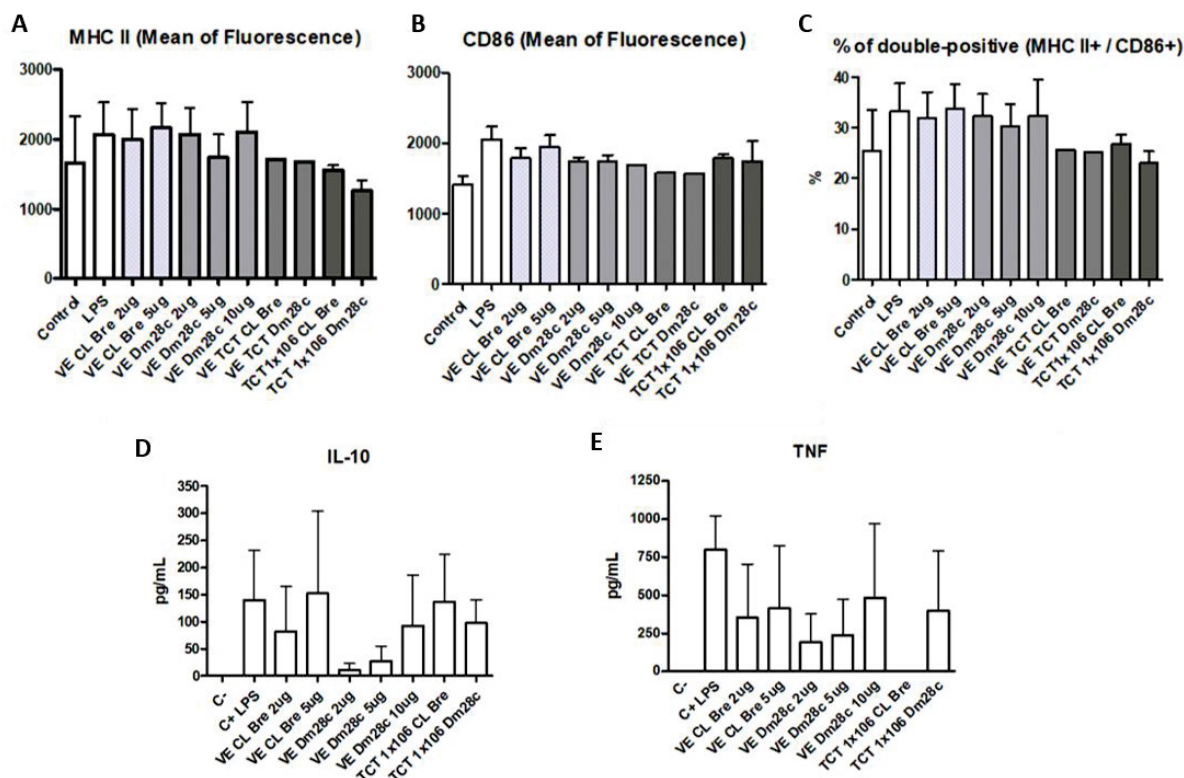
| <b>24 Proteins Intersection (Human – Caco-2)</b>     | <b>34 Proteins Intersection (Mouse – C2C12)</b> |
|--|---|
| 40S ribosomal protein S4                             | 40S ribosomal protein S4                        |
| Actin  | 60 kDa heat shock protein                       |
| Alpha-enolase  | 60S ribosomal protein L27                       |
| Annexin A2   | 60S ribosomal protein L5                        |
| Annexin A5   | 60S ribosomal protein L8                        |
| Beta-actin-like protein 2                            | Actin   |
| Chloride intracellular channel protein 4             | ADP/ATP translocase 2                           |
| Clathrin heavy chain 1                               | Aldo-keto reductase family 1 member B1          |
| Desmoplakin  | Alpha-enolase                                   |
| Elongation factor 1-gamma                            | Annexin A2                                      |
| Endoplasmic reticulum chaperone BiP                  | Annexin A5                                      |
| Eukaryotic initiation factor 4A-I                    | ATP synthase subunit beta                       |
| Heat shock protein HSP 90-beta                       | Calreticulin                                    |
| Histone H4   | Clathrin heavy chain 1                          |
| Junction plakoglobin                                 | Elongation factor 1-alpha 1                     |
| L-lactate dehydrogenase A chain                      | Endoplasmic reticulum chaperone BiP             |
| Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A                | Endoplasmin                                     |
| Protein S100-A8                                      | Eukaryotic initiation factor 4A-I               |
| Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 | Heat shock protein HSP 90-beta                  |
| Solute carrier family 2                              | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U       |
| Transketolase  | Histone H1.2                                    |
| Tubulin alpha-1B chain                               | Histone H4                                      |

|                    |   |
|--------------------|---|
| Tubulin beta chain | Malate dehydrogenase                        |
| Vimentin           | Moesin                                      |
|                    | Myosin-9                                    |
|                    | Nucleolin                                   |
|                    | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A       |
|                    | Programmed cell death 6-interacting protein |
|                    | Protein disulfide-isomerase                 |
|                    | Protein disulfide-isomerase A3              |
|                    | Pyruvate kinase PKM                         |
|                    | Solute carrier family 2                     |
|                    | Stress-70 protein                           |
|                    | Tubulin beta-5 chain                        |

#### 4.5 MODULAÇÃO DE VES SOBRE O SISTEMA IMUNE

Um dos nossos objetivos era entender se as VEs poderiam modular o sistema imune do hospedeiro e o curso da infecção. O nosso primeiro intuito foi avaliar a modulação de células dendríticas (*dendritic cells* - DCs), que atuam como uma célula apresentadora de antígenos, representando um elo entre a resposta imune inata e a adaptativa. As DCs são capazes de reconhecer padrões e ativar e regular a resposta de linfócitos T. Para isso, foram isoladas VEs de formas TCTs em contato com células VERO e usadas para tratar DCs isoladas a partir da medula óssea de camundongos (ver Materiais e Métodos). Após 24h de exposição às VEs, foram analisadas a expressão de MHC II e CD86 por citometria de fluxo de forma a indicar o estado de ativação das DCs. As VEs foram capazes de aumentar a expressão de MHC II e CD86 em níveis similares ao LPS, embora não de forma significativa (Fig. 29). É interessante ressaltar que a ativação desencadeada por VEs foi mais alta quando comparada à exposição aos TCTs vivos. A análise da liberação das citocinas IL-10 e TNF-alfa pelas DCs por ELISA mostrou que as VEs foram capazes de induzir a secreção desses fatores de maneira dose dependente (Fig. 29 D-E), porém estes dados tiveram grande variação e serão repetidos para entender de forma mais clara o perfil de ativação das DCs após exposição às VEs.

Figura 29. Modulação de CDs por VEs de *T. cruzi*



Modulação de CDs por VEs de *T. cruzi*. Foram isoladas VEs de formas TCTs em contato com células Vero e usadas para tratar CDs isoladas a partir da medula óssea de camundongos em diferentes quantidades (2, 5 ou 10 ug). Após 24h de exposição às VEs, foram analisadas a expressão de MHC II (A) e CD86 (B) por citometria de fluxo de forma a indicar o estado de ativação das CDs. C) Análise do percentual de células duplo-positivas para expressão de MHC II e CD86. D) Análise da liberação das citocinas IL-10 e TNF-alfa (E) pelas CDs expostas às VEs por ELISA.

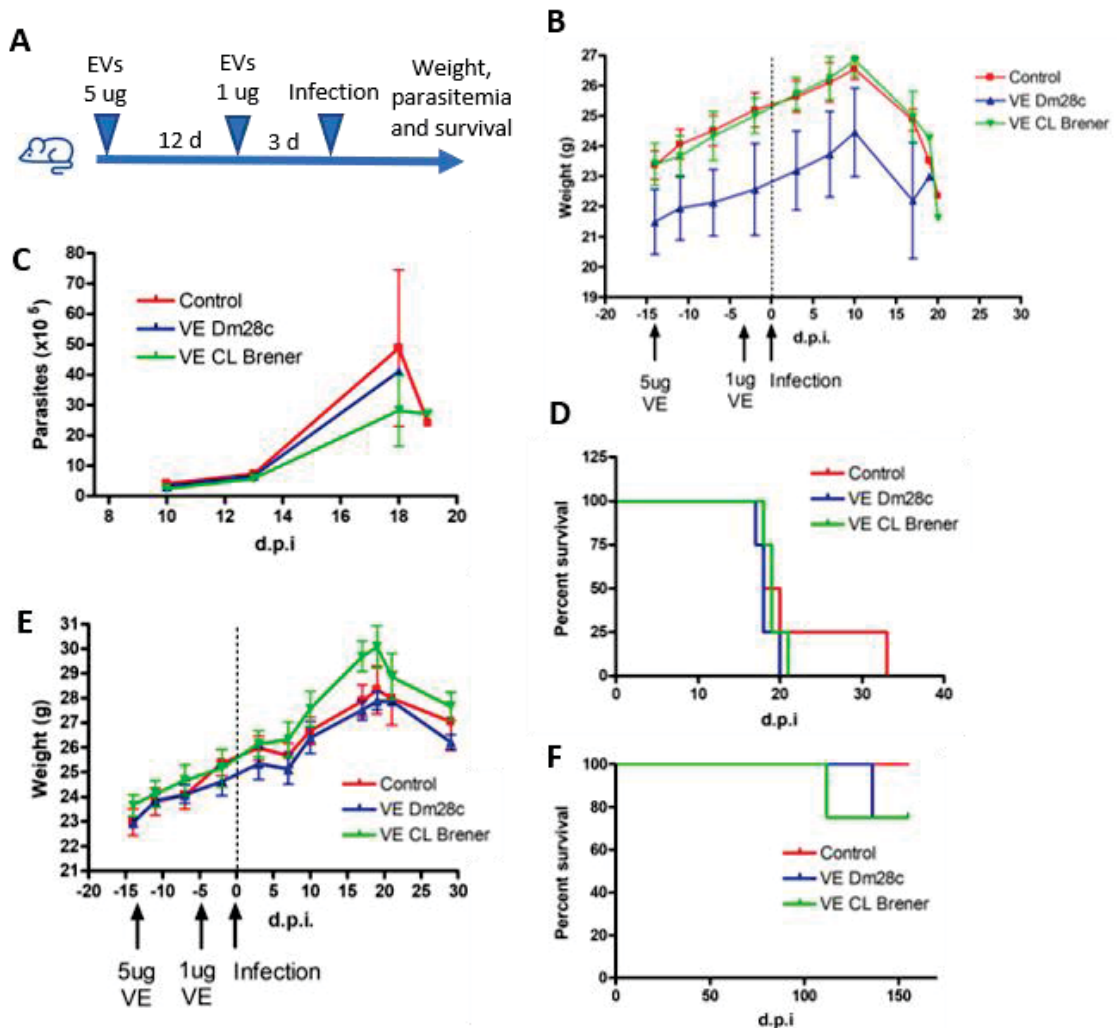
Além dos experimentos com células dendríticas, que possuem importância na ativação da resposta imune adquirida, também estão planejados experimentos para avaliação da modulação de VEs sobre macrófagos, que representariam células efetoras realizando a fagocitose e eliminação de células. Para isso, serão utilizadas células THP-1 diferenciadas com PMA. Os macrófagos serão tratados com VEs de C2C12 e Caco-2 por 3 h e 24 h e será analisada a expressão de genes das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF-alfa, IL-17, IL-10, IL-12, IL-1b por qPCR.

#### 4.6. AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS VES *IN VIVO*

Para avaliar o efeito das VEs sobre infecções *in vivo*, nós realizamos dois tipos de experimentos: pré-inoculação com VEs antes da infecção e inoculação das VEs no momento da infecção. Para avaliar o comportamento da infecção após pré-inoculação com VEs foi utilizado o seguinte esquema de tratamento dos animais

(camundongos) (Fig. 30 A): 12 dias anteriormente à infecção os animais foram inoculados com 5 ug de VEs (*T. cruzi* + Vero) e novamente com 1ug de VEs 3 dias antes da infecção. As infecções foram feitas com duas cepas diferentes ( $1 \times 10^3$  tripomastigotas): TCTs de CL Brener, cuja virulência não era conhecida nessas condições *in vivo*; e tripomastigotas Sanguíneos da cepa RA - cuja virulência já era conhecida e que classicamente leva a um pico de parasitemia entre o 12º e 20º d.p.i e morte do animal. As VEs usadas foram derivadas de CL Brener ou de Dm28c, totalizando assim 6 grupos de animais (n=4 animais por grupo): controle, VEs CL Brener e VEs de Dm28c para cada cepa de infecção. Após a infecção, o peso, parasitemia e a mortalidade dos animais foi averiguada ao longo dos dias. Para o grupo infectado com a cepa RA, houve um aumento constante do peso dos animais até o 10º d.p.i e após isso inicia uma queda do peso (Fig. 30 B) que corresponde ao momento de aumento da parasitemia dos animais (Fig. 30 C), com um pico no 18º d.p.i, porém não houve diferença entre os tratamentos. Curiosamente, a proporção de sobreviventes foi maior no grupo controle em comparação aos grupos que receberam VEs (Fig. 30 D). Infelizmente, a parasitemia não foi detectável no grupo infectado com a cepa CL Brener e houve morte de apenas 1 animal em cada grupo inoculado com VEs, somente após mais de 100 dias de infecção, indicando provavelmente que os animais não fizeram uma infecção aguda severa/detectável e evoluíram para uma fase crônica de parasitemia controlada pelo sistema imune (Fig. 30 E-F).

Figura 30. Avaliação do efeito das VEs *in vivo*

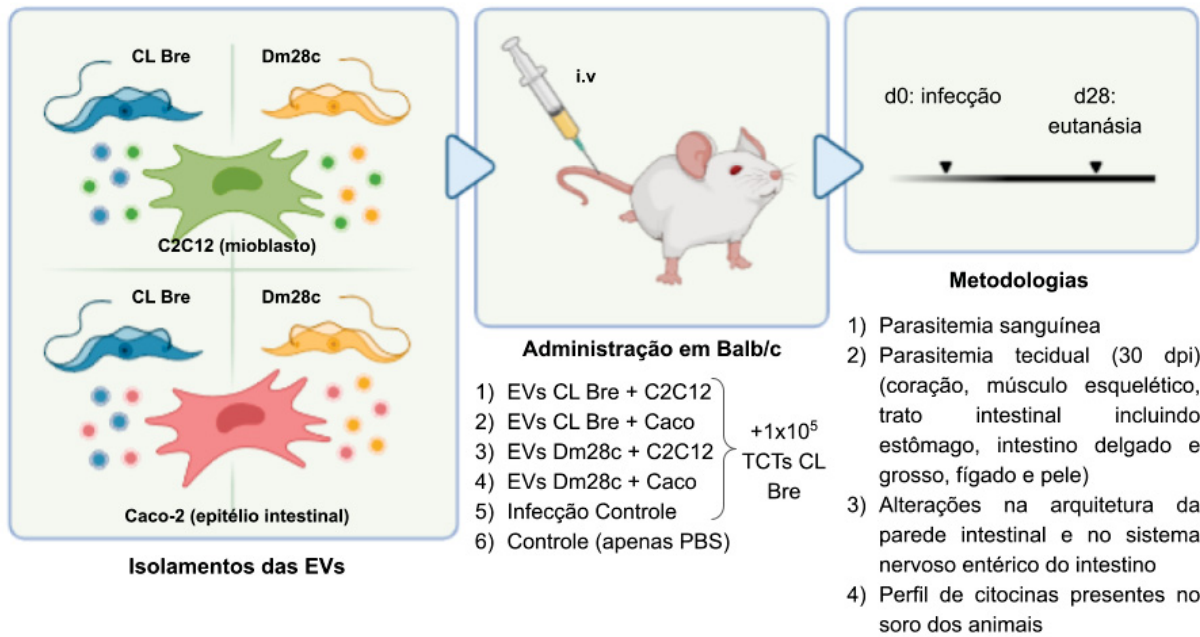


A) Esquema de tratamento dos animais (Balb/c) com VEs 12 dias antes da infecção (5 ug) e 3 dias antes da infecção (1 ug) em injeção intradermoplant. Grupos controles referem-se aos animais que receberam somente meio de cultivo. B) Peso dos animais infectados com a cepa RA. C) Parasitemia dos animais infectados com a cepa RA. D) Sobrevivência dos animais infectados com a cepa RA. E) Peso dos animais infectados com a cepa CL Brener. F) Sobrevivência dos animais infectados com a cepa CL Brener.

