

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

VERÔNICA VITÓRIA VEDAM

**VESÍCULAS EXTRACELULARES DE *TRYPANOSOMA CRUZI* E *TRYPANOSOMA RANGELI*: ESTUDO COMPARATIVO DE COMPONENTES ANTIGÊNICOS
PROTEICOS**

PONTA GROSSA

2020

VERÔNICA VITÓRIA VEDAM

VESÍCULAS EXTRACELULARES DE *TRYPANOSOMA CRUZI* E *TRYPANOSOMA*
RANGELI: ESTUDO COMPARATIVO DE COMPONENTES ANTIGÊNICOS
PROTEICOS

Dissertação apresentada como requisito
parcial para obtenção do título de mestre na
Universidade Estadual de Ponta Grossa,
Área de Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Iriane Eger
Coorientadora: Dr.^a Pryscilla Fanini Wowk

PONTA GROSSA
2020

V414 Vedam, Verônica Vitória
Vesículas extracelulares de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli*
: estudo comparativo de componentes antigênicos proteicos / Verônica Vitória
Vedam. Ponta Grossa, 2020.
83 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas - Área de Concentração:
Biologia Celular e Molecular), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Iriane Eger.

Coorientadora: Profa. Dra. Priscilla Fanini Wowk.

1. Trypanosoma. 2. Vesículas extracelulares. 3. Antígeno. 4. Potencial
vacinal. 5. Doença de chagas. I. Eger, Iriane. II. Wowk, Priscilla Fanini. III.
Universidade Estadual de Ponta Grossa. Biologia Celular e Molecular. IV.T.

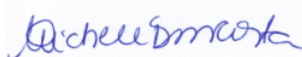
CDD: 616.8

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NÍVEL DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR, ATA N. 06/2020, DA MESTRANDA VERÔNICA VITÓRIA VEDAM REALIZADA NO DIA 07 DE AGOSTO DE 2020, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos sete dias de agosto de dois mil e vinte, às 09h, em conformidade com o Art.2º da Portaria Capes n.36 de 19 de março de 2020, em seção pública por vídeo conferência na plataforma Google Meet, sob a presidência da **Professora Dra. Iriane Eger** reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas da mestranda **Verônica Vitória Vedam** na linha de pesquisa Bioquímica dos processos celulares, constituída pelos demais membros titulares: **Professora Dra. Michele Dietrich Moura Costa (UEPG/PR)** e **Professora Dra. Maria Isabel Lovo Martins Busch Pereira (UEL/PR)**. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e o candidato das normas que regem a defesa da dissertação de Mestrado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título da dissertação avaliada foi: **“Vesículas extracelulares de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli*: Estudo comparativo de componentes antigênicos proteicos”**. Encerrada a defesa e, após reunião, a banca comunicou o resultado final da avaliação da dissertação como APROVADA considerado requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas. A acadêmica deverá entregar ao Programa a versão final da dissertação com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora, no prazo estipulado no item 8 da IN 01/2015. Para a obtenção do título de Mestre, a acadêmica terá até 6 meses, após a data da defesa da sua dissertação, para apresentar ao Colegiado a carta de submissão do seu artigo em revista indexada no estrato mínimo B3 dentre os periódicos indicados pela área de Ciências Biológicas II vigente. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.



Prof. Dra. Iriane Eger 1- (DEBIO - UEPG) - Presidente



Prof. Dra. Michele Dietrich Moura Costa 2- (DEBIOGEM - UEPG) - Titular



Prof. Dra. Maria Isabel Lovo Martins Busch Pereira - (UEL - PR) - Titular

Ponta Grossa, 07 de agosto de 2020.

À todas as mulheres cientistas que vieram
antes de mim. E às que virão depois.

AGRADECIMENTOS

À Iriane pela orientação desde a iniciação científica, por ter me recebido no laboratório com as portas abertas e me instigado à novos desafios desde então! Você é um grande exemplo de professora e cientista que preza pela humanização em todas as relações.

À Pryscilla por ter aceitado fazer parte deste trabalho mesmo que de longe, e conseguido se fazer presente todas as vezes em que eu precisei. Obrigada pelo voto de confiança e carinho que sempre me dispensou.

Às demais professoras do Laboratório de Biologia Celular e Protozoologia, Katia Paludo e Michele Dietrich, pela manutenção da nossa estrutura e disposição em compartilhar os seus conhecimentos comigo.