Para dar sequência à estes experimentos e avaliar os efeitos *in vivo* das VEs provenientes de *T. cruzi* em contato com C2C12 e Caco-2, nós redigimos um projeto que foi aprovado no Comitê de Ética da Universidade Estadual de Maringá, realizado em parceria com a Dra. Gessilda de Melo e Dr. Max Jean Toledo. O objetivo destes experimentos foi analisar os efeitos da administração de VEs (5 ug) provenientes do contato de *T. cruzi* com células C2C12 ou Caco-2 durante a infecção por *T. cruzi* (clone CL Brener) em camundongos Balb/c. Os animais foram alocados em seis grupos experimentais de sete animais cada (n=7): o grupo 1 recebeu a inoculação (via intravenosa) de  $1 \times 10^5$  tripomastigotas derivados de cultura celular (clone CL

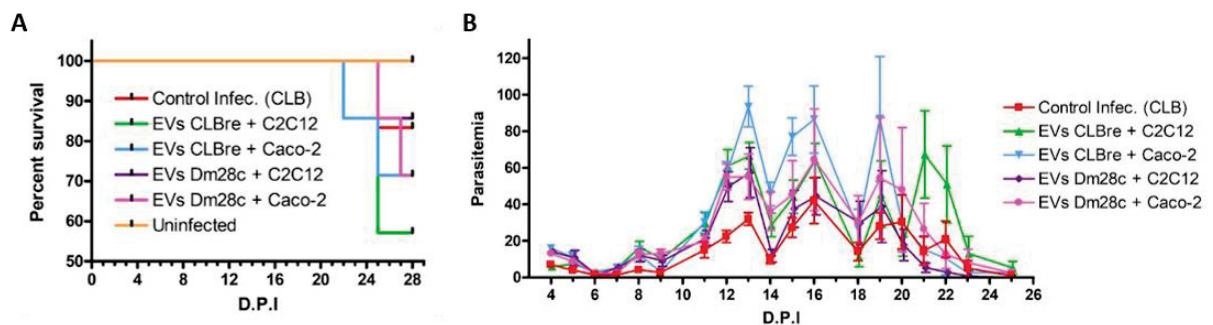
Brener) em solução salina estéril (PBS); além da infecção, o grupo 2 recebeu VEs provenientes do contato de *T. cruzi* (clone CL Brener) com células de mioblasto (C2C12); o grupo 3 recebeu VEs provenientes do contato de *T. cruzi* (clone CL Brener) com células Caco-2; o grupo 4 recebeu VEs provenientes do contato de *T. cruzi* (cepa Dm28c) com C2C12; o grupo 5 recebeu VEs provenientes do contato de *T. cruzi* (cepa Dm28c) com células de epitélio intestinal (Caco-2); e o grupo 6 foi o controle de ausência de infecção, recebendo somente solução salina estéril, também por via intravenosa. O peso dos animais e ingestão de ração foi avaliada a cada 2 dias. A parasitemia dos animais foi avaliada por coleta de sangue a partir da cauda do animal e visualização de tripomastigotas circulantes. Após 28 dias de infecção os animais foram anestesiados com vapor de isoflurano para coleta de sangue e posteriormente foram submetidos a eutanásia por aprofundamento com o mesmo anestésico seguida de deslocamento cervical. Foram coletados os seguintes órgãos: coração, músculo esquelético, trato gastrointestinal incluindo esôfago, estômago, intestino delgado e grosso, fígado e pele. A carga parasitária será obtida por qPCR tanto no sangue quanto nos tecidos. Será analisado por histologia a presença de ninhos de amastigotas nos tecidos e a migração de células imunes e reação inflamatória. Serão também analisadas alterações na arquitetura da parede intestinal e no sistema nervoso entérico do intestino dos camundongos infectados. O soro dos animais será destinado para avaliação de citocinas solúveis. A estratégia experimental está resumida na figura 31.

Figura 31. Estratégia experimental utilizada nos experimentos *in vivo*.



Após 22 dias de infecção, começou a haver morte dos animais. Os percentuais de sobrevivência ao término do experimento ficaram: Infecção controle – 83,3% (5/6), VEs CLB + C2C12 – 57,1% (4/7), VEs CLB + Caco – 71,4% (5/7), VEs Dm28c + C2C12 – 85,7% (6/7), VEs Dm28c + Caco-2 – 71,4% (6/8) e não infectados – 100% (7/7) (Fig. 32 A). O grupo controle, apesar de começar com um n de 7 animais, houve uma morte já no primeiro dia após a infecção, provavelmente porque o animal não resistiu à anestesia/sedação.

Figura 32. Dados de sobrevivência (A) e parasitemia (B) dos animais.



A parasitemia dos animais começou a ser averiguada no 4º d.p.i, quando já haviam parasitos circulantes no sangue dos animais e se manteve com um nível baixo até o 12º d.p.i, quando iniciaram picos oscilantes de alta parasitemia a cada 3 dias (Fig. 32 B). É possível perceber que houve uma tendência de parasitemia mais baixa em animais do grupo controle da infecção em comparação aos grupos que

receberam VEs, porém as diferenças estatísticas só foram vistas nos seguintes grupos (em relação ao controle): VEs CLBre + C2C12 (no 21º d.p.i) e VEs CLB + Caco (no 13, 15 e 19º d.p.i) (destacados em negrito na tabela 3).

Tabela 3. Média, desvio padrão (SD), N e p-value dos dados de parasitemia dos animais.

| D.P.I | Control Infec. |       |   | EVs CLBre + C2C12 |       |   |                    | EVs CLBre + Caco-2 |       |   |                    | EVs Dm28c + C2C12 |       |   |          | EVs Dm28c + Caco-2 |       |   |          |
|-------|----------------|-------|---|-------------------|-------|---|--------------------|--------------------|-------|---|--------------------|-------------------|-------|---|----------|--------------------|-------|---|----------|
|       | Mean           | SD    | N | Mean              | SD    | N | P-value            | Mean               | SD    | N | P-value            | Mean              | SD    | N | P-value  | Mean               | SD    | N | P-value  |
| 5     | 4,00           | 3,16  | 6 | 7,29              | 2,63  | 7 | P > 0.05           | 11,00              | 7,72  | 7 | P > 0.05           | 10,71             | 10,84 | 7 | P > 0.05 | 8,71               | 3,04  | 7 | P > 0.05 |
| 6     | 1,50           | 1,64  | 6 | 2,86              | 1,35  | 7 | P > 0.05           | 2,00               | 1,73  | 7 | P > 0.05           | 1,29              | 0,76  | 7 | P > 0.05 | 2,14               | 1,35  | 7 | P > 0.05 |
| 7     | 1,50           | 1,38  | 6 | 5,29              | 2,98  | 7 | P > 0.05           | 5,29               | 4,27  | 7 | P > 0.05           | 5,57              | 3,15  | 7 | P > 0.05 | 2,43               | 1,72  | 7 | P > 0.05 |
| 8     | 4,17           | 3,31  | 6 | 16,57             | 8,30  | 7 | P > 0.05           | 12,71              | 11,59 | 7 | P > 0.05           | 12,00             | 8,72  | 7 | P > 0.05 | 12,86              | 5,87  | 7 | P > 0.05 |
| 9     | 2,67           | 2,73  | 6 | 10,14             | 5,52  | 7 | P > 0.05           | 3,14               | 1,21  | 7 | P > 0.05           | 9,14              | 7,97  | 7 | P > 0.05 | 13,00              | 6,38  | 7 | P > 0.05 |
| 11    | 15,00          | 10,58 | 6 | 29,57             | 15,41 | 7 | P > 0.05           | 30,14              | 15,31 | 7 | P > 0.05           | 21,71             | 10,83 | 7 | P > 0.05 | 19,86              | 7,36  | 7 | P > 0.05 |
| 12    | 22,50          | 8,34  | 6 | 60,86             | 23,96 | 7 | P > 0.05           | 56,71              | 17,32 | 7 | P > 0.05           | 49,71             | 21,58 | 7 | P > 0.05 | 55,00              | 18,83 | 7 | P > 0.05 |
| 13    | 32,00          | 8,51  | 6 | 66,57             | 19,36 | 7 | P > 0.05           | 93,43              | 29,39 | 7 | <b>P &lt; 0.01</b> | 57,43             | 36,13 | 7 | P > 0.05 | 55,14              | 32,98 | 7 | P > 0.05 |
| 14    | 9,83           | 5,85  | 6 | 28,71             | 16,91 | 7 | P > 0.05           | 45,57              | 16,89 | 7 | P > 0.05           | 11,86             | 9,04  | 7 | P > 0.05 | 36,14              | 27,77 | 7 | P > 0.05 |
| 15    | 27,33          | 13,00 | 6 | 44,14             | 24,06 | 7 | P > 0.05           | 77,00              | 26,99 | 7 | <b>P &lt; 0.05</b> | 37,57             | 26,86 | 7 | P > 0.05 | 45,29              | 49,21 | 7 | P > 0.05 |
| 16    | 42,00          | 30,90 | 6 | 64,14             | 24,84 | 7 | P > 0.05           | 86,43              | 48,73 | 7 | P > 0.05           | 44,43             | 27,20 | 7 | P > 0.05 | 64,43              | 73,66 | 7 | P > 0.05 |
| 18    | 14,17          | 12,38 | 6 | 11,14             | 14,14 | 7 | P > 0.05           | 26,71              | 28,04 | 7 | P > 0.05           | 29,86             | 31,58 | 7 | P > 0.05 | 30,29              | 38,35 | 7 | P > 0.05 |
| 19    | 28,17          | 17,95 | 6 | 45,57             | 48,17 | 7 | P > 0.05           | 86,71              | 90,39 | 7 | <b>P &lt; 0.01</b> | 38,71             | 52,16 | 7 | P > 0.05 | 54,29              | 87,84 | 7 | P > 0.05 |
| 20    | 30,50          | 36,21 | 6 | 17,00             | 14,08 | 7 | P > 0.05           | 30,00              | 39,67 | 7 | P > 0.05           | 17,71             | 22,78 | 7 | P > 0.05 | 48,00              | 90,00 | 7 | P > 0.05 |
| 21    | 14,67          | 19,26 | 6 | 67,29             | 63,35 | 7 | <b>P &lt; 0.05</b> | 15,29              | 17,82 | 7 | P > 0.05           | 5,29              | 6,97  | 7 | P > 0.05 | 26,43              | 37,07 | 7 | P > 0.05 |
| 22    | 20,83          | 24,47 | 6 | 51,00             | 51,64 | 6 | P > 0.05           | 10,33              | 21,57 | 6 | P > 0.05           | 2,71              | 3,40  | 7 | P > 0.05 | 12,71              | 20,65 | 7 | P > 0.05 |
| 23    | 5,00           | 10,41 | 6 | 13,00             | 18,87 | 4 | P > 0.05           | 2,50               | 2,07  | 6 | P > 0.05           | 0,71              | 1,89  | 7 | P > 0.05 | 8,14               | 19,43 | 7 | P > 0.05 |
| 25    | 1,00           | 1,41  | 5 | 5,25              | 7,09  | 4 | P > 0.05           | 2,60               | 3,65  | 5 | P > 0.05           | 0,00              | 0,00  | 6 | P > 0.05 | 2,50               | 3,02  | 6 | P > 0.05 |

O peso dos animais manteve uma média ascendente até o 13º d.p.i, e houve queda de 7,06% no grupo de infecção controle, 7,67% no grupo que recebeu VEs de CLB + C2C12, 16,15% no grupo que recebeu VEs de CLB + Caco, 15,87% no grupo que receber VEs de Dm28c + C2C12 e 18,5% no grupo que recebeu VEs de Dm28c + Caco (considerando a maior média registrada e a média no último dia de pesagem) (Fig. 33 A-B). As diferenças estatísticas só foram vistas nos seguintes grupos (em relação ao controle – linha laranja do gráfico): VEs CL Bre + Caco (no 22 e 27º d.p.i); VEs Dm28c + C2C12 (no 22º d.p.i); VEs Dm28c + Caco (no 22, 25 e 27º d.p.i) (Tabela 4).

Quanto à ingestão de ração, nota-se que o grupo não infectado mantém uma média de ingestão de aproximadamente 4 a 5 gramas de ração por animal (Fig. 33 C). Com a infecção, há uma redução da quantidade de ração ingerida, e isso se agravou com a inoculação de VEs, chegando até a uma média de ingestão inferior a 2 gramas por animais no 15º d.p.i, justamente após o pico de parasitemia (Fig. 33 C).

Figura 33. Dados de peso (A), percentual de redução do peso em relação ao máximo (B) e ingestão de ração (C) dos experimentos *in vivo*

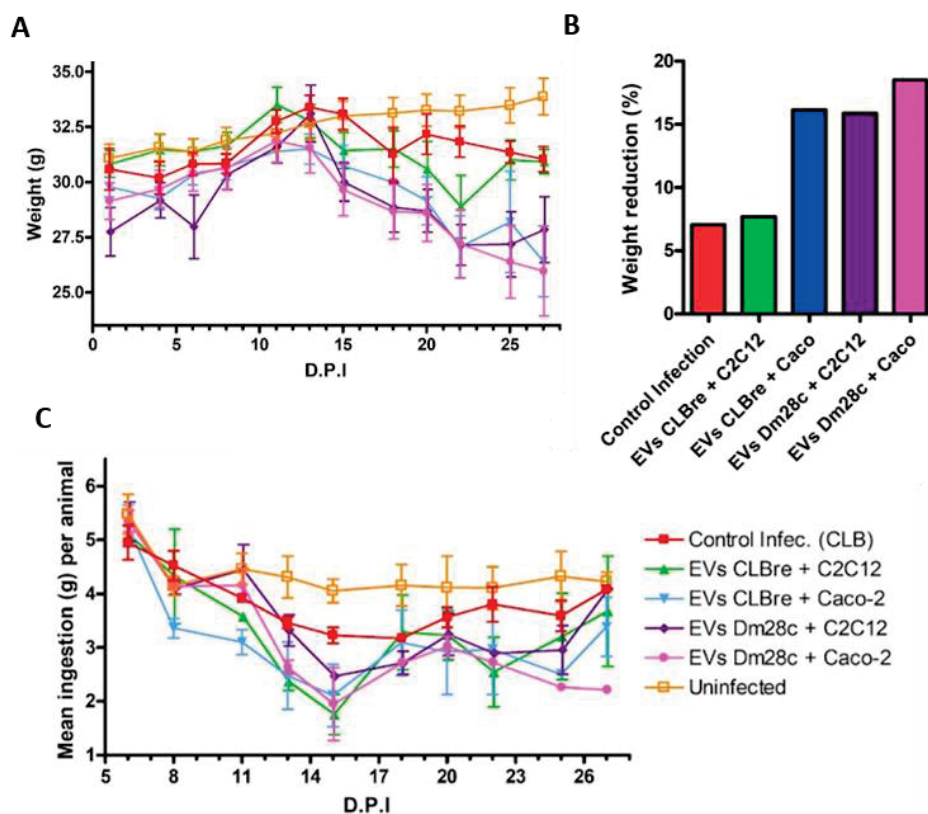
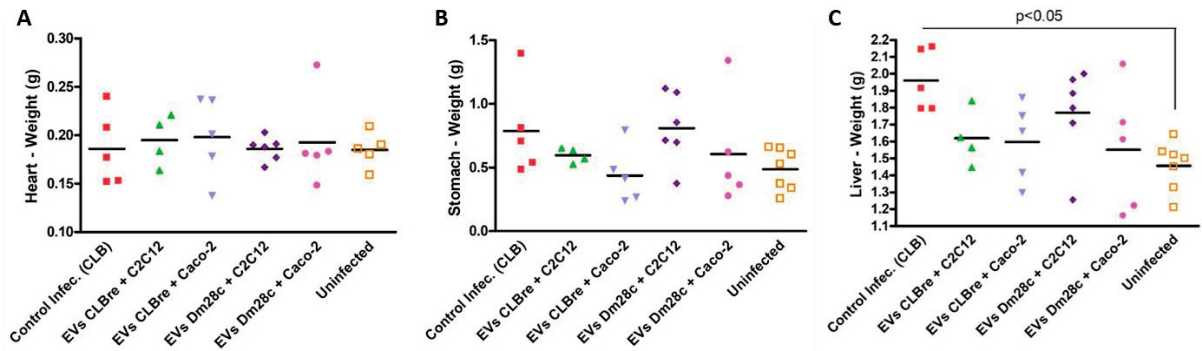


Tabela 4. Média, desvio padrão (SD), N e p-value dos dados de peso (g) dos animais.

| D.P.I | Control Infec. |      |   |         | EVs CLBre + C2C12 |      |   |          | EVs CLBre + Caco-2 |      |   |                    | EVs Dm28c + C2C12 |      |   |                    | EVs Dm28c + Caco-2 |      |   |                    | Uninfected |      |   |          |
|-------|----------------|------|---|---------|-------------------|------|---|----------|--------------------|------|---|--------------------|-------------------|------|---|--------------------|--------------------|------|---|--------------------|------------|------|---|----------|
|       | Mean           | SD   | N | P-value | Mean              | SD   | N | P-value  | Mean               | SD   | N | P-value            | Mean              | SD   | N | P-value            | Mean               | SD   | N | P-value            | Mean       | SD   | N | P-value  |
| 1     | 30,58          | 2,31 | 6 |         | 30,81             | 1,62 | 7 | P > 0.05 | 29,73              | 1,17 | 7 | P > 0.05           | 27,71             | 2,92 | 7 | P > 0.05           | 29,14              | 2,21 | 7 | P > 0.05           | 31,06      | 1,69 | 7 | P > 0.05 |
| 4     | 30,18          | 1,79 | 6 |         | 31,46             | 1,88 | 7 | P > 0.05 | 29,21              | 1,35 | 7 | P > 0.05           | 29,14             | 2,12 | 7 | P > 0.05           | 29,69              | 2,26 | 7 | P > 0.05           | 31,56      | 1,62 | 7 | P > 0.05 |
| 6     | 30,82          | 1,25 | 6 |         | 31,37             | 1,57 | 7 | P > 0.05 | 30,26              | 1,16 | 7 | P > 0.05           | 27,94             | 3,82 | 7 | P > 0.05           | 30,40              | 2,15 | 7 | P > 0.05           | 31,36      | 1,54 | 7 | P > 0.05 |
| 8     | 30,83          | 1,06 | 6 |         | 31,66             | 1,60 | 7 | P > 0.05 | 30,63              | 1,53 | 7 | P > 0.05           | 30,30             | 1,79 | 7 | P > 0.05           | 30,63              | 2,48 | 7 | P > 0.05           | 31,87      | 1,57 | 7 | P > 0.05 |
| 11    | 32,75          | 1,29 | 6 |         | 33,50             | 2,11 | 7 | P > 0.05 | 31,33              | 1,34 | 7 | P > 0.05           | 31,59             | 2,02 | 7 | P > 0.05           | 31,87              | 2,55 | 7 | P > 0.05           | 32,19      | 2,09 | 7 | P > 0.05 |
| 13    | 33,40          | 1,33 | 6 |         | 32,76             | 2,01 | 7 | P > 0.05 | 31,44              | 1,82 | 7 | P > 0.05           | 33,07             | 3,40 | 7 | P > 0.05           | 31,54              | 2,99 | 7 | P > 0.05           | 32,64      | 1,99 | 7 | P > 0.05 |
| 15    | 33,08          | 1,73 | 6 |         | 31,43             | 2,16 | 7 | P > 0.05 | 30,70              | 2,42 | 7 | P > 0.05           | 29,97             | 2,31 | 7 | P > 0.05           | 29,64              | 3,11 | 7 | P > 0.05           | 32,97      | 1,78 | 7 | P > 0.05 |
| 18    | 31,27          | 2,96 | 6 |         | 31,50             | 2,18 | 7 | P > 0.05 | 29,94              | 3,16 | 7 | P > 0.05           | 28,81             | 2,95 | 7 | P > 0.05           | 28,66              | 3,28 | 7 | P > 0.05           | 33,10      | 1,86 | 7 | P > 0.05 |
| 20    | 32,17          | 2,23 | 6 |         | 30,59             | 3,33 | 7 | P > 0.05 | 29,10              | 2,89 | 7 | P > 0.05           | 28,66             | 2,58 | 7 | P > 0.05           | 28,60              | 3,43 | 7 | P > 0.05           | 33,24      | 1,94 | 7 | P > 0.05 |
| 22    | 31,83          | 1,72 | 6 |         | 28,88             | 3,48 | 6 | P > 0.05 | 27,00              | 3,48 | 6 | <b>P &lt; 0.01</b> | 27,11             | 2,46 | 7 | <b>P &lt; 0.01</b> | 27,20              | 4,08 | 7 | <b>P &lt; 0.01</b> | 33,19      | 1,96 | 7 | P > 0.05 |
| 25    | 31,36          | 1,09 | 5 |         | 31,00             | 1,80 | 4 | P > 0.05 | 28,14              | 5,13 | 5 | P > 0.05           | 27,15             | 3,63 | 6 | P > 0.05           | 26,38              | 4,04 | 6 | <b>P &lt; 0.05</b> | 33,46      | 2,11 | 7 | P > 0.05 |
| 27    | 31,04          | 1,27 | 5 |         | 30,93             | 1,11 | 4 | P > 0.05 | 26,36              | 3,60 | 5 | <b>P &lt; 0.05</b> | 27,82             | 3,65 | 6 | P > 0.05           | 25,96              | 4,56 | 5 | <b>P &lt; 0.05</b> | 33,86      | 2,19 | 7 | P > 0.05 |

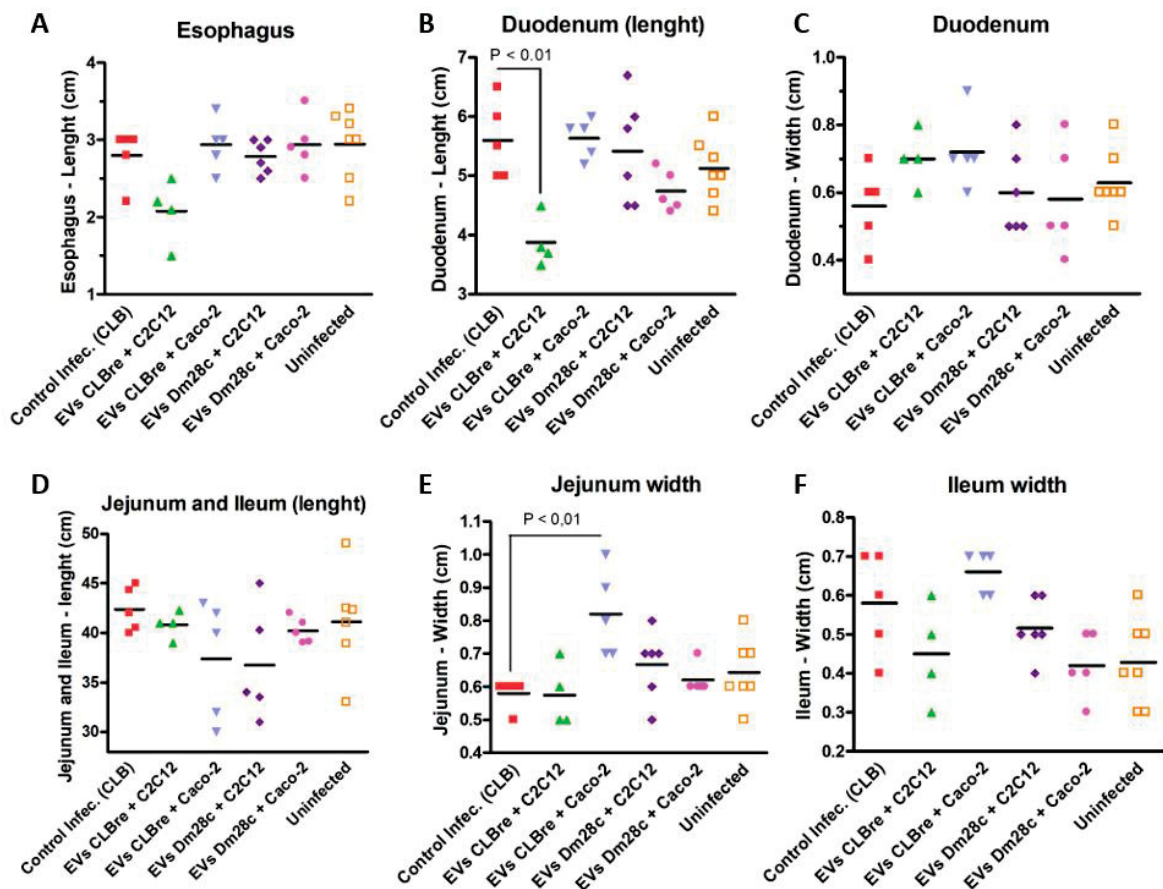
No 28º d.p.i foi realizada a eutanásia dos animais sobreviventes de todos os grupos e o coração, estômago e fígado foi pesado (Fig. 34). Os pesos destes órgãos ficaram similares entre os grupos, sem diferença estatística em comparação ao controle infectado (Fig. 34 A-C). Quanto ao fígado, houve diferença estatística entre o grupo controle da infecção e o grupo não infectado, onde houve aumento do peso do órgão com a infecção (Fig. 34 C)

Figura 34. Média do peso (g) do coração (A), estômago (B) e fígado (C) de cada grupo de animais.



Os órgãos do trato gastrointestinal foram medidos (comprimento e/ou largura) e os dados estão reunidos na figura 35 A-F e figura 33. Houve diferença estatística entre o grupo controle da infecção e o grupo que recebeu VEs de CL Bre + C2C12 no comprimento do duodeno (Fig. 35 B). Também houve aumento da largura do intestino entre o grupo controle da infecção e o que recebeu VEs de CL Bre + Caco (Fig. 35 E).

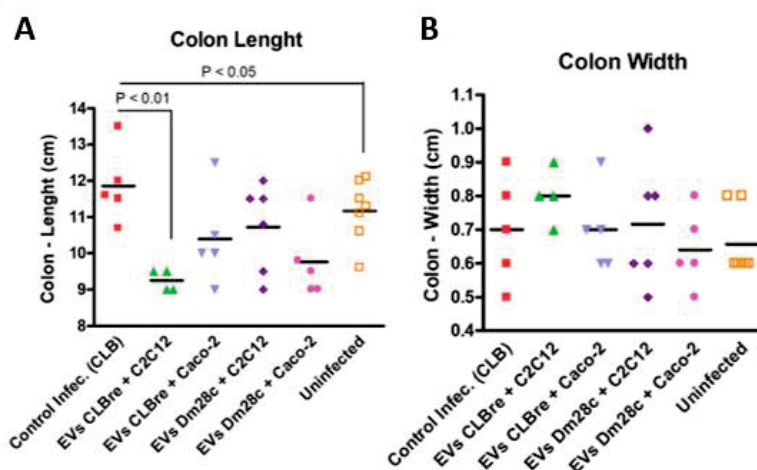
Figura 35. Média do tamanho dos órgãos do trato gastrointestinal



Média do tamanho (comprimento e/ou largura em cm) dos órgãos do trato gastrointestinal dos animais. A) largura do esôfago B) comprimento do duodeno C) largura do duodeno D) comprimento do jejuno e íleo E) largura do jejuno F) largura do íleo

Quanto ao tamanho do cólon (Fig. 36), houve diferença estatística entre o grupo controle da infecção e o grupo que recebeu VEs de CL Bre + C2C12 e com o grupo não infectado na medida do comprimento do cólon (Fig. 36 A).

Figura 36. Média do comprimento (A) e largura (B) em cm do cólon dos animais



Os tecidos dos animais foram coletados e ainda serão analisadas as alterações da arquitetura intestinal, a carga parasitária nos órgãos e o perfil de citocinas do soro e cólon dos animais para entender quais efeitos a administração das VEs de diferentes fontes tem sobre o desenvolvimento da Doença de Chagas.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS VES SOBRE RESISTÊNCIA AO BENZONIDAZOL E DORMÊNCIA

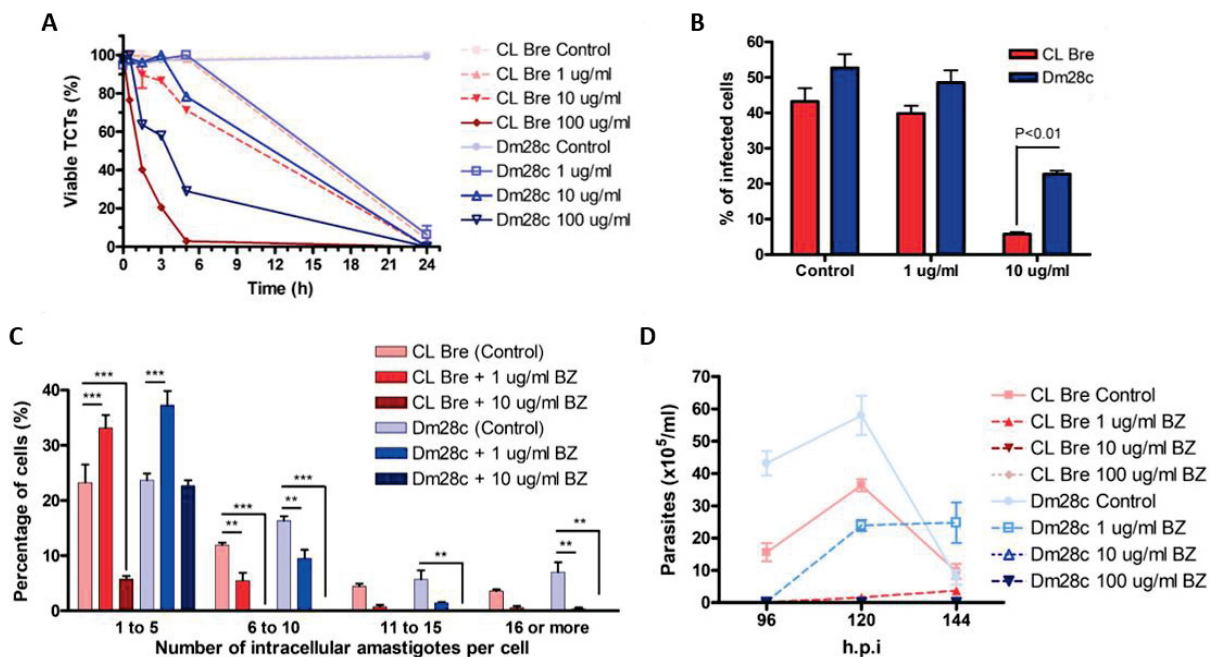
Além de caracterizar o perfil de infectividade e liberação de VEs das cepas CL Brener e Dm28c, decidimos também avaliar se VEs poderiam estar associadas a resistência ao benzonidazol. Para isso, iniciamos avaliando a ação do BZ sobre os parasitos na sua forma circulante/extracelular.  $5 \times 10^5$  TCTs foram incubados com 3 concentrações de BZ (1, 10 e 100  $\mu\text{g/ml}$ ) e foi realizada a contagem dos TCTs viáveis após 0,5, 1,5 h, 3 h, 5 h e 24 h. Neste ensaio a cepa Dm28c se mostrou mais resistente em comparação à CL Brener (Fig. 37 A). Como o tratamento com BZ ocorre somente com a confirmação da infecção, nosso interesse foi avaliar o efeito da droga sobre células infectadas. Para isso, foram realizados dois experimentos

paralelamente: um experimento de invasão (Fig. 37 B-C) e outro de liberação de TCTs (Fig. 37 D) sobre células Vero. Para isso, a infecção foi realizada em MOI 5 ( $5 \times 10^4$  Vero +  $2,5 \times 10^5$  TCTs) por duas horas e após este período os parasitos remanescentes no sobrenadante foram retirados e foi adicionado o tratamento com BZ nas mesmas 3 concentrações (1, 10 e 100 ug/ml, diluídos em RPMI 5% SFB). O experimento de invasão é finalizado após 48 h de tratamento com a fixação das células e coloração com Giemsa e o de liberação é acompanhada a saída de TCTs das células contando o sobrenadante da infecção.

No experimento de invasão foi possível confirmar que a cepa Dm28c de fato é mais resistente que a cepa CL Brener, visto com uma diferença significativa no percentual de células infectadas na presença de 10 ug/ml de BZ (Fig. 37 B). Além disso, vê-se também um maior número de células com alto número de amastigotas na cepa Dm28c em comparação a CL Brener (Fig. 37 C). Imagens representativas deste experimento encontram-se na Figura 38.