Aos amigos e colegas do laboratório, bem como à técnica Maria, pelo bom humor e companheirismo nas atividades de rotina. Em especial aos integrantes da Parasitologia: Bruno, Nágila, Livia e Bruna, que tornaram possível e muito proveitosos os nossos encontros de discussão.

Ao Prof. Dr. Fábio André dos Santos, por compartilhar a estrutura do laboratório de Histopatologia e Cultivo Celular da UEPG.

Às Dras. Alessandra Guarneri e Iara José de Messias-Reason e ao Prof. Dr. Mário Steindel, por cederem os soros para a realização deste trabalho.

Ao Instituto Carlos Chagas (Fiocruz-PR), em especial ao Michel Batista da Plataforma de Espectrometria de Massas, por toda a disponibilidade e paciência em me auxiliar nas análises da proteômica. Muito obrigada!

Aos meus pais, família, amigos e ao Rafa por sempre me apoiarem e incentivarem.

À UEPG pela estrutura e pelos demais docentes que participaram da minha formação. À CAPES pela bolsa.

The most exciting phrase to hear in science,
the one that heralds new discoveries, is not
“Eureka!” (I found it!) but “That’s funny...”

(Isaac Asimov)

RESUMO

A infecção por *Trypanosoma cruzi* causa a doença de Chagas, condição que afeta cerca de 8 milhões de pessoas em todo o mundo. O *T. cruzi* secreta vesículas extracelulares (VEs) que participam da interação parasito-hospedeiro e contribuem para o sucesso da infecção, por carregarem moléculas funcionais como proteínas e pequenos RNAs. *Trypanosoma rangeli*, protozoário não patogênico, desencadeia uma imunidade parcialmente protetora contra *T. cruzi* em animais previamente sensibilizados, resposta associada à antígenos de membrana compartilhados entre os parasitos. No entanto, os mecanismos imunes e componentes antigênicos envolvidos nessa resposta protetora ainda não foram totalmente elucidados. Dados prévios do nosso grupo mostraram que VEs de *T. cruzi* e *T. rangeli* são imunogênicas e apresentam reatividade cruzada no soro de animais previamente infectados e no soro de indivíduos chagásicos. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi identificar as proteínas antigênicas de VEs de *T. cruzi* e *T. rangeli*. As VEs provenientes de formas epimastigotas foram purificadas, caracterizadas por *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA) e submetidas à extração de proteínas. A avaliação antigênica foi realizada por meio de *Western blot* (WB) e ELISA, utilizando extrato total de epimastigotas e VEs de células Vero como controles. Por fim, a identificação do proteoma das VEs de *T. rangeli* e *T. cruzi* foi realizada por espectrometria de massas (LC-MS/MS) e análises de bioinformática. O perfil eletroforético dos extratos de VEs revelou bandas em comum (~50 kDa) entre as VEs de *T. cruzi* e *T. rangeli*. Porém, o processo de lise e/ou as condições desnaturantes a que foram submetidas não permitiram a caracterização do perfil de imunorreação dessas VEs frente aos soros murinos pelo WB. No ELISA, também houve ausência de imunorreação nos soros murinos testados em VEs lisadas. Somente quando testadas VEs nativas os soros foram reativos. A análise inédita do proteoma das VEs de epimastigotas de *T. rangeli* revelou 101 proteínas, destas 14 foram comuns às proteínas identificadas em VEs de epimastigotas e/ou tripomastigotas de *T. cruzi*, 5 apresentaram função de interação parasito-hospedeiro (homólogas as proteínas de *T. cruzi*), além da presença de vários dos componentes característicos de VEs. Dentre as 14 proteínas detectadas em comum nas VEs de *T. cruzi* e *T. rangeli*, duas tiveram epítomos imunogênicos indentificados *in silico* (KMP-11 e pirofosfatase de próton vacuolar 1). Esses resultados reforçam a semelhança antigênica entre as VEs estudadas e sugerem que a imunogenicidade dessas VEs provém de proteínas de superfície de membrana. Assim, os dados gerados corroboram com o potencial vacinal de VEs de *T. rangeli* para a doença de Chagas e/ou a sua aplicação como um biomarcador, e apontam alvos para serem avaliados em estudos adicionais nessas áreas.

Palavras-chave: *Trypanosoma*, vesículas extracelulares, antígeno, potencial vacinal, doença de Chagas.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi infection causes Chagas disease and affects about 8 million people worldwide. *T. cruzi* can release extracellular vesicles (EVs) that act in the host cell-parasite interaction and contribute to the success of infection, by carrying functional molecules such as proteins and small RNAs. *Trypanosoma rangeli*, an avirulent protozoan, can trigger a partial immune protection against *T. cruzi* in animals, a response associated with membrane antigens shared between both parasites. The mechanisms and compounds involved in this protective response have not been fully elucidated. Previous data from our group showed that EVs from *T. cruzi* and *T. rangeli* are immunogenic and present cross-reaction in the sera of animals previously infected, as well as in the sera of chagasic patients. Therefore, this study aimed to identify the antigenic proteins of EVs from *T. cruzi* and *T. rangeli*. The EVs from epimastigote forms were purified, characterized by NTA and treated for protein extraction. The antigenic evaluation was performed through Western blot (WB) and ELISA, with total extract of epimastigotes and EVs from Vero cells as controls. Lastly, the identification of *T. rangeli* and *T. cruzi* EVs proteomes was performed by mass spectrometry (LC-MS/MS) and bioinformatic analyzes. The electrophoretic profiles of EVs from *T. cruzi* and *T. rangeli* revealed common bands (~50 kDa). However, the process of lysis and/or the denaturing conditions did not allow the visualization of the immunoreaction profiles of these EVs against murine sera by WB. On ELISA, there was also an absence of immune reaction for the murine sera tested in lysed EVs. Only when native EVs were tested cross-reactivity was shown. The unpublished analysis of the proteome of EVs from *T. rangeli* epimastigotes revealed 101 proteins, 14 were common to the proteins identified in *T. cruzi* epimastigotes and/or trypomastigotes EVs, 5 had a host-parasite interaction role (homologous to *T. cruzi* proteins), besides the presence of several typical molecules of EVs. Among the 14 proteins shared between *T. cruzi* and *T. rangeli* EVs, two had immunogenic epitopes identified *in silico* (KMP-11 and pyrophosphatase of proton vacuolar 1). Our results reinforce the antigenic similarity between those EVs and suggest that the immunogenicity of these EVs comes from membrane surface proteins. The data corroborate with the potential vaccine of *T. rangeli* EVs for Chagas disease and/or its application as a biomarker, and also distinguish targets to be evaluated in further studies in these areas.

Keywords: *Trypanosoma*, extracellular vesicles, antigen, potential vaccine, Chagas disease.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 – Estágios de desenvolvimento do <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Trypanosoma rangeli</i>	17
Quadro 2 – Conteúdo de vesículas extracelulares de <i>Trypanosoma cruzi</i> e suas funções.....	32
Figura 1 – Ilustrações dos estágios evolutivos de tripanosomas.....	18
Figura 2 – História natural da doença de Chagas	22
Figura 3 – Origem das vesículas extracelulas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	31
Figura 4 – Modelo esquemático das moléculas envolvidas na interação do <i>Trypanosoma cruzi</i> com a célula hospedeira	32
Figura 5 – Vesículas extracelulares de formas epimastigotas de <i>Trypanosoma rangeli</i>	33
Figura 6 – Representação do sistema NanoSight NTA.....	40
Figura 7 – Fluxograma detalhando as amostras de antígenos e de soros e as suas características de controle ou teste	42
Figura 8 – Componentes principais do arranjo MS/MS	45
Figura 9 – Perfil da curva de crescimento e morfologia de formas epimastigotas da cepa Y de <i>T. cruzi</i> e da cepa Choachi de <i>T. rangeli</i> cultivadas em meio LIT	47
Figura 10 – Rendimento na obtenção de vesículas extracelulares em relação à densidade da cultura de origem	49
Figura 11 – Caracterização das vesículas extracelulares de epimastigotas de <i>T. rangeli</i> e <i>T. cruzi</i> e de células Vero purificadas por kit comercial	51
Figura 12 – Perfil eletroforético das proteínas totais de vesículas extracelulares em comparação com os extratos dos organismos de origem	53