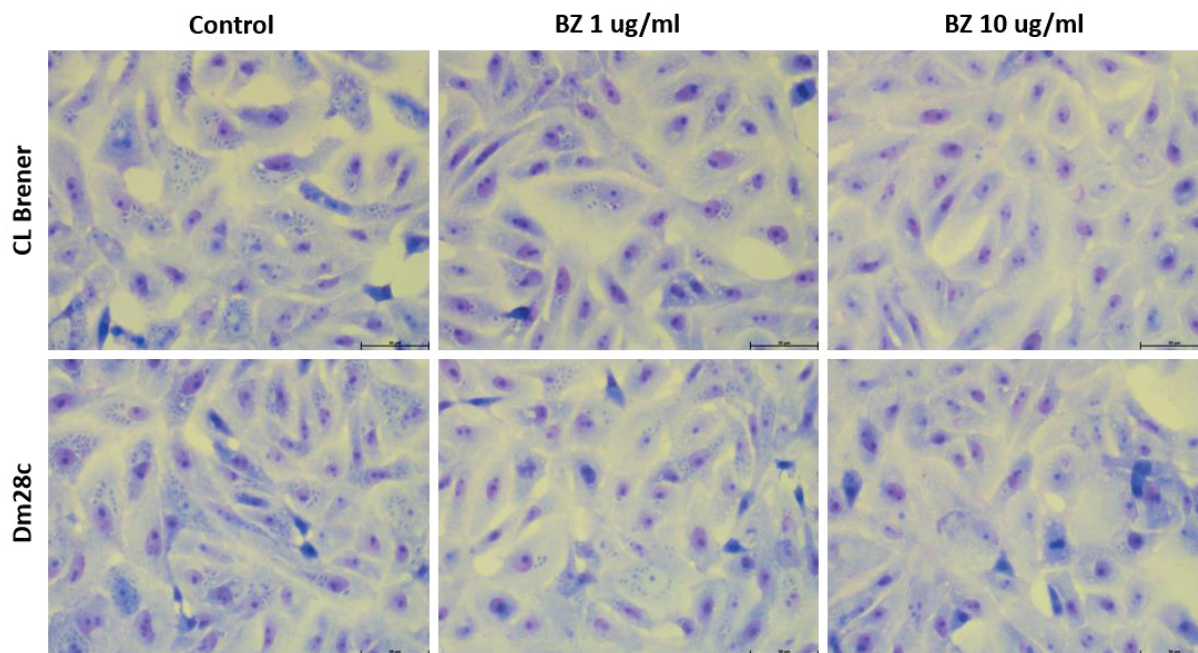
Esses dados foram confirmados pelo experimento de liberação de TCTs, no qual houve maior liberação de TCTs de Dm28c do que CL Brener (Fig. 37 D) após exposição com BZ.

Figura 37. Ensaios de resistência das cepas CL Brener e Dm28c ao benzonidazol.



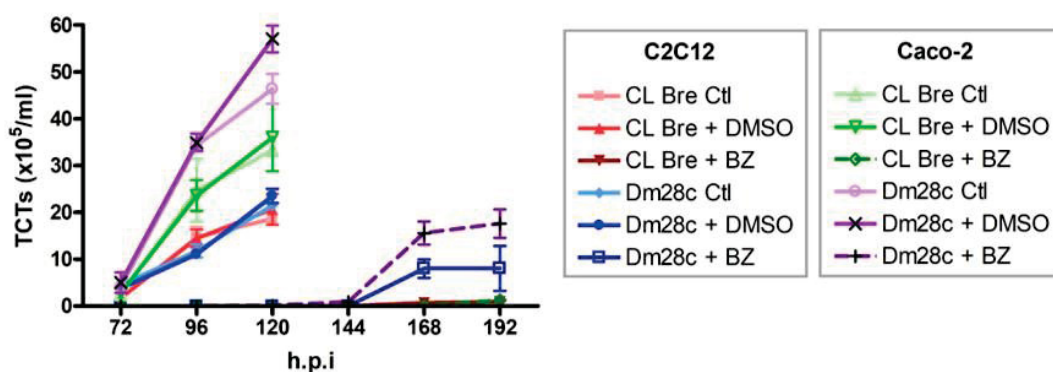
A) Contagem de TCTs viáveis após exposição ao BZ em diferentes tempos. B) Ensaio de invasão sobre células Vero com tratamento de BZ após 2 horas da infecção e fixação/coloração das células após 48 horas da infecção. C) Contagem de amastigotas intracelulares após tratamento com BZ. D) Ensaio de liberação de TCTs em Vero após tratamento com BZ.

Figura 38. Imagens de microscopia de células Vero infectadas com CL Brener ou Dm28c na presença de benzonidazol após 48 horas da infecção (coradas com Giemsa)



Para avaliarmos se este perfil de resistência se repetiria nas células utilizadas neste projeto, nós realizamos um ensaio de liberação de TCTs nas células C2C12 e Caco-2 utilizando as duas cepas e tratamento com BZ 2 µg/ml por 72 horas (Fig. 39). Neste experimento foi visto que o perfil de liberação de Dm28c continuou mais alto que CL Brener nas células controle (Ctl e DMSO 0,01%), sendo maior liberação em Caco-2 ao quinto dia de infecção, como já mostrando anteriormente. A liberação das condições tratadas com BZ aconteceu somente no 7º e 8º d.p.i, com maior liberação de Dm28c em ambas as células. Curiosamente, a liberação de TCTs das células Caco-2 com BZ foi mais alto que de C2C12.

Figura 39. Liberação de TCTs de CL Brener e Dm28c em células C2C12 e Caco-2 na presença ou ausência de BZ 2 µg/ml por 72 horas.

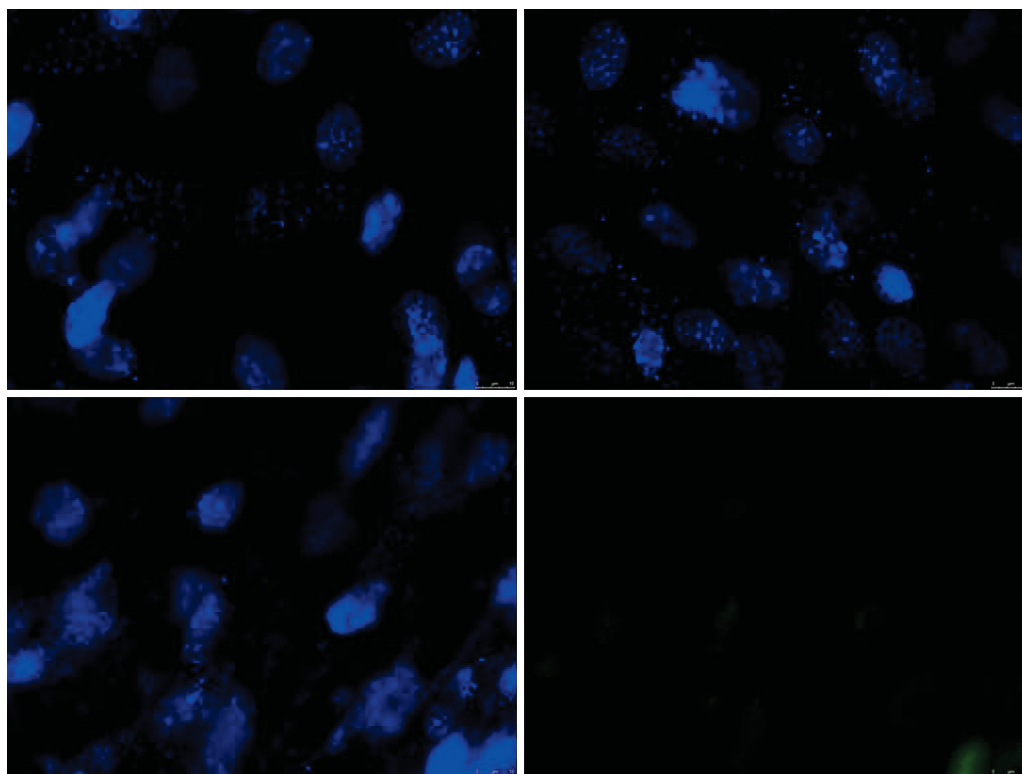


Recentemente, trabalhos tem registrado o fenômeno de dormência de *T. cruzi*, que poderia explicar a resistência dos parasitos ao tratamento (Resende et al, 2020 e Sánchez-Valdéz et al, 2018). Nos trabalhos foi visto a capacidade de parasitas se manter nas células infectadas por longos períodos sem se replicar. Para entender se as VEs teriam participam no processo de dormência dos parasitos nos diferentes tecidos e em sua resistência ao BZ, nós realizamos dois tipos de protocolos para verificação de parasitos pouco replicativos.

Foi avaliada a taxa de replicação dos parasitos em C2C12 e Caco-2 realizando a marcação fluorescente de TCTs por CFSE (cujá fluorescência se divide pela metade a cada replicação), seguida da infecção e análise dos amastigotas por citometria (Dumoulin and Burleigh, 2018). A análise dos parasitos após 48 h.p.i. e 66 h.p.i não forneceram dados consistentes de fluorescência dos amastigotas, não sendo possível averiguar o índice de replicação dos parasitos.

Para a avaliação de parasitos dormentes por microscopia, foi realizada a marcação dos parasitos TCTs com CFSE e infecção sobre C2C12 e Caco-2. Foi feita a análise dos parasitos positivos 72 h.p.i e 96 h.p.i (conforme Resende et al, 2020). Apesar de nossas tentativas, os resultados não foram promissores, provavelmente porque é a taxa de dormência é muito baixa (inferior a 5%, segundo Resende et al, 2020) e estávamos usamos um MOI de 5, enquanto o trabalho citado usa MOI 50 (Fig. 40).

Figura 40. Microscopia das células C2C12 (acima) e Caco (abaixo) infectadas por TCTs marcados com CFSE e fixadas após 72 horas e coradas com DAPI.



Uma terceira abordagem será avaliada usando o tratamento das infecções com Edu (análogo de timidina) que diferenciará amastigotas replicantes dos dormentes (Sánchez-Valdéz et al, 2018). A quantificação do percentual de dormência será avaliada na presença e ausência das VEs vindas de diferentes fontes.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1. Cepas de *T. cruzi* possuem diferentes perfis de virulência e mecanismos de infecção

Nossos testes iniciais de padronização de infecções para obtenção de formas tripomastigotas derivadas de cultivo (TCTs) utilizando formas metacíclicas (METAs) ou TCTs mostraram uma marcante diferença entre esses estágios infectivos de *T. cruzi*. METAs e TCTs expressam diferentes moléculas em suas superfícies, sendo que para as formas metacíclicas, as principais moléculas relacionadas a invasão são a gp82 e gp90, enquanto que para TCTs são Tc-85 e Trans-sialidases (Yoshida, 2006). Essas diferenças entre as formas infectivas refletem também nos mecanismos de infecção à células mamíferas utilizados por elas, já que alguns resultados indicam que a invasão de METAs é principalmente dependente de lisossomo enquanto a de TCT ocorre predominantemente por uma via lisossomo-independente (Cortez et al., 2016). Ensaios *in vivo* também demonstram uma diferença entre infecções com METAs e tripomastigotas circulantes: animais inoculados com METAs apresentaram 100% de sobrevivência, em contraste com aqueles injetados com formas sanguíneas, que apresentaram alta mortalidade e alta carga parasitária. Também são relatadas diferenças no recrutamento celular para o local da infecção e no estado de ativação das células apresentadoras de antígenos nos linfonodos drenantes e no baço durante a infecção aguda (Gutierrez et al, 2021). De Souza et al (2014) mostraram que cães infectados com tripomastigotas sanguíneos apresentaram maior parasitismo cardíaco e uma resposta imune diferente em relação aos cães infectados por METAs. Dias et al (2013) demonstraram que camundongos inoculados com tripomastigotas sanguíneos apresentaram níveis de parasitemia mais altas do que os infectados por METAs, tanto por via oral como intraperitoneal. Estes estudos ressaltam a complexidade dos trabalhos com *T. cruzi*, já que variações de cepas, de técnicas, rotas de infecção e das condições do inóculo influenciam o resultado da infecção.

Além da complexidade das infecções por diferentes estágios infectivos, soma-se ainda a ampla heterogeneidade das cepas de *T. cruzi* (Deveras, Fernandes e Coura et al, 2003; Santi-Rocca et al, 2017). As diferenças entre os dois estágios infectivos pode estar determinado pela rota que segue cada parasita no organismo.

Metacíclicos precisam resistir ao complemento e imunidade inata e invadir para produzir a infecção, em uma relação transiente. Diferentemente, tripomastigotas sanguíneos ou derivados de cultura precisam permanecer e persistir no organismo superando as barreiras da imunidade adaptativa.

Nossos resultados mostraram uma diferença no perfil de infectividade das cepas CL Brener e Dm28c. Uma ampla variedade de cepas possuem diferentes perfis de infectividade *in vitro* (Duran-Rehbein et al, 2014) e *in vivo* (Dias et al, 2013). Essas diferenças se refletem também na ativação do sistema imune por distintas cepas (Espinoza et al, 2009, Magalhães et al, 2015). Além disso, a co-infecção por duas cepas pode mudar o perfil da infecção: por exemplo, camundongos BALB/c infectados com a cepa JG normalmente tem baixa parasitemia e morte e com a cepa CL Brener possuem alta parasitemia e mortalidade, porém, quando os animais recebem simultaneamente as duas cepas, ocorre uma parasitemia e mortalidade intermediários (Rodrigues et al, 2010).

Um fato interessante a ressaltar e que torna complexo a análise do perfil de virulência das cepas é que além da diferença de infectividade entre as cepas, ainda não se sabe que mecanismos determinam a mudança de perfil de invasividade entre os estágios. Tomando em consideração as cepas CL Brener e Dm28c, comparativamente a CL Brener é mais infectiva nas formas metacíclicas e menos nos TCT e vice-versa para Dm28c, os quais são menos infectivos nas formas metacíclicas e passam a ser mais infectivos como TCTs. Essa mudança de infectividade entre os estágios já foi relatado em outros trabalhos que mostram que as cepas G e Tulahuén são mais infectivas no estágio de amastigota extracelular do que as cepas Y e CL, porém isso se inverte nas formas metacíclicas (Fernandes et al, 2013; Ferreira et al, 2012)

O processo de invasão de *T. cruzi* à células mamíferas tem sido bastante explorado, porém ainda não se sabe bem quais são os sinais que orquestrariam a replicação de *T. cruzi* no interior das células. O trabalho de Manque et al (2011) avalia quais genes dos hospedeiros são modulados após a infecção com *T. cruzi*. Eles utilizam cardiomiócitos primários murinos em diferentes momentos da infecção por *T. cruzi* (fase inicial – até 6 h.p.i, intermediárias - 12 h.p.i, e tardia - 24 e 48 h.p.i). Foram identificados 353 genes do hospedeiro diferencialmente expressos durante

ao menos uma das três fases da infecção, sendo 111 upregulados e 242 downregulados. O número total de genes diferencialmente expressos aumenta durante a infecção, com um pico no estágio tardio (24 e 48 h.p.i). Genes associados à resposta imune, inflamação, organização do citoesqueleto, interações célula-célula e célula-matriz, apoptose, ciclo celular e estresse oxidativo estão entre os afetados durante a infecção. Destaca-se que diversos genes relacionados a recrutamento de células imunes, sinalização de interferon e mediadores inflamatórios foram upregulados pela infecção.

Belew et al (2021) compararam o comportamento de dinâmica intracelular de duas cepas que apresentam diferenças marcantes na virulência (CL Brener e CL-14) (Belew et al., 2017). Foram realizadas infecções de TCTs à fibroblastos humanos (HFF) e monitoradas por vários dias após a infecção. O percentual de células infectadas foi similar entre as duas cepas, porém houve diferença no número de amastigotas intracelulares ao longo do tempo, mostrando uma taxa de crescimento/replicação de amastigotas maior em CL Brener. Como consequência do crescimento mais lento de amastigotas de CL-14, houve a liberação de menor quantidade de tripomastigotas a partir das células infectadas que ainda ocorreu de forma mais tardia (entre 7 a 9 d.p.i, comparada ao pico de 5 a 7 d.p.i para CL Brener). Uma análise comparativa do transcriptoma das duas cepas em diferentes momentos do ciclo intracelular (60 e 96 h.p.i) sugerem que o fenótipo mais avirulento da cepa CL-14 pode ser explicado, ao menos em parte, por uma menor e mais tardia expressão de genes de superfícies associados com a transição de amastigotas para tripomastigotas, um passo fundamental para a continuidade da infecção (Belew et al., 2017).

Resende et al (2020) compara o perfil de infectividade e dinâmica intracelular de 4 cepas diferentes, sendo duas delas as usadas no presente projeto (CL Brener e Dm28c). Os dados do estudo estão de acordo com os nossos, reforçando que os TCTs da cepa Dm28c são mais infectivos do que de CL Brener. Um dado interessante trazido pelo estudo é de que a cepa CL Brener apresenta mais parasitos dormentes em comparação a Dm28c, que seriam parasitos com baixa taxa de replicação (analisado por marcação com CFSE 96 h.p.i, que se dissipa nas gerações filhas, mas se mantém intensa nos parasitos que não se dividiram) (Resende et al., 2020). Dumoulin et al (2018) avaliaram o ciclo intracelular de *T.*

*cruzi* interessados em entender o nível de flexibilidade/maleabilidade/adaptação dos parasitos em resposta a restrições nutricionais (Dumoulin, 2018). Usando a cepa modificada geneticamente Tulahuén beta-galactosidase, infecções foram realizadas em células HFF e a taxa de divisão de amastigotas foi avaliada por marcação com CFSE e posterior leitura em citometria de fluxo. A restrição de glicose, glutamina ou soro fetal bovino levou a uma significativa redução da proliferação de amastigotas às 48 e 66 h.p.i (Dumoulin, 2018). Apesar desses relatos indicarem alta plasticidade e adaptação no ciclo intracelular de *T. cruzi*, ainda não se sabe se outros fatores (como as VEs) poderiam modular a taxa de replicação de amastigotas e sua passagem para tripomastigotas.

Cruz et al (2012) mostraram que a expressão ectópica de  $\delta$ -amastin (uma glicoproteína de superfície abundantemente expressa na forma amastigota) por parasitos acelerou a diferenciação de amastigotas em tripomastigotas, indicando que a amastina é uma das moléculas capazes de modular o ciclo intracelular de *T. cruzi*.

Assim, o presente trabalho tenta responder algumas perguntas que estão em aberto e que seguirão sendo exploradas:

- As VEs poderiam modular a replicação de *T. cruzi* no interior das células hospedeiras?

- VEs de uma cepa mais infectiva e mais replicativa poderia alterar as infecções de outra cepa menos replicativa?

- VEs de formas tripomastigotas de cultura atuaria de forma cepa-específica, como as VEs de tripomastigotas metacíclicos? Nosso grupo mostrou que VEs de metacíclicos agiam de maneira cepa-específica nos fenômenos de invasão e resistência ao sistema complemento (Wyllie e Ramirez, 2017). Porém, Ribeiro et al (2018) demonstraram que VEs derivadas de TCTs de uma cepa podem afetar a taxa de infectividade de outra cepa de *T. cruzi* (Ribeiro et al., 2018). É importante evidenciar que esta diferença também poderia vir do fato de que um trabalho utiliza VEs de interação com THP-1 e outro somente VEs de TCTs isolados, porém esta questão necessita de comprovações. Os resultados obtidos nesta tese indicam que VEs de Dm28c em contato com Caco-2 promovem aumento da infecção de CL

Brener, o que seria um indicativo de ausência de cepa especificidade, porém ainda nos resta saber qual a influência da célula hospedeira neste processo.

- As VEs atuam sobre o parasito, tornando-o mais infectivo ou sobre as células, tornando-as mais permissivas?

5.2. *T. cruzi* interage diferentemente com células de mioblasto e de epitélio intestinal, tanto na infecção, replicação como liberação de VEs

No intuito de entender a interação dos parasitos com diferentes tecidos, nós utilizamos células de mioblasto e epitélio intestinal para simular ambientes encontrados por *T. cruzi* no hospedeiro. Nossos resultados mostraram que células intestinais tiveram maior taxa de liberação de TCTs em comparação a mioblastos. Também vimos que as VEs vindas das células C2C12 e Caco-2 carregam diferentes proteínas e que somente VEs vindas da interação com Caco-2 foram capazes de aumentar a infecção do parasito.

O tropismo de *T. cruzi* por determinados tecidos do hospedeiro tem sido alvo de investigações por muito tempo, já que o perfil de órgãos afetados tem relação com a manifestação clínica da patologia (como cardiomiopatia e distúrbios gastrointestinais). Sabe-se que tripomastigotas metacíclicos inoculados em animais geralmente infectam células locais (como fibroblastos e macrófagos) para então se disseminarem pelo sangue e alcançarem outros tecidos distantes (Monteon et al., 1996). É possível hipotetizar que o parasito possui tropismo tecidual intrínseco, já que a Doença de Chagas apresenta perfis clínicos comuns em determinados locais geográficos (Macedo et al., 2004) e clones geneticamente distintos podem ser isolados de pacientes com doença cardíaca ou gastrointestinal primária (Vago et al, 2000). Vago et al, 2000 usaram a técnica de LSSP-PCR (low-stringency single-specific primer–polymerase chain reaction) para identificar o perfil dos parasitos presentes no coração de 13 pacientes com cardiopatia chagásica e no esôfago de quatro pacientes (três deles com megaesôfago chagásico). Devido ao polimorfismo intraespecífico da sequência cinetoplasto-ácido desoxirribonucléico (kDNA) de *T. cruzi*, essa técnica permite identificar “assinaturas individuais” de kDNA em populações parasitárias. Interessantemente, dois dos 15 pacientes possuíam envolvimento cardíaco e esofágico e, em ambos, as assinaturas de kDNA obtidas do

coração e do esôfago do mesmo paciente eram diferentes. Isso sugere que exista uma distribuição tecidual diferencial de populações geneticamente diversas de *T. cruzi*, reforçando que a variabilidade genética do parasita é um dos fatores determinantes da forma clínica da doença.

Evidências adicionais para o tropismo tecidual vem dos resultados da infecção experimental de *T. cruzi*, apontando para a variedade de órgãos infectados conforme a cepa. Vera-Cruz et al (2003) avaliaram o tropismo do parasito *in vivo* utilizando a cepa JALGO em animais Balb/c. O músculo esquelético e o coração apresentaram a maior intensidade de produtos amplificados por PCR, sugerindo a presença de grande número de parasitas. Esses resultados foram confirmados pela análise histológica para a presença de aglomerados de amastigotas. Embora os parasitas estivessem presentes em outros órgãos analisados (como rim, fígado, baço e intestino), eles estavam principalmente localizados dentro de macrófagos e nenhum dano tecidual extenso foi observado em comparação com o coração e o músculo esquelético.

Rojo et al (2020) detectaram a presença de DNA de *T. cruzi* em órgãos do roedor *Octodon degus* naturalmente infectados. De 19 animais analisados, os órgãos com maior prevalência de parasitos foram esôfago (11 animais), pele (10 animais), músculo esquelético (9 animais), cérebro (8 animais), intestino (8 animais), coração (7 animais) e pulmão (7 animais). A DTU V foi a mais presente nas amostras (92,5% dos órgãos analisados), sendo esta DTU frequentemente reportadas em infecções humanas no cone sul da América do Sul, onde os animais foram capturados (Região de Coquimbo – Chile, área endêmica da Doença de Chagas no país).

Um estudo sistemático da distribuição de parasitas intracelulares nos órgãos de camundongos inoculados com 4 cepas diferentes de *T. cruzi* mostra um alto parasitismo no baço, fígado e medula óssea nos grupos inoculados com as cepas Y e Berenice, e, no entanto, era quase ausente nos inoculados com a cepa CL. O parasitismo do músculo liso foi significativamente maior com as cepas ABC e Berenice do que com Y e CL (Melo e Brener, 1978).

Essa predileção de algumas cepas por determinados tecidos parece se manter tanto em infecções “puras” ou com mistura de cepas, sugerindo que a variabilidade das cepas de *T. cruzi* refletem nos tecidos afetados e conseqüentemente nas manifestações da doença (Andrade et al, 1999). Apesar da

cepa JG ter sido encontrada principalmente nos corações dos animais infectados com uma mistura das cepas JG e Col1.7G2 (Andrade et al, 1999), quando se avaliou a eficiência da invasão celular em culturas primárias de cardiomiócitos, viu-se que os parasitas Col1.7G2 invadiram as culturas de células cardíacas em maior número do que os parasitas JG, ao contrário do que seria esperado. No entanto, a multiplicação intracelular dos parasitas JG foi mais eficiente do que a dos parasitas Col1.7G2, tanto em infecções “puras” quanto mistas (JG + Col1.7G2), sendo este fenômeno observado apenas em cardiomiócitos e não em células Vero. Esses resultados indicam que, embora a invasão possa influenciar a preferência por dado tecido, o desenvolvimento intracelular tem grande importância na determinação do tropismo parasitário (Andrade et al, 2010).

O estudo de Franco et al (2003) também avalia a infecção mista de *T. cruzi* em camundongos, porém utilizando duas cepas que possuem virulência distintas: o clone CL-Brener, que causou alta mortalidade, miocardite aguda grave e miosite que regrediu completamente nos animais sobreviventes; e a cepa JG, que causou mortalidade nula, miocardite aguda predominantemente focal, miosite discreta e focal e uma fase crônica com focos inflamatórios esparsos. A dupla infecção tornou a mortalidade muito baixa e ao final da fase aguda, o coração exibiu apenas o kDNA da cepa JG, enquanto os músculos esqueléticos e o reto exibiram apenas o kDNA de CL-Brener. Com uma inoculação de  $1 \times 10^4$  tripomastigotas de cada cepa simultaneamente, a cepa JG predomina no coração e reto, enquanto a CL Brener em esôfago e músculos esqueléticos. Já na inoculação com  $1 \times 10^3$  parasitos, JG aparece como cepa predominante em todos os órgãos analisados (coração, reto, esôfago e músculo). Essa diferença entre a quantidade de parasitos utilizados na infecção traz ainda mais complexidade para o modelo.

Além dessa preferência de cepas de *T. cruzi* por alojar-se em determinados órgãos, não se pode descartar a influência do background genético do hospedeiro. Andrade et al (2002) comparou a infecção de quatro linhagens de camundongos (BALB/c, DBA-2, c57Black/6 e Swiss) pelas cepas Col1.7G2 e JG. A distribuição tecidual dos parasitos foi idêntica para camundongos BALB/c e DBA-2, mas diferente em camundongos C57BL/6 e Swiss. Como BALB/c e DBA-2 têm o mesmo haplótipo H-2 (H-2(d)) e C57BL/6 não (H-2(b)), é possível que a variabilidade do MHC esteja envolvida na distribuição tecidual do parasito nos hospedeiros.

Apesar de muitos trabalhos identificarem a distribuição dos parasitos nos tecidos *in vivo*, é ainda difícil elucidar os mecanismos pelos quais os parasitos se instalam em determinados órgãos. O estudo de Tonelli et al (2010) mostra que o tropismo cardíaco parece ser influenciado por um motivo de um peptídeo conservado em gp85/trans-sialidasas, que interage com o endotélio vascular com maior afinidade/avidez pela vasculatura cardíaca do que de outros órgãos.

5.3 VEs poderiam participar da escolha dos reservatórios de *T. cruzi* e da manutenção da infecção crônica no hospedeiro

Uma série de trabalhos do grupo do Dr. John Kelly (LSHTM - UK) cercam a questão da localização de *T. cruzi* durante a Doença de Chagas (Lewis et al, 2016; Ward et al, 2020; Ward et al, 2020; Taylor et al, 2020; Khan et al, 2021; Ward et al, 2022). O grupo desenvolveu um modelo experimental murinho com infecções de *T. cruzi* geneticamente modificado que expressam uma proteína de fusão bioluminescente/fluorescente, permitindo acompanhar infecções crônicas em tempo real por períodos superiores a um ano. Neste sistema, foi mostrado que a infecção por *T. cruzi* é pantrópica durante o estágio agudo, no entanto, com a evolução para a fase crônica, os parasitos encontram-se restritos principalmente ao trato gastrointestinal, com outros órgãos/tecidos infectados apenas esporadicamente. Foi mostrado que os parasitos se encontram frequentemente localizados em células musculares lisas na camada muscular circular do cólon e que as células musculares esqueléticas e a pele também podem ser importantes reservatórios de *T. cruzi* (Ward et al, 2020). Essa restrição a determinados tecidos tem participação do sistema imune, já que animais infectados cronicamente (com os parasitos alocados já em tecidos restritos) voltam a ter os parasitos por todos os órgãos após imunossupressão com ciclofosfamida, que causa supressão de linfócitos (Lewis et al, 2016). o que sugere que a resposta imune é capaz de controlar a infecção na maioria dos órgãos e que possivelmente o parasito se restringe a um órgão imunologicamente privilegiado para se manter (Lewis et al, 2010).

Interessantemente, usando o mesmo modelo, foi visto que os parasitos residentes do cólon dos animais durante a fase crônica possuem uma taxa reduzida de replicação. Apesar disso, poucas células hospedeiras sobreviveram à infecção por mais de 14 dias, sugerindo que a persistência de *T. cruzi* envolve ciclos

regulares de lise da célula infectada e reinfecção de outras células. Além disso, não foi encontrada evidências de dormência generalizada em parasitas que persistem nesse reservatório tecidual (Ward et al, 2020). O mesmo grupo mostrou que a replicação intracelular de *T. cruzi* é um processo assíncrono, independentemente da localização do tecido ou do estágio da doença. Usando ensaios de TUNEL e marcação com EdU (análogo de timidina que indica os parasitos replicantes), foi demonstrado que amastigotas replicantes e tripomastigotas não replicantes podem coexistir na mesma célula (Taylor et al, 2020). Infelizmente, nossas tentativas de avaliar o nível de dormência e o estado replicativo dos parasitos ainda não deram resultados detectáveis, talvez pelo método usado (CFSE) ou por representar um evento pouco expressivo/frequente, o que poderia estar abaixo do limite de sensibilidade. Será interessante observar por outras metodologias (como incorporação de EdU) se as VEs de uma célula podem induzir maior dormência em outra. O trabalho de Resende et al (2020) já nos indica que há uma diferença na taxa de amastigotas dormentes entre CL Brener e Dm28c (por volta de 4% e 0,2%, respectivamente). Além disso, nossos dados de que os parasitos são mais resistentes à morte pelo benzonidazol quando no interior de células intestinais abrem novas questões de este ser um potencial sítio de permanência e resistência dos parasitos durante o tratamento. Necessariamente tentaremos isolar os parasitas e submetê-los a diferentes rounds de infecção e resistência para estabelecer se os mecanismos para subsistir são dependentes do background genético do parasita ou uma condição de regulação na célula intestinal.

Nossos resultados mostraram que VEs vindas da interação de Dm28c com Caco-2 foram capazes de aumentar o número de células com 4-6 amastigotas em seu interior, porém ainda não entendemos se trata-se de um aumento da replicação dos parasitos ou de uma maior poli-infecção. O trabalho de Cestari et al. (2013) mostra que o tratamento com VEs levou a um aumento de células poli-infectadas por tripomastigotas metacíclicos em um mecanismo de entrada independente de lisossomos. Moreira et al (2019) também mostra que VEs aumentaram o parasitismo de células Vero, possivelmente porque levam a alterações na permeabilidade celular e aumento dos níveis intracelulares de  $Ca^{2+}$ , que podem alterar a dinâmica do citoesqueleto de actina facilitando a invasão de *T. cruzi*. Cornet-Gomez et al, 2023 realizou uma análise transcriptômica de células estimuladas com VEs de *T. cruzi* e mostraram que 322 genes estavam diferencialmente expressos (168 upregulados e

154 downregulados). Os autores sugerem que as VEs desempenham um papel protetor sobre a apoptose. Resulta interessante questionar se o efeito da maior infecção pode ser propiciado por uma interação das VEs na superfície parasitária ou uma alteração na célula hospedeira. Ensaio de coinfeção com diferentes cepas ou com outros parasitos intracelulares poderão entregar evidências para entender os mecanismos envolvidos no aumento de infectividade dependente de VEs.

O experimento *in vivo* iniciado neste trabalho no qual VEs de células C2C12 e Caco-2 foram inoculadas em camundongos juntamente com parasitos trará novos aspectos do efeito das VEs durante a infecção. Até o momento, os resultados indicam uma tendência de que as VEs possuem um papel pró-parasítico, pelo aumento da parasitemia, redução do peso e algumas alterações em volume/tamanho dos órgãos. Com as análises que estão em andamento pretendemos avaliar se VEs vindas da interação com uma célula aumentará a carga parasitária de determinados órgãos, fundamental para entender e sustentar a hipótese de um possível tropismo na fase crônica e que explicaria as alterações da arquitetura intestinal.