Figura 13 – Imunorreação representativa dos extratos proteicos de vesículas extracelulares lisadas e epimastigotas de <i>T. rangeli</i> e <i>T. cruzi</i> frente aos soros murinos	54
Figura 14 – Ausência de imunorreatividade dos extratos proteicos obtidos de vesículas extracelulares de <i>T. cruzi</i> e <i>T. rangeli</i> previamente lisadas.....	55
Figura 15 – Comparação da imunogenicidade de vesículas extracelulares lisadas e íntegras de <i>T. cruzi</i> e <i>T. rangeli</i> frente aos soros humanos com a forma cardíaca da doença de Chagas	56
Figura 16 – Diagrama de Venn mostrando proteínas comuns e únicas identificadas nas VEs secretadas por epimastigotas de <i>T. rangeli</i> e por epimastigotas e tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	58
Figura 17 – Enriquecimento diferencial de proteínas em vesículas extracelulares de tripanosomas.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação das características de vesículas extracelulares isoladas de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> Y e <i>T. rangeli</i> Choachi e de células Vero E6	49
Tabela 2 – Quantificação de proteínas totais de VEs a partir de dois métodos, Bradford e Qubit	52
Tabela 3 – Proteínas com função na interação parasito-hospedeiro identificadas nas vesículas extracelulares de <i>T. rangeli</i> e homólogas às proteínas de <i>T. cruzi</i>	60
Tabela 4 – Descrição das 14 proteínas identificadas em comum no proteoma de vesículas extracelulares de <i>T. rangeli</i> e <i>T. cruzi</i>	62
Tabela 5 – Proteínas em comum no proteoma de vesículas extracelulares de <i>T. rangeli</i> e <i>T. cruzi</i> com epítomos indentificados.....	63
Tabela 6 – Lista das proteínas identificadas em vesículas extracelulares secretadas por formas epimastigotas de <i>Trypanosoma rangeli</i>	81

LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	Coleção de culturas Norte Americana (<i>American Type Culture Collection</i>)
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
DC	Doença de Chagas
DTU	<i>Discrete Typing Unit</i>
ECL	<i>Enhanced ChemiLuminescence</i>
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
Epi	Epimastigota
ET	Extrato total
FcaBP	<i>Flagellar Calcium Binding Protein</i>
FDR	<i>False-Discovery Rate</i>
GO	<i>Gene Ontology</i>
GPs	Glicoproteínas
HRP	Enzima peroxidase (<i>HorseRadish Peroxidase</i>)
HSP	<i>Heat shock proteins</i>
IDs	Identificadores de proteínas
IEDB	<i>Immune Epitope Database and Analysis Resource</i>
IFN- γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
ILs	Interleucinas
ISEV	Sociedade internacional de vesículas extracelulares (<i>International Society of Extracellular Vesicles</i>)
kDNA	DNA do cinetoplasto (do inglês <i>kinetoplast</i>)
KMP-11	<i>Kinetoplastid membrane protein 11</i>
KP1	Minicírculo com uma região conservada
KP2	Minicírculo com duas regiões conservadas
KP3	Minicírculo com quatro regiões conservadas
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem
LFQ	<i>Label-free quantification</i>
LIT	Infusão de fígado e triptose (<i>Liver Infusion Triptose</i>)

MHC	Complexo principal de histocompatibilidade (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MISEV	<i>Minimal information for studies of extracellular vesicles</i>
MP	Membrana plasmática
MS	Ministério da Saúde
NO	Óxido nítrico
NTA	Análise de rastreamento de nanopartículas (<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida (<i>PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>)
PBS	Tampão salina-fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
RPMI	Meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RPT02H	Rede de Plataformas Tecnológicas Fiocruz código 02H
SAP	Proteínas ricas em serina, alanina e prolina
SDS	Dodecil sulfato de sódio (<i>Sodium Dodecil Sulfate</i>)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes
SFB	Soro fetal bovino
Sivan	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
<i>StageTip</i>	<i>Stop And Go Extraction in Tip</i>
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TBS-T	Tampão salina-tris e tween 20 (<i>Tris Buffered Saline with Tween</i>)
TCT	<i>Tissue culture cell derived trypanomastigote</i>
TFA	Ácido trifluoracético
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta (<i>Transforming Growth Factor Beta</i>)
Th1	T <i>helper</i> tipo 1
Th2	T <i>helper</i> tipo 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa (<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>)
Tripo	Tripomastigota
TS	Trans-sialidases
VEs	Vesículas extracelulares
WB	<i>Western blotting</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 TRIPANOSOMATÍDEOS	17
3.2 <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> E A DOENÇA DE CHAGAS	20
3.3 IMUNIZAÇÃO COM TRIPANOSOMATÍDEOS NÃO PATOGÊNICOS	24
3.4 VESÍCULAS EXTRACELULARES E A INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO	28
4 MATERIAS E MÉTODOS	35
4.1 MATERIAIS	35
4.2 SOLUÇÕES E MEIOS	35
4.3 SOROS	36
4.4 PARASITOS	37
4.5 CÉLULA VERO	37
4.6 ISOLAMENTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES	38
4.6.1 Extração De Vesículas Extracelulares Para Células Aderentes	39
4.7 ANÁLISE DE RASTREAMENTO DE NANOPARTÍCULAS (NTA)	39
4.8 EXTRAÇÃO E DOSAGEM DE PROTEÍNAS	40
4.9 SDS-PAGE	41
4.10 IMUNOENSAIOS	41
4.10.1 <i>Western Blot</i>	42
4.10.2 ELISA	43
4.11 ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-MS/MS)	43
4.12 ANÁLISE DOS DADOS	45