Todos os elementos aqui relatados mostram que o ciclo de vida intracelular do *T. cruzi* é mais complexo do que se pensava anteriormente e que muitas questões permanecem em aberto dentro destes temas:

- VEs poderiam participar da escolha de *T. cruzi* por determinados tecidos, preparando nichos para a infecção do parasito?
- Como VEs de um tecido infectado afetam os demais tecidos?
- VEs podem afetar ou induzir dormência nos parasitos?

#### 5.4 Análise proteômica mostra um fluxo intenso de membranas de parasitas e de células hospedeiras durante a interação

Nossos resultados de proteômica mostraram que as VEs vindas das células C2C12 e Caco-2 possuem diferentes componentes, e que a interação com parasitos influencia a composição das VEs. O trabalho de Ramirez et al (2017) mostra que a interação de metacíclicos e TCTs com THP-1 (por 1 hora) contribuem com proteínas na formação de VEs, sendo que 25% (metacíclicos) e 12% (TCTs) das proteínas encontradas nas VEs nessas condições são de *T. cruzi*, enquanto que apenas 5% das proteínas são parasitárias na interação com epimastigotas. Nos nossos resultados, o percentual de proteínas parasitárias encontradas nas VEs varia de

aproximadamente 20% a 40%, número que pode ser maior devido ao maior tempo de interação (2h). Em número brutos, nossos dados mostram 30 a 50 proteínas encontradas nas VEs controle (C2C12 e Caco-2), o que se encontra similar ao reportado por Ramirez et al, 2017 (54 proteínas de THP-1 na ausência de parasitos). Do mesmo modo que em nossos resultados, o número de proteínas totais aumenta com a interação com TCTs, nos quais passam de 54 proteínas no controle (THP-1 sem interação) para 91 e 110 proteínas com metacíclicos e TCTs, respectivamente. As principais categorias às quais as proteínas encontradas nas VEs estavam relacionadas eram regulação, processos celulares, resposta a estímulos e interação com células e organismos.

O trabalho de Bautista-López et al (2017) caracterizou VEs secretadas a partir de células Vero infectadas com *T. cruzi*, e mostrou que apenas 10% das proteínas totais eram de origem parasitária. O grupo de proteínas de *T. cruzi* mais abundantes nas VEs eram da família das trans-sialidases, o que também foi encontrado em outro trabalho que avaliou VEs vindas de parasitos isolados (Ribeiro et al, 2018), porém estas proteínas foram pouco representativas nos nossos dados. Essa diferença provavelmente se dá porque o estudo avalia VEs vindas de células no 4º dia após infecção (onde os parasitos já se replicaram e se diferenciaram para tripomastigotas, que expressam altos níveis de trans-sialidases), enquanto os nossos dados foram obtidos em até 24 horas após a infecção, momento em que os parasitos estão apenas iniciando sua replicação como amastigotas.

Cronenberger-Andrade et al (2020) avalia a secreção de VEs a partir de macrófagos (THP-1) infectados por *T. cruzi*. Um total de 123 proteínas foram encontradas em VEs de THP1 não infectadas e 89 foram encontradas nas VEs de células infectadas, de um total de 154 proteínas em ambas as amostras. As proteínas de *T. cruzi* encontradas nas VEs de THP-1 infectadas foram 6: HSP60, triparedoxina peroxidase, trans-sialidase Grupo II, proteína flagelar de ligação ao cálcio, proteína de superfície ToIT e proteína paraflagelar bastonete 2. A maioria das proteínas encontradas nas VEs estão envolvidas em processos de ligação, imunológicos e metabólicos com base em anotações de termo GO.

A análise proteômica das VEs nos indicou que VEs derivadas de Caco-2 carregam uma variedade de proteínas relacionadas a adesão, então nós levantamos a hipótese de que talvez essas VEs poderiam interagir com a matriz celular para facilitar a invasão dos parasitos. Alguns trabalhos já mostram que as VEs são

componentes integrantes da matriz (Debnath et al, 2023; Rilla et al, 2019), porém o assunto ainda é pouco explorado em doenças infecciosas. Para entender a relação das VEs vindas de diferentes linhagens sobre a invasão de *T. cruzi*, planejamos realizar protocolos de decelularização de matriz utilizando as células C2C12 e Caco-2 de modo a manter a composição e estrutura original da matriz nestas células. Então, avaliaríamos a capacidade de ligação e degradação das VEs com componentes da matriz.

### 5.5 VEs participam da modulação do sistema imune diferencialmente entre os estágios

Em diferentes modelos, foi demonstrado que as VEs tem um potencial de interação com o sistema imune, seja pela possibilidade de apresentação direta de antígenos por MHC classe II à células T ou por carregarem antígenos para células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas (CDs) (Robbins e Morelli, 2015). Nossos resultados mostraram que as VEs foram capazes de aumentar a expressão de MHC II e CD86 em níveis similares ao LPS após 24 horas de incubação, embora não de forma significativa. Também vale ressaltar que a ativação desencadeada por VEs foi mais alta quando comparada à exposição aos TCTs vivos, que parecem evitar a resposta das CDs. Além disso, as VEs foram capazes de induzir a secreção de IL-10 e TNF-alfa, porém será necessário validar estes dados. É interessante notar também que as VEs usadas nestes experimentos vem do contato de células Vero com TCTs e que diferentes células podem ter diferentes papéis na ativação de células imunes.

Vários trabalhos demonstram a capacidade de protozoários liberarem VEs que interagem fortemente com células hospedeiras resultando na modulação da resposta imune do hospedeiro (Campos et al., 2015; Marcilla et al., 2014; Torrecilhas, 2012, Buzas, 2023). Eritrócitos infectados por *Plasmodium* spp. liberam VEs contendo múltiplas proteínas hospedeiras e parasitárias, em particular de antígenos parasitários e proteínas envolvidas na invasão dos parasitos às células. Essas VEs demonstraram propriedades imunomoduladoras em macrófagos primários humanos e neutrófilos (Mantel et al., 2013). Martin-Jaular e colaboradores (2011) imunizaram camundongos com exossomos produzidos por reticulócitos infectados (exPy) e não infectados (exC) por *P. yoelii*, e os animais que receberam

exPy produziram anticorpos IgG, que reconheceram especificamente eritrócitos infectados por *P. yoelii* (Martin-Jaular et al., 2011). Este trabalho demonstrou que a imunização de camundongos com exPy foi capaz de induzir uma resposta específica contra à infecção pelo parasito, mostrando um potencial de atuação das VEs como uma vacina. Foi demonstrado também que vesículas derivadas de eritrócitos infectados por *Plasmodium falciparum* são capazes de ativar citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-12, IL-1b, assim como a citocina anti-inflamatória IL-10 (Mantel et al., 2013).

No contexto da Doença de Chagas, os eventos iniciais da infecção por *T. cruzi* são cruciais para o estabelecimento da doença e muitos grupos tem avaliado o papel das VEs sobre o sistema imune inato. Foi demonstrado que VEs derivadas do contato de células THP-1 com *T. cruzi* são capazes de inibir a C3 convertase, protegendo o parasita contra o ataque do sistema complemento (Cestari et al, 2013; Wyllie et al, 2017).

Como os macrófagos e outras células mononucleares estão entre a primeira linha de defesa do hospedeiro, vários grupos de pesquisa têm focado no estudo das VEs sobre essas células. Foi observado que os EVs liberados por várias cepas de *T. cruzi* (Y, Colombiana, CL-14 e YuYu) e por células THP-1 infectadas modulam a resposta inflamatória de macrófagos via-TLR2, desencadeando uma resposta pró-inflamatória mediada por TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-6 e NO (Nogueira et al, 2015; Cronemberger-Andrade et al, 2020). Outros estudos mostraram que vesículas isoladas do plasma de pacientes com Doença de Chagas e camundongos infectados experimentalmente também desencadearam a síntese de citocinas pró-inflamatórias e produtos oxidativos e nitrosativos sobre macrófagos (Chowdhury et al, 2017). Um dos fatores responsáveis pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias parece ser a presença de DNA oxidado nas VEs, que é reconhecido por sensores de DNA citosólico e ativa NF- $\kappa$ B. DNA oxidado foi detectado em EVs secretadas por macrófagos infectados e em EVs do plasma de camundongos cronicamente infectados. Curiosamente, a inibição de PARP1 diminuiu a resposta pró-inflamatória geral e a inflamação cardíaca de camundongos cronicamente infectados, sugerindo que os inibidores químicos dessa enzima poderiam se tornar potenciais alvos terapêuticos para DC (Choudhuri e Garg, 2020). No entanto, outros estudos mostraram que macrófagos derivados da medula óssea tratados com EVs derivados

do *T. cruzi* (cepa Y) induziram a formação de corpos lipídicos e prostaglandina E2 (PGE2) antes da infecção. Vinte e quatro horas após a infecção por *T. cruzi*, esses macrófagos tratados com VEs diminuíram a produção de PGE2, TNF- $\alpha$  e IL-6, diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e produtos oxidativos e nitrosativos, o que favoreceu a infecção (Lovo-Martins et al, 2018). Alguns estudos *in vivo* reforçam este efeito pró-parasítico das VEs, nos quais animais tratados com VEs de *T. cruzi* antes da infecção apresentam aumento de parasitemia, carga parasitária no coração e inflamação (Troccoli-Torrecilhas et al, 2009; Lovo-Martins et al, 2018; Cestari et al, 2012).

Nogueira et al (2015) estudaram o efeito de VEs secretadas por diferentes cepas de *T. cruzi* (Y, Colombiana, CL-14 e YuYu) sobre esplenócitos de camundongos cronicamente infectados. Curiosamente, as respostas imunomodulatórias causadas pelas VEs foram cepa-dependentes, sendo VEs vindas da cepa Colombiana mais pró-inflamatórias, porém, a modulação foi independente da cepa de *T. cruzi* usada na infecção do animal. Os esplenócitos produziram NO, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IFN- $\gamma$  após estimulação com EVs do parasita.

Além dos macrófagos, as células dendríticas são peças-chave no estímulo da resposta imune contra patógenos. *T. cruzi* diminui a imunogenicidade das DCs *in vitro* e *in vivo*. Gutierrez et al (2022) mostraram que VEs da interação entre tripomastigotas sanguíneos e DCs derivadas da medula óssea conferiram proteção parcial em animais desafiados com infecção letal por *T. cruzi*. Estes resultados, juntamente a relatos em outros patógenos como *Toxoplasma gondii* (Aline et al., 2004; Jung et al., 2020), *Eimeria* spp. (del Cacho et al., 2012) e *Leishmania major* (Schnitzer et al., 2010) colocam as VEs de CDs como promissores agentes terapêuticos contra a doenças infecciosas.

Nossos resultados também dão indícios iniciais de que as VEs de *T. cruzi* com células Vero podem modular a resposta de CDs. Em *Leishmania* sp. foi visto que VEs derivadas do parasito levaram a um perfil inibitório na liberação de citocinas de CDs, sendo que as VEs inibiram a produção de IL-12p70 e IL-10. Além disso, foi observado que não ocorreu o aumento da expressão dos marcadores HLA-DR, CD80, CD86 na superfície das CDs imaturas quando incubadas com exossomos.

Entretanto, CDs maduras pré-tratadas com exossomos apresentaram uma modesta redução na expressão de HLA-DR, CD80, CD86 (Silverman et al., 2010).

Neste trabalho, mostramos a modulação de CDs a partir da interação de *T. cruzi* com Vero e planejamos realizar experimentos com macrófagos. Assim, algumas questões, como se VEs vindas de células C2C12 e de Caco-2 teriam diferentes capacidades de ativação de CDs e macrófagos, permanecem em aberto. Além disso, o experimento *in vivo* no qual os animais receberam VEs de C2C12 e Caco-2 no momento da infecção também mostrará o perfil de citocinas presentes no soro e no cólon dos animais, trazendo um novo olhar sobre o papel das VEs na modulação imune.

## CONCLUSÕES

- As cepas CL Brener e Dm28c de *T. cruzi* possuem perfis diferentes de infectividade e replicação
- A interação de *T. cruzi* com células hospedeiras induz a liberação de VEs, sendo majoritariamente VEs maiores (principalmente microvesículas).
- *T. cruzi* interage diferentemente com células de mioblasto e de epitélio intestinal, com maior taxa de liberação de TCTs em células intestinais.
- VEs vindas de mioblastos e células intestinais carregam diferentes conjuntos de proteínas e desempenham diferentes efeitos na modulação da infecção de *T. cruzi*, porém o efeito de VEs sobre o tropismo do parasito *in vivo* ainda está sob avaliação.
- VEs participam da modulação do sistema imune do hospedeiro, porém não se sabe se VEs de diferentes fontes podem ter diferentes papéis imunomoduladores.

## REFERÊNCIAS

- Albertti, L.A.G., Macedo, A.M., Chiari, E., Andrews, N.W., Andrade, L.O., 2010. Role of host lysosomal associated membrane protein ( LAMP ) in *Trypanosoma cruzi* invasion and intracellular development. *Microbes Infect.* 12, 784–789. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.05.015>
- Aline, F., Bout, D., Amigorena, S., Roingard, P., & Dimier-Poisson, I. (2004). *Toxoplasma gondii* antigen-pulsed-dendritic cell-derived exosomes induce a protective immune response against *T. gondii* infection. *Infection and immunity*, 72(7), 4127-4137.
- Andrade, L. O., Galvão, L., Meirelles, M. D. N. S., Chiari, E., Pena, S. D., & Macedo, A. M. (2010). Differential tissue tropism of *Trypanosoma cruzi* strains: an in vitro study. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105, 834-837.
- Andrade, L. O., Machado, C. R., Chiari, E., Pena, S. D., & Macedo, A. M. (1999). Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Molecular and biochemical parasitology*, 100(2), 163-172.
- Andrade, L. O., Machado, C. R., Chiari, E., Pena, S. D., & Macedo, A. M. (2002). *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. *Experimental parasitology*, 100(4), 269–275. [https://doi.org/10.1016/s0014-4894\(02\)00024-3](https://doi.org/10.1016/s0014-4894(02)00024-3)
- Avila, J. L. (1992). Molecular mimicry between *Trypanosoma cruzi* and host nervous tissues. *Acta scientifica venezolana*, 43(6), 330-340.
- Bautista-lópez, N.L., Ndao, M., Camargo, V., 2017. crossm Characterization and Diagnostic Antigens Shed in Extracellular Vesicles Released from Infected Mammalian Cells 55, 744–758.
- 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. *J. Proteome Res.* 12, 883–897. <https://doi.org/10.1021/pr300947g>
- Bayer-Santos, E., Lima, F.M., Ruiz, J.C., Almeida, I.C., Da Silveira, J.F., 2014. Characterization of the small RNA content of *Trypanosoma cruzi* extracellular vesicles. *Mol. Biochem. Parasitol.* 193, 71–74. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.02.004>
- Belew, A.T., Junqueira, C., Rodrigues-Luiz, G.F., Valente, B.M., Oliveira, A.E.R., Polidoro, R.B., Zuccherato, L.W., Bartholomeu, D.C., Schenkman, S., Gazzinelli, R.T., Burleigh, B.A., El-Sayed, N.M., Teixeira, S.M.R., 2017. Comparative transcriptome profiling of virulent and non-virulent *Trypanosoma cruzi* underlines the role of surface proteins during infection. *PLoS Pathog.* 13, 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006767>

Bern, C. (2015). Chagas' disease. *New England Journal of Medicine*, 373(5), 456-466.

Bonney, K. M., & Engman, D. M. (2015). Autoimmune pathogenesis of Chagas heart disease: looking back, looking ahead. *The American journal of pathology*, 185(6), 1537-1547.

Bonney, K.M., 2014. Chagas disease in the 21st Century : a public health success or an emerging threat ? <https://doi.org/10.1051/parasite/2014012>

Bradwell, K.R., Koparde, V.N., Matveyev, A. V., Serrano, M.G., Alves, J.M.P., Parikh, H., Huang, B., Lee, V., Espinosa-Alvarez, O., Ortiz, P.A., Costa-Martins, A.G., Teixeira, M.M.G., Buck, G.A., 2018. Genomic comparison of *Trypanosoma conorhini* and *Trypanosoma rangeli* to *Trypanosoma cruzi* strains of high and low virulence. *BMC Genomics* 19, 1–20. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5112-0>

Buzas, E. I. (2023). The roles of extracellular vesicles in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 23(4), 236-250.

Campos, J.H., Soares, R.P., Ribeiro, K., Cronemberger Andrade, A., Batista, W.L., Torrecilhas, A.C., 2015. Extracellular Vesicles: Role in Inflammatory Responses and Potential Uses in Vaccination in Cancer and Infectious Diseases. *J. Immunol. Res.* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/832057>

Caradonna, K.L., Burleigh, B.A., 2011. Mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*, 1st ed, *Advances in Parasitology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385895-5.00002-5>

Cardoso, M.S., Reis-Cunha, J.L., Bartholomeu, D.C., 2016. Evasion of the immune response by *Trypanosoma cruzi* during acute infection. *Front. Immunol.* 6, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00659>

Cencig, S., Coltel, N., Truyens, C., & Carlier, Y. (2012). Evaluation of benznidazole treatment combined with nifurtimox, posaconazole or AmBisome® in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains. *International journal of antimicrobial agents*, 40(6), 527-532.

Cestari, I., Ansa-addo, E., Deolindo, P., Inal, M., Ramirez, M.I., Cestari, I., Ansa-addo, E., Deolindo, P., Inal, J.M., 2012. *Trypanosoma cruzi* Immune Evasion Mediated by Host Cell-Derived Microvesicles. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102053>

Cestari, I., Ramirez, M.I., 2010. Inefficient complement system clearance of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes enables resistant strains to invade eukaryotic cells. *PLoS One* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009721>

Choudhuri, S., & Garg, N. J. (2020). PARP1-cGAS-NF-κB pathway of proinflammatory macrophage activation by extracellular vesicles released during *Trypanosoma cruzi* infection and Chagas disease. *PLoS pathogens*, 16(4), e1008474.

Chowdhury, I.H., Koo, S.J., Gupta, S., Liang, L.Y., Bahar, B., Silla, L., Nuñez-Burgos, J., Barrientos, N., Zago, M.P., Garg, N.J., 2017. Gene Expression Profiling and Functional Characterization of Macrophages in Response to Circulatory Microparticles Produced during *Trypanosoma cruzi* Infection and Chagas Disease. *J. Innate Immun.* 9, 203–216. <https://doi.org/10.1159/000451055>

Cipriano, M.J., Hajduk, S.L., 2018. Drivers of persistent infection: Pathogen-induced extracellular vesicles. *Essays Biochem.* 62, 135–147. <https://doi.org/10.1042/EBC20170083>

Cocucci, E., Meldolesi, J., 2015. Ectosomes and exosomes: Shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends Cell Biol.* 25, 364–372. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.01.004>

Cornet-Gomez, A., Retana Moreira, L., Kronenberger, T., & Osuna, A. (2023). Extracellular vesicles of trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* induce changes in ubiquitin-related processes, cell-signaling pathways and apoptosis. *Scientific Reports*, 13(1), 7618.

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. <https://doi.org/10.1111/cmi.12548>

Cronemberger-Andrade, A., Xander, P., Soares, R. P., Pessoa, N. L., Campos, M. A., Ellis, C. C., ... & 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, 99.

Cruz, M. C., Souza-Melo, N., da Silva, C. V., DaRocha, W. D., Bahia, D., Araujo, P. R., ... & Mortara, R. A. (2012). *Trypanosoma cruzi*: role of  $\delta$ -amastin on extracellular amastigote cell invasion and differentiation. *PLoS One*, 7(12), e51804.

Cunha-Neto, E., Bilate, A. M., Hyland, K. V., Fonseca, S. G., Kalil, J., Engman, D. M., ... & Engman, D. M. (2006). Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. *Autoimmunity*, 39(1), 41-54.

de Souza, S. M., de Abreu Vieira, P. M., Roatt, B. M., Reis, L. E. S., da Silva Fonseca, K., Nogueira, N. C., ... & Carneiro, C. M. (2014). Dogs infected with the blood trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi* display an increase expression of cytokines and chemokines plus an intense cardiac parasitism during acute infection. *Molecular Immunology*, 58(1), 92-97.

Debnath, K., Las Heras, K., Rivera, A., Lenzini, S., & Shin, J. W. (2023). Extracellular vesicle–matrix interactions. *Nature Reviews Materials*, 8(6), 390-402.

del Cacho, E., Gallego, M., Lee, S. H., Lillehoj, H. S., Quilez, J., Lillehoj, E. P., & Sánchez-Acedo, C. (2012). Induction of protective immunity against *Eimeria tenella*, *Eimeria maxima*, and *Eimeria acervulina* infections using dendritic cell-derived exosomes. *Infection and Immunity*, 80(5), 1909-1916.

Devera, R., Fernandes, O., & Coura, J. R. (2003). Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98, 1-12.

Dias, G. B. M., Gruending, A. P., Araújo, S. M., Gomes, M. L., & de Ornelas Toledo, M. J. (2013). Evolution of infection in mice inoculated by the oral route with different developmental forms of *Trypanosoma cruzi* I and II. *Experimental parasitology*, 135(3), 511-517.

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., Hasslocher-Moreno, 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. <https://doi.org/10.5123/S1679-49742016000500002>

Domagalska, M.A., Dujardin, J.C., 2020. Next-Generation Molecular Surveillance of TriTryp Diseases. *Trends Parasitol.* 36, 356–367. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.01.008>

Dumoulin, P.C., 2018. Stress-Induced Proliferation and Cell Cycle Plasticity of 9, 1–15.

Duran-Rehbein, G.A., Vargas-Zambrano, J.C., Cuéllar, A., Puerta, C.J., Gonzalez, J.M., 2014. Mammalian cellular culture models of *Trypanosoma cruzi* infection: A review of the published literature. *Parasite* 21. <https://doi.org/10.1051/parasite/2014040>

Espinoza, B., Rico, T., Sosa, S., Oaxaca, E., Vizcaino-Castillo, A., Caballero, M. L., ... & Satoskar, A. R. (2009). Mexican *Trypanosoma cruzi* T. cruzi i strains with different degrees of virulence induce diverse humoral and cellular immune responses in a murine experimental infection model. *Journal of biomedicine and biotechnology*, 2010, 51.

Evans-Osses, I., De Messias-Reason, I., Ramirez, M.I., 2013. The emerging role of complement lectin pathway in trypanosomatids: Molecular bases in activation, genetic deficiencies, susceptibility to infection, and complement system-based therapeutics. *Sci. World J.* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/675898>

Fernandes, M. C., Flannery, A. R., Andrews, N., & Mortara, R. A. (2013). Extracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi* are potent inducers of phagocytosis in mammalian cells. *Cellular Microbiology*, 15(6), 977-991.

Fernandez-Calero, T., Garcia-silva, R., Pena, A., Robello, C., Persson, H., Rovira, C., Naya, H., Cayota, A., 2015. Molecular & Biochemical Parasitology Profiling of small RNA cargo of extracellular vesicles shed by *Trypanosoma cruzi* reveals a specific extracellular signature. *Mol. Biochem. Parasitol.* 199, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2015.03.003>

Ferreira, É. R., Bonfim-Melo, A., Mortara, R. A., & Bahia, D. (2012). *Trypanosoma cruzi* extracellular amastigotes and host cell signaling: more pieces to the puzzle. *Frontiers in Immunology*, 3, 363.

Franco, D. J., Vago, A. R., Chiari, E., Meira, F. C., Galvão, L. M., & Machado, C. R. (2003). *Trypanosoma cruzi*: mixture of two populations can modify virulence and tissue tropism in rat. *Experimental parasitology*, 104(1-2), 54-61.

French, K. C., Antonyak, M. A., & Cerione, R. A. (2017, July). Extracellular vesicle docking at the cellular port: Extracellular vesicle binding and uptake. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 67, pp. 48-55). Academic Press.

Garcia-Silva, M.R., Cabrera-Cabrera, F., Cura Das Neves, R.F., Souto-Padrón, T., De Souza, W., Cayota, A., 2014. Gene expression changes induced by *Trypanosoma cruzi* shed Microvesicles in mammalian host cells: Relevance of tRNA-derived halves. *Biomed Res. Int.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/305239>

Gaur, P., Chaturvedi, A., 2016. Mining SNPs in extracellular vesicular transcriptome of *Trypanosoma cruzi*: A step closer to early diagnosis of neglected Chagas disease. *PeerJ* 2016, 1–16. <https://doi.org/10.7717/peerj.2693>

Gutierrez, B. C., Ancarola, M. E., Volpato-Rossi, I., Marcilla, A., Ramirez, M. I., Rosenzvit, M. C., ... & Poncini, C. V. (2022). Extracellular vesicles from *Trypanosoma cruzi*-dendritic cell interaction show modulatory properties and confer resistance to lethal infection as a cell-free based therapy strategy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 1658.

Gutierrez, B. C., Lammel, E., González-Cappa, S. M., & Poncini, C. V. (2021). Early immune response elicited by different *Trypanosoma cruzi* infective stages. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 1188.

György, B., Szabó, T. G., Pásztói, M., Pál, Z., Misják, P., Aradi, B., ... & Buzás, E. I. (2011). Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cellular and molecular life sciences*, 68, 2667-2688.

Herreros-Cabello, A., Callejas-Hernández, F., Fresno, M., Gironès, N., 2019. Comparative proteomic analysis of trypomastigotes from *Trypanosoma cruzi* strains with different pathogenicity. *Infect. Genet. Evol.* 76, 104041. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104041>

Jr, A.R., Rassi, A., 2012. *American Trypanosomiasis (Chagas Disease)* 26, 275–291. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.002>

Jung, B. K., Kim, E. D., Song, H., Chai, J. Y., & Seo, K. Y. (2020). Immunogenicity of exosomes from dendritic cells stimulated with *Toxoplasma gondii* lysates in ocularly immunized mice. *The Korean Journal of Parasitology*, 58(2), 185.

Kalem, M.C., Gerasimov, E.S., Vu, P.K., Zimmer, S.L., 2018. Gene expression to mitochondrial metabolism: Variability among cultured *Trypanosoma cruzi* strains. *PLoS One* 13, 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197983>

Kaplan, D., Ferrari, I., Bergami, P. L., Mahler, E., Levitus, G., Chiale, P., ... & Levin, M. J. (1997). Antibodies to ribosomal P proteins of *Trypanosoma cruzi* in Chagas disease possess functional autoreactivity with heart tissue and differ from anti-P autoantibodies in lupus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(19), 10301-10306.

Kayama, H., Takeda, K., 2010. The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes Infect.* 12, 511–517. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.03.005>

Khan, A. A., Langston, H. C., Costa, F. C., Olmo, F., Taylor, M. C., McCann, C. J., ... & Lewis, M. D. (2021). Local association of *Trypanosoma cruzi* chronic infection foci and enteric neuropathic lesions at the tissue micro-domain scale. *PLoS pathogens*, 17(8), e1009864.

Lewis, M. D., Francisco, A. F., Taylor, M. C., Jayawardhana, S., & Kelly, J. M. (2016). Host and parasite genetics shape a link between *Trypanosoma cruzi* infection dynamics and chronic cardiomyopathy. *Cellular microbiology*, 18(10), 1429-1443.

Ley, B.Y.V., Andrews, N.W., Robbins, E.S., Nussenzweig, V., 1988. *Trypanosoma cruzi* 168.

Lidani, K.C.F., Bavia, L., Ambrosio, A.R., de Messias-Reason, I.J., 2017. The complement system: A prey of *Trypanosoma cruzi*. *Front. Microbiol.* 8, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00607>

Lopez, M., Tanowitz, H. B., & Garg, N. J. (2018). Pathogenesis of chronic Chagas disease: macrophages, mitochondria, and oxidative stress. *Current clinical microbiology reports*, 5, 45-54.

Lovo-Martins, M. I., Malvezi, A. D., Zanluqui, N. G., Lucchetti, B. F. C., Tatakihara, V. L. H., Mörking, P. A., ... & Pinge-Filho, P. (2018). Extracellular vesicles shed by *Trypanosoma cruzi* potentiate infection and elicit lipid body formation and PGE2 production in murine macrophages. *Frontiers in Immunology*, 9, 896.

Magalhães, L. M., Viana, A., Chiari, E., Galvão, L. M., Gollob, K. J., & Dutra, W. O. (2015). Differential activation of human monocytes and lymphocytes by distinct strains of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(7), e0003816.

Manque, P. A., Probst, C., Pereira, M. C., Rampazzo, R. C., Ozaki, L. S., Pavoni, D. P., ... & Buck, G. A. (2011). *Trypanosoma cruzi* infection induces a global host cell response in cardiomyocytes. *Infection and immunity*, 79(5), 1855-1862.

Mantel, P., Hoang, A.N., Goldowitz, I., Potashnikova, D., Hamza, B., Vorobjev, I., Ghiran, I., Toner, M., Irimia, D., Ivanov, A.R., Barteneva, N., Marti, M., 2013. Article Mediate Cellular Communication within the Parasite Population and with the Host Immune System. *Cell Host Microbe* 13, 521–534. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.04.009>

Marcilla, A., Martin-Jaular, L., Trelis, M., Menezes-neto, A. De, Osuna, A., Bernal, D., Fernandez-becerra, C., Almeida, I.C., Portillo, H.A., 2014. Extracellular vesicles in parasitic diseases 1.

Martin-Jaular, L., Nakayasu, E.S., Ferrer, M., Almeida, I.C., Hernando, A., 2011. Exosomes from Plasmodium yoelii-Infected Reticulocytes Protect Mice from Lethal Infections 6, 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026588>

Mathieu, M., Martin-Jaular, L., Lavieu, G., & Théry, C. (2019). Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nature cell biology*, 21(1), 9-17.

Medina, L., Castillo, C., Liempi, A., Herbach, M., Cabrera, G., Valenzuela, L., Galanti, N., de los Angeles Curto, M., Schijman, A.G., Kemmerling, U., 2018. Differential infectivity of two Trypanosoma cruzi strains in placental cells and tissue. *Acta Trop.* 186, 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.07.001>

Melo, R. C., & Brener, Z. (1978). Tissue tropism of different Trypanosoma cruzi strains. *The Journal of parasitology*, 475-482.

Messenger, L.A., Miles, M.A., Bern, C., 2015. Between a bug and a hard place : Trypanosoma cruzi genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease 13, 995–1029. <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1056158>

Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. Agenda de Prioridades de Pesquisa do Ministério da Saúde 2018 - APPMS [recurso eletrônico]. Acesso em maio de 2023. Modo de acesso: World Wide Web: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/agenda\\_prioridades\\_pesquisa\\_ms.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/agenda_prioridades_pesquisa_ms.pdf)>

Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico Doença de Chagas 2022. ISSN 9352-7864

Moreira, L.R, Rodríguez Serrano, F., & 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), e0007163.

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 Negl. Trop. Dis.* 13, 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007163>

Motrán, C. C., Fretes, R. E., Cerbán, F. M., Rivarola, H. W., & de Cima, E. V. (2000). Immunization with the C-terminal region of Trypanosoma cruzi ribosomal P1 and P2 proteins induces long-term duration cross-reactive antibodies with heart functional and structural alterations in young and aged mice. *Clinical Immunology*, 97(2), 89-94.

Nogueira, P.M., Ribeiro, K., Silveira, A.C.O., Campos, J.H., Martins-Filho, O.A., Bela, S.R., Campos, M.A., Pessoa, N.L., Colli, W., Alves, M.J.M., Soares, R.P., Torrecilhas, A.C., 2015. Vesicles from different Trypanosoma cruzi strains trigger

differential innate and chronic immune responses. *J. Extracell. Vesicles* 4.  
<https://doi.org/10.3402/jev.v4.28734>

Osorio, L., Ríos, I., Gutiérrez, B., & González, J. (2012). Virulence factors of *Trypanosoma cruzi*: who is who?. *Microbes and infection*, 14(15), 1390-1402.

PAHO (Pan-American Health Organization). Factsheet: Chagas Disease in the Americas for Public Health Workers. Acesso em maio de 2023.  
<<https://www.paho.org/en/documents/factsheet-chagas-disease-americas-public-health-workers>>

Pech-Canul, Á.D.L.C., Monteón, V., Solís-Oviedo, R.L., 2017. A Brief View of the Surface Membrane Proteins from *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasitol. Res.* 2017.  
<https://doi.org/10.1155/2017/3751403>

Pérez-Molina, J. A., & Molina, I. (2018). Chagas disease. *The Lancet*, 391(10115), 82-94.