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 EPIMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i> E <i>T. RANGELI</i> EM CULTIVO AXÊNICO	47
5.2 ORIGEM E PURIFICAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES	48
5.2.1 Determinação Da Extração E Dosagem De Proteínas Para VEs.....	52
5.3 IMUNORREATIVIDADE DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> E <i>TRYPANOSOMA RANGELI</i>	54
5.4 ANÁLISE COMPARATIVA DO PROTEOMA DE VESÍCULAS EXTRACELULARES SECRETADAS POR TRIPANOSOMAS	57
5.5 ANTIGENICIDADE <i>IN SILICO</i> DAS PROTEÍNAS DE VESÍCULAS EXTRACELULARES IDENTIFICADAS.....	61
6 CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS.....	66
APÊNDICE A – PROTEOMA DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DE <i>TRYPANOSMA RANGELI</i>	80

1 INTRODUÇÃO

O protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas (DC) ou tripanosomíase americana, uma zoonose endêmica da América Latina, onde constitui um grave problema de saúde pública (MANDAL, 2014). Não existe vacina disponível para a DC, os métodos mais eficazes de prevenção têm sido o controle dos insetos vetores e triagem sanguínea, esta necessária para prevenir infecções por transfusão e transplante de órgãos (WHO, 2020).

O padrão epidemiológico da DC mudou nas últimas décadas, uma vez restrita ao meio rural, hoje é uma doença predominantemente urbana. Isso se deve, principalmente, aos processos de urbanização e migração humana (SVS/MS, 2020). A migração também vem contribuindo para a expansão da DC para outras regiões não endêmicas, com milhares de casos já registrados nos Estados Unidos, Canadá, Europa, Japão e Austrália (COURA; VIÑAS, 2010).

A manutenção de casos novos da DC é vista no Brasil pelos frequentes surtos de contaminação oral, comuns nas notificações de casos agudos (SVS/MS, 2019-1). Essa conjuntura, somada à falta de opções terapêuticas, justificam a pesquisa de potenciais vacinais para a doença de Chagas.

Dentre esses potenciais, está o protozoário *Trypanosoma rangeli*, parasito heteroxênico que compartilha vetores, hospedeiros e áreas endêmicas com *T. cruzi*, além de componentes de superfície antigênicos, estes responsáveis por uma reatividade sorológica cruzada com *T. cruzi* (GUHL; VALLEJO, 2003). O *T. rangeli* é considerado patogênico apenas para o seu hospedeiro invertebrado, razão provável para ser negligenciado como modelo de estudo (AGGIO, 2017).

Nesse contexto, resultados prévios do nosso grupo (VEDAM *et al.*, 2017) sugerindo que as semelhanças antigênicas entre *T. cruzi* e *T. rangeli* persistem em suas vesículas extracelulares (VEs), estruturas complexas secretadas por diversos tipos celulares e que apresentam papel importante na sinalização celular (GYÖRGY *et al.*, 2011), motivaram a investigação da composição proteica dessas VEs.

Sendo assim, este trabalho apresenta, comparativamente, o conjunto de proteínas de VEs de *T. rangeli* (cepa Choachi) e de *T. cruzi* (cepa Y) e destaca as proteínas com potencial antigênico para futuras investigações de candidatos vacinais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar as proteínas antigênicas de vesículas extracelulares de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Padronizar a extração e dosagem de proteínas de vesículas extracelulares e as condições experimentais para o *Western blotting*;
- II. Verificar o perfil imunoeletrorético de vesículas extracelulares de *T. cruzi* e *T. rangeli* no soro de camundongos experimentalmente infectados e no soro pacientes chagásicos;
- III. Identificar o conjunto proteico de vesículas extracelulares secretadas por formas epimastigotas de *T. rangeli*;
- IV. Comparar o conjunto proteico de vesículas extracelulares de *T. rangeli* com os dados de proteômica de vesículas extracelulares de *T. cruzi*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 TRIPANOSOMATÍDEOS

O *Trypanosoma rangeli* foi descrito por Tejera em 1920 na Venezuela e o *Trypanosoma cruzi*, pelo médico brasileiro Carlos Chagas em 1909 (CHAGAS, 1909; TEJERA, 1920). Os dois protozoários são membros do filo Euglenozoa, classe Kinetoplastea, caracterizada por organismos flagelares com uma mitocôndria única e alongada que contém o cinetoplasto (estrutura formada pelo DNA mitocondrial condensado, também chamado de kDNA, do inglês *kinetoplast*), e família Trypanosomatidae. Além de *Trypanosoma* spp., esta família reúne outros gêneros de parasitos obrigatórios importantes, como *Leishmania* e *Phytomonas* (CAVALIER-SMITH, 2016).

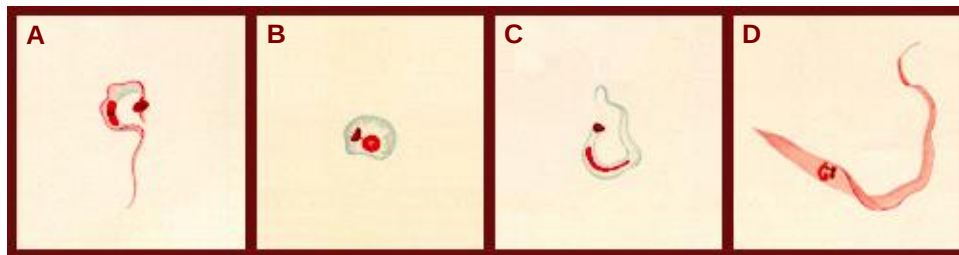
Ao longo do ciclo de vida, os tripanosomatídeos apresentam uma alternância de formas celulares, que são caracterizadas pela posição relativa do flagelo, do cinetoplasto e do núcleo. Quatro fases de desenvolvimento marcantes de *T. cruzi* e *T. rangeli* estão descritas no quadro 1, sendo que formas intermediárias ocorrem entre cada um dos estágios evolutivos. A extremidade anterior do parasito é a que possui o flagelo livre (figura 1). Ambas espécies são heteroxênicas, infectam insetos triatomíneos (“barbeiros”), mamíferos silvestres e domésticos nas Américas, bem como humanos (GRISARD; STEINDEL, 2004; MANDAL, 2014).

Quadro 1. Estágios de desenvolvimento do *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli*

Forma evolutiva	Espécie	Local de ocorrência	Características
Tripomastigota metacíclico	<i>T. cruzi</i> : <i>T. rangeli</i> :	Intestino posterior de triatomíneos Glândulas salivares de triatomíneos	Forma alongada infectiva (20 µm), com cinetoplasto posterior ao núcleo
Amastigota	<i>T. cruzi</i> : <i>T. rangeli</i> :	Células fagocíticas, tecido muscular e cardíaco, sistema digestivo Forma intracelular replicativa não confirmada	Forma esférica replicativa (2 µm de diâmetro), sem flagelo emergente
Tripomastigota sanguíneo	<i>T. cruzi</i> / <i>T. rangeli</i>	Corrente sanguínea de mamíferos. Infectante para os vetores	Forma tipicamente de C ou U, com núcleo central e cinetoplasto na extremidade posterior
Epimastigota	<i>T. cruzi</i> : <i>T. rangeli</i> :	Intestino de triatomíneos Intestino médio e hemolinfa de triatomíneos	Forma alongada replicativa (20 µm), com cinetoplasto anterior ao núcleo

Fonte: Adaptado de Mandal, 2014.

Figura 1. Ilustrações dos estágios evolutivos de tripanosomas



Fonte: Adaptado de Chagas, 1909.

Notas: A) Tripomastigota metacíclico. B) Amastigota. C) Tripomastigota sanguíneo. D) Epimastigota.