Poncini, C. V., Soto, C. D. A., Batalla, E., Solana, M. E., & Gonzalez Cappa, S. M. (2008). *Trypanosoma cruzi* induces regulatory dendritic cells in vitro. *Infection and Immunity*, 76(6), 2633-2641.

Prescilla-Ledezma A, Linares F, Ortega-Muñoz M, Retana Moreira L, Jódar-Reyes AB, Hernandez-Mateo F, Santoyo-Gonzalez F, Osuna A. Molecular Recognition of Surface Trans-Sialidases in Extracellular Vesicles of the Parasite *Trypanosoma cruzi* Using Atomic Force Microscopy (AFM). *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(13):7193. <https://doi.org/10.3390/ijms23137193>

Ramirez, M. I., Deolindo, P., de Messias-Reason, I. J., Arigi, E. A., Choi, H., Almeida, I. C., & Evans-Osses, I. (2017). Dynamic flux of microvesicles modulate parasite–host cell interaction of *Trypanosoma cruzi* in eukaryotic cells. *Cellular Microbiology*, 19(4), e12672. 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., Frago, 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. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00005>

Ramírez-Toloza, G., & Ferreira, A. (2017). *Trypanosoma cruzi* evades the complement system as an efficient strategy to survive in the mammalian host: the specific roles of host/parasite molecules and *Trypanosoma cruzi* calreticulin. *Frontiers in microbiology*, 8, 1667.

Raposo, G., & Stahl, P. D. (2019). Extracellular vesicles: a new communication paradigm?. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(9), 509-510.

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

Ribeiro, K.S., Vasconcellos, C.I., Soares, R.P., Mendes, M.T., Ellis, C.C., Aguilera-Flores, M., de Almeida, I.C., Schenkman, S., Iwai, L.K., Torrecilhas, A.C., 2018. Proteomic analysis reveals different composition of extracellular vesicles released by

two *Trypanosoma cruzi* strains associated with their distinct interaction with host cells. *J. Extracell. Vesicles* 7. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1463779>

Rilla, K., Mustonen, A. M., Arasu, U. T., Härkönen, K., Matilainen, J., & Nieminen, P. (2019). Extracellular vesicles are integral and functional components of the extracellular matrix. *Matrix Biology*, 75, 201-219.

Rodrigues, C. M., Valadares, H. M. S., Francisco, A. F., Arantes, J. M., Campos, C. F., Teixeira-Carvalho, A., ... & Macedo, A. M. (2010). Coinfection with different *Trypanosoma cruzi* strains interferes with the host immune response to infection. *PLoS neglected tropical diseases*, 4(10), e846.

Rojo, G., Pèlissier, F., Sandoval-Rodriguez, A., Bacigalupo, A., García, V., Pinto, R., ... & Solari, A. (2020). Organs infected with *Trypanosoma cruzi* and DTU identification in the naturally infected rodent *Octodon degus*. *Experimental Parasitology*, 215, 107931.

Sánchez-Valdéz, F. J., Padilla, A., Wang, W., Orr, D., & Tarleton, R. L. (2018). Spontaneous dormancy protects *Trypanosoma cruzi* during extended drug exposure. *Elife*, 7, e34039.

Santi-Rocca, J., Fernandez-Cortes, F., Chillón-Marinas, C., González-Rubio, M. L., Martin, D., Gironès, N., & Fresno, M. (2017). A multi-parametric analysis of *Trypanosoma cruzi* infection: common pathophysiologic patterns beyond extreme heterogeneity of host responses. *Scientific reports*, 7(1), 1-12.

Schenkman, S., Pontes de Carvalho, L., & Nussenzweig, V. (1992). *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and neuraminidase activities can be mediated by the same enzymes. *The Journal of experimental medicine*, 175(2), 567-575.

Schnitzer, J. K., Berzel, S., Fajardo-Moser, M., Remer, K. A., & Moll, H. (2010). Fragments of antigen-loaded dendritic cells (DC) and DC-derived exosomes induce protective immunity against *Leishmania major*. *Vaccine*, 28(36), 5785-5793.

Silveira, J.F.D.A., Abrahamsohn, P.A., Colli, W., 1979. No Title 550, 222–232.

Silverman, J.M., Clos, J., Horakova, E., Wang, A.Y., Wiesgigl, M., Kelly, I., Lynn, M.A., McMaster, W.R., Foster, L.J., Levings, M.K., Reiner, N.E., 2010. *Leishmania* Exosomes Modulate Innate and Adaptive Immune Responses through Effects on Monocytes and Dendritic Cells. *J. Immunol.* 185, 5011–5022. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000541>

Simões, M.V., Romano, M.M.D., Schmidt, A., Martins, K.S.M., Marin-Neto, J.A., 2018. Chagas Disease Cardiomyopathy. *Int. J. Cardiovasc. Sci.* 31, 173–189. <https://doi.org/10.5935/2359-4802.20180011>

Taylor, M. C., Ward, A., Olmo, F., Jayawardhana, S., Francisco, A. F., Lewis, M. D., & Kelly, J. M. (2020). Intracellular DNA replication and differentiation of *Trypanosoma cruzi* is asynchronous within individual host cells in vivo at all stages of infection. *PLoS neglected tropical diseases*, 14(3), e0008007.

Théry, C., Witwer, K.W., Aikawa, E., Alcaraz, M.J., Anderson, J.D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G.K., Ayre, D.C., Bach, J.M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N.N., Baxter, A.A., Bebawy, M., Beckham, C., Bedina Zavec, A., Benmoussa, A., Berardi, A.C., Bergese, P., Bielska, E., Blenkiron, C., Bobis-Wozowicz, S., Boilard, E., Boireau, W., Bongiovanni, A., Borràs, F.E., Bosch, S., Boulanger, C.M., Breakefield, X., Breglio, A.M., Brennan, M., Brigstock, D.R., Brisson, A., Broekman, M.L.D., Bromberg, J.F., Bryl-Górecka, P., Buch, S., Buck, A.H., Burger, D., Busatto, S., Buschmann, D., Bussolati, B., Buzás, E.I., Byrd, J.B., Camussi, G., Carter, D.R.F., Caruso, S., Chamley, L.W., Chang, Y.T., Chaudhuri, A.D., Chen, C., Chen, S., Cheng, L., Chin, A.R., Clayton, A., Clerici, S.P., Cocks, A., Cocucci, E., Coffey, R.J., Cordeiro-da-Silva, A., Couch, Y., Coumans, F.A.W., Coyle, B., Crescitelli, R., Criado, M.F., D'Souza-Schorey, C., Das, S., de Candia, P., De Santana, E.F., De Wever, O., del Portillo, H.A., Demaret, T., Deville, S., Devitt, A., Dhondt, B., Di Vizio, D., Dieterich, L.C., Dolo, V., Dominguez Rubio, A.P., Dominici, M., Dourado, M.R., Driedonks, T.A.P., Duarte, F. V., Duncan, H.M., Eichenberger, R.M., Ekström, K., EL Andaloussi, S., Elie-Caille, C., Erdbrügger, U., Falcón-Pérez, J.M., Fatima, F., Fish, J.E., Flores-Bellver, M., Försonits, A., Frelet-Barrand, A., Fricke, F., Fuhrmann, G., Gabrielsson, S., Gámez-Valero, A., Gardiner, C., Gärtner, K., Gaudin, R., Gho, Y.S., Giebel, B., Gilbert, C., Gimona, M., Giusti, I., Goberdhan, D.C.I., Görgens, A., Gorski, S.M., Greening, D.W., Gross, J.C., Gualerzi, A., Gupta, G.N., Gustafson, D., Handberg, A., Haraszi, R.A., Harrison, P., Hegyesi, H., Hendrix, A., Hill, A.F., Hochberg, F.H., Hoffmann, K.F., Holder, B., Holthofer, H., Hosseinkhani, B., Hu, G., Huang, Y., Huber, V., Hunt, S., Ibrahim, A.G.E., Ikezu, T., Inal, J.M., Isin, M., Ivanova, A., Jackson, H.K., Jacobsen, S., Jay, S.M., Jayachandran, M., Jenster, G., Jiang, L., Johnson, S.M., Jones, J.C., Jong, A., Jovanovic-Talisman, T., Jung, S., Kalluri, R., Kano, S. ichi, Kaur, S., Kawamura, Y., Keller, E.T., Khamari, D., Khomyakova, E., Khvorova, A., Kierulf, P., Kim, K.P., Kislinger, T., Klingeborn, M., Klinke, D.J., Kornek, M., Kosanović, M.M., Kovács, Á.F., Krämer-Albers, E.M., Krasemann, S., Krause, M., Kurochkin, I. V., Kusuma, G.D., Kuypers, S., Laitinen, S., Langevin, S.M., Languino, L.R., Lannigan, J., Lässer, C., Laurent, L.C., Lavieu, G., Lázaro-Ibáñez, E., Le Lay, S., Lee, M.S., Lee, Y.X.F., Lemos, D.S., Lenassi, M., Leszczynska, A., Li, I.T.S., Liao, K., Libregts, S.F., Ligeti, E., Lim, R., Lim, S.K., Linē, A., Linnemannstöns, K., Llorente, A., Lombard, C.A., Lorenowicz, M.J., Lörincz, Á.M., Lötvall, J., Lovett, J., Lowry, M.C., Loyer, X., Lu, Q., Lukomska, B., Lunavat, T.R., Maas, S.L.N., Malhi, H., Marcilla, A., Mariani, J., Mariscal, J., Martens-Uzunova, E.S., Martin-Jaular, L., Martinez, M.C., Martins, V.R., Mathieu, M., Mathivanan, S., Maugeri, M., McGinnis, L.K., McVey, M.J., Meckes, D.G., Meehan, K.L., Mertens, I., Minciocchi, V.R., Möller, A., Møller Jørgensen, M., Morales-Kastresana, A., Morhayim, J., Mullier, F., Muraca, M., Musante, L., Mussack, V., Muth, D.C., Myburgh, K.H., Najrana, T., Nawaz, M., Nazarenko, I., Nejsun, P., Neri, C., Neri, T., Nieuwland, R., Nimrichter, L., Nolan, J.P., Nolte-'t Hoen, E.N.M., Noren Hooten, N., O'Driscoll, L., O'Grady, T., O'Loghlen, A., Ochiya, T., Olivier, M., Ortiz, A., Ortiz, L.A., Osteikoetxea, X., Ostegaard, O., Ostrowski, M., Park, J., Pegtel, D.M., Peinado, H., Perut, F., Pfaffl, M.W., Phinney, D.G., Pieters, B.C.H., Pink, R.C., Pisetsky, D.S., Pogge von Strandmann, E., Polakovicova, I., Poon, I.K.H., Powell, B.H., Prada, I., Pulliam, L., Quesenberry, P., Radeghieri, A., Raffai, R.L., Raimondo, S., Rak, J., Ramirez, M.I., Raposo, G., Rayyan, M.S., Regev-Rudzki, N., Ricklefs, F.L., Robbins, P.D., Roberts, D.D., Rodrigues, S.C., Rohde, E., Rome, S., Rouschop, K.M.A., Rughetti, A., Russell, A.E., Saá, P., Sahoo, S., Salas-Huenuleo, E., Sánchez, C., Saugstad, J.A., Saul, M.J.,

Schiffelers, R.M., Schneider, R., Schøyen, T.H., Scott, A., Shahaj, E., Sharma, S., Shatnyeva, O., Shekari, F., Shelke, G.V., Shetty, A.K., Shiba, K., Siljander, P.R.M., Silva, A.M., Skowronek, A., Snyder, O.L., Soares, R.P., Sódar, B.W., Soekmadji, C., Sotillo, J., Stahl, P.D., Stoorvogel, W., Stott, S.L., Strasser, E.F., Swift, S., Tahara, H., Tewari, M., Timms, K., Tiwari, S., Tixeira, R., Tkach, M., Toh, W.S., Tomasini, R., Torrecilhas, A.C., Tosar, J.P., Toxavidis, V., Urbanelli, L., Vader, P., van Balkom, B.W.M., van der Grein, S.G., Van Deun, J., van Herwijnen, M.J.C., Van Keuren-Jensen, K., van Niel, G., van Royen, M.E., van Wijnen, A.J., Vasconcelos, M.H., Vechetti, I.J., Veit, T.D., Vella, L.J., Velot, É., Verweij, F.J., Vestad, B., Viñas, J.L., Visnovitz, T., Vukman, K. V., Wahlgren, J., Watson, D.C., Wauben, M.H.M., Weaver, A., Webber, J.P., Weber, V., Wehman, A.M., Weiss, D.J., Welsh, J.A., Wendt, S., Wheelock, A.M., Wiener, Z., Witte, L., Wolfram, J., Xagorari, A., Xander, P., Xu, J., Yan, X., Yáñez-Mó, M., Yin, H., Yuana, Y., Zappulli, V., Zarubova, J., Žekas, V., Zhang, J. ye, Zhao, Z., Zheng, L., Zheutlin, A.R., Zickler, A.M., Zimmermann, P., Zivkovic, A.M., Zocco, D., Zuba-Surma, E.K., 2018. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J. Extracell. Vesicles* 7. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>

Tonelli, R. R., Giordano, R. J., Barbu, E. M., Torrecilhas, A. C., Kobayashi, G. S., Langley, R. R., ... & Alves, M. J. M. (2010). Role of the gp85/trans-sialidases in *Trypanosoma cruzi* tissue tropism: preferential binding of a conserved peptide motif to the vasculature in vivo. *PLoS neglected tropical diseases*, 4(11), e864.

Torrecilhas, A., 2012. Vesicles as carriers of virulence factors in parasitic protozoan diseases. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.07.008>

Torrecilhas, A.C.T., Rosito, R., Roge, W., Ivan, R., Souza, W. De, Cunha, N., Almeida, I. De, Colli, W., Ju, M., 2009. *Trypanosoma cruzi* : parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response 11, 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.10.003>

Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M. Y., Geiger, T., ... & Cox, J. (2016). The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote) omics data. *Nature methods*, 13(9), 731-740.

Vago, A. R., Andrade, L. O., Leite, A. A., d'Avila Reis, D., Macedo, A. M., Adad, S. J., Tostes, S., Jr, Moreira, M. C., Filho, G. B., & Pena, S. D. (2000). Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *The American journal of pathology*, 156(5), 1805–1809. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)65052-3](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)65052-3)

Van Overtvelt, L., Vanderheyde, N., Verhasselt, V., Ismaili, J., De Vos, L., Goldman, M., ... & Vray, B. (1999). *Trypanosoma cruzi* infects human dendritic cells and prevents their maturation: inhibition of cytokines, HLA-DR, and costimulatory molecules. *Infection and Immunity*, 67(8), 4033-4040.

Van Voorhis, W. C., Barrett, L., Koelling, R., & Farr, A. G. (1993). FL-160 proteins of *Trypanosoma cruzi* are expressed from a multigene family and contain two distinct

epitopes that mimic nervous tissues. *The Journal of experimental medicine*, 178(2), 681-694.

Vera-Cruz, J. M., Magallón-Gastelum, E., Grijalva, G., Rincón, A. R., Ramos-García, C., & Armendáriz-Borunda, J. (2003). Molecular diagnosis of Chagas' disease and use of an animal model to study parasite tropism. *Parasitology research*, 89(6), 480–486. <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0787-0>

Ward, A. I., Lewis, M. D., Khan, A. A., McCann, C. J., Francisco, A. F., Jayawardhana, S., ... & Kelly, J. M. (2020). In vivo analysis of *Trypanosoma cruzi* persistence foci at single-cell resolution. *Mbio*, 11(4), e01242-20.

Ward, A. I., Lewis, M. D., Taylor, M. C., & Kelly, J. M. (2022). Incomplete Recruitment of Protective T Cells Is Associated with *Trypanosoma cruzi* Persistence in the Mouse Colon. *Infection and Immunity*, 90(2), e00382-21.

Ward, A. I., Olmo, F., Atherton, R. L., Taylor, M. C., & Kelly, J. M. (2020). *Trypanosoma cruzi* amastigotes that persist in the colon during chronic stage murine infections have a reduced replication rate. *Open biology*, 10(12), 200261.

Wyllie, M. P., & Ramirez, M. I. (2017). 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*, 75(7).

Wyllie, M.P., Ramirez, M.I., 2017. 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 1–10. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftx077>

Yoshida, N., 2006. YoshidaN\_2005\_molecular\_basis\_cell\_invasion 78, 1–25.

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. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2000000300003>

Zingales, B., 2017. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Trop.* 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017>

Zingales, B., SG, A., MRS, B., DA, C., AG, S., 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI B. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 30, 432–436.