O *T. cruzi* está incluído no subgênero *Schizotrypanum*, adotado para tripanosomas que se multiplicam em vertebrados através de estágios intracelulares (amastigota), e na seção Stercoraria, que compreende tripanosomas cujo desenvolvimento da forma infectante (tripomastigota metacíclico) ocorre no trato digestivo do vetor e assim, são transmitidos aos hospedeiros mamíferos através das fezes contaminadas no ciclo natural (WHO, 2002).

A posição taxonômica do *T. rangeli*, por sua vez, tem sido objeto de controvérsia e ainda não está estabelecida. Originalmente foi classificado no subgênero *Herpetosoma* (Stercoraria), apesar da sua principal via de transmissão ser através da picada do vetor e inoculação das formas tripomastigotas presentes nas glândulas salivares, uma característica da seção Salivaria. O subgênero *Tejeraia* foi proposto para acomodar a espécie nesta seção, juntamente com tripanosomas africanos transmitidos por dípteros (ex.: *T. brucei*). No entanto, estudos filogenéticos confirmaram que *T. rangeli* é mais relacionado à *T. cruzi* do que à qualquer outra espécie da seção Salivaria (STEVENS *et al.*, 1999; MOLINARI; MORENO, 2018).

Apesar da reprodução dos protozoários ocorrer por divisão binária (assexuada), ambos *T. cruzi* e *T. rangeli* possuem grande variabilidade genética, o que confere diversidade biológica, morfológica e molecular às populações desses parasitos (GRISARD *et al.*, 1999; GUHL; VALLEJO, 2003; VALLEJO *et al.*, 2009). Para *T. cruzi* são reconhecidas pelo menos seis linhagens genéticas, referidas como DTUs (*Discrete Typing Units*) e denominadas de TcI a TcVI. Essa classificação provém de dois grandes grupos: *T. cruzi*-I predominante no ciclo de transmissão silvestre e *T. cruzi*-II que prevalece no ciclo de transmissão doméstico (ZINGALES *et al.*, 2009).

Por muito tempo, as subpopulações de *T. cruzi* foram consideradas de origem clonal, na qual novos clones evoluíam com o acúmulo de mutações discretas, não afetadas por eventos raros de trocas genéticas. No entanto, evidências crescentes indicam que eventos de recombinação genética em *T. cruzi* podem ser frequentes e contribuam para a sua atual estrutura populacional (ZINGALES, 2018). A cepa Y de *T. cruzi*, utilizada neste estudo, foi isolada de humano (*Homo sapiens*) no estado de São Paulo - Brasil e representa o grupo TcII (SILVA; NUSSENZWEIG, 1953).

Para *T. rangeli*, dois grupos também podem ser definidos de acordo com o conjunto de minicírculos de kDNA (DNA do cinetoplasto) e suas regiões conservadas. Um grupo de cepas apresenta três tipos de minicírculos denominados KP1, KP2 e KP3 (chamado grupo KP1+), enquanto o outro apresenta apenas os minicírculos KP2 e KP3 (grupo KP1-) (VALLEJO *et al.*, 2002). A cepa utilizada neste trabalho foi a Choachi, isolada do triatomíneo *Rhodnius prolixus* naturalmente infectado na Colômbia, e representa o grupo KP1+ (SCHOTTELIUS, 1987).

A distribuição geográfica dos parasitos é ampla e sobreposta, *T. cruzi* ocorre do sul dos Estados Unidos ao sul da América do Sul enquanto *T. rangeli* é predominante na América Central e na Bacia Amazônica, mas também já foi relatado em outros biomas brasileiros como Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga e Pantanal (RAMIREZ *et al.*, 1998; GRISARD *et al.*, 1999; DIAS *et al.*, 2007; COURA; DIAS, 2009; MAIA DA SILVA *et al.*, 2009). Assim, as espécies compartilham nichos ecológicos em diferentes ecossistemas, apresentando vetores e reservatórios em comum, bem como, a ocorrência de infecções únicas ou mistas nesses hospedeiros (RAMIREZ *et al.*, 2002).

O inseto vetor pertence à ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae, são hematófagos obrigatórios com mais de 130 espécies consideradas vetores potenciais de *T. cruzi* em três gêneros principais: *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*. A maioria das espécies são silvestres e mantêm um ciclo natural apenas com mamíferos silvestres (WHO, 2002; COURA; DIAS, 2009). Dentre os gêneros citados, *Rhodnius* é o mais associado com *T. rangeli* (GRISARD; STEINDEL, 2004).

Da mesma maneira, mais de 100 reservatórios silvestres de *T. cruzi* já foram descritos em diferentes ordens de mamíferos, sendo que tanto *T. cruzi* quanto *T. rangeli* são tripanosomas generalistas, ambos comuns entre quirópteros (ex.:

morcego), xenartros (ex.: tatu, tamanduá), marsupiais (ex.: gambá), roedores, carnívoros e primatas (WHO, 2002; GUHL; VALLEJO, 2003; DARIO *et al.*, 2017).

Apesar dessa partilha de hospedeiros e vetores na América Central e do Sul, recentemente Espinosa-Álvarez e colaboradores (2017) demonstraram que *T. rangeli* é filogeneticamente mais próximo de tripanosomas do Velho Mundo do que de *T. cruzi*, desafiando hipóteses anteriores sobre a origem e os hospedeiros dos ancestrais recentes de *T. rangeli*, bem como as relações estreitas geralmente assumidas com *T. cruzi* (ESPINOSA-ÁLVAREZ *et al.* 2017).

Á vista disso, uma história evolutiva longa e independente de *T. rangeli* mais relacionada com tripanosomas de morcegos, ratos, macacos e civetas-africanas do Velho Mundo do que com o clado *Schizotrypanum*, e as adaptações desses ancestrais distantes para os diferentes nichos de mamíferos e vetores compartilhados nas Américas, resultou nas diferenças marcantes entre os ciclos de vida, vias de transmissão e interações parasito-hospedeiro, em que *T. cruzi* é patogênico e *T. rangeli* é não patogênico para os seres humanos (ESPINOSA-ÁLVAREZ *et al.*, 2018).

3.2 TRYPANOSOMA CRUZI E A DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas (DC) ou tripanosomíase americana é uma doença infecciosa potencialmente fatal causada pelo *Trypanosoma cruzi*. A evidência de infecção humana mais antiga encontrada em múmias até o momento é de 9.000 anos atrás (AUFDERHEIDE *et al.*, 2004). Uma vez que o ciclo silvestre do *T. cruzi* existe na natureza há milhões de anos, a história natural da transmissão do parasito iniciou como uma infecção enzoótica (entre animais silvestres), seguida de uma antropozoonose (primária de animais), quando a humanidade invadiu os habitats naturais e começou a ser infectada acidentalmente. A medida que os triatomíneos perdiam suas fontes alimentares silvestres de sangue e se adaptavam às áreas próximas de habitações humanas e às próprias habitações, passou a ser transmitida entre animais domésticos e humanos, estabelecendo-se como uma zoonose (COURA, 2015).

Desse modo, o ciclo de vida de *T. cruzi* se mantém em ambientes silvestres, peridomésticos e domésticos com complexas inter-relações entre eles. Reservatórios domésticos importantes de serem destacados são cães, gatos, ratos, camundongos e porcos-da-índia, nos países em que estes são criados em casas (COURA; DIAS,

2009). E entre as espécies de vetores domiciliados com particular importância epidemiológica estão *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata* e *Panstrongylus megistus* (MANDAL, 2014). Vale ressaltar que a implementação de programas intergovernamentais para o controle dos vetores na década de 1990 resultou em significativa redução na distribuição de *T. infestans* no Brasil, Chile, Uruguai e em áreas da Argentina, e de *R. prolixus* na Venezuela e em algumas áreas de Honduras e Nicarágua (WHO, 2002; COURA, 2013).

Atualmente, a DC faz parte da lista de doenças tropicais negligenciadas (DTNs) definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS). A estimativa é de 6 a 7 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo, principalmente nas áreas endêmicas de 21 países Latino Americanos, onde causa mais de 10.000 mortes anuais (WHO, 2020). No Brasil, segundo dados do Sinan, durante o período de 2012 a 2016 foram notificados 1.190 casos de DC aguda, sendo que a maioria destes casos ocorreram na região Norte (97,1%) e pela via de transmissão oral (73%), que se dá pela ingestão de alimentos contaminados, principalmente açaí e caldo de cana (SVS/MS, 2019-1). Além disso, a disseminação da DC para países não endêmicos tem aumentado nas últimas décadas devido aos fluxos migratórios oriundos da América Latina (COURA; VIÑAS, 2010).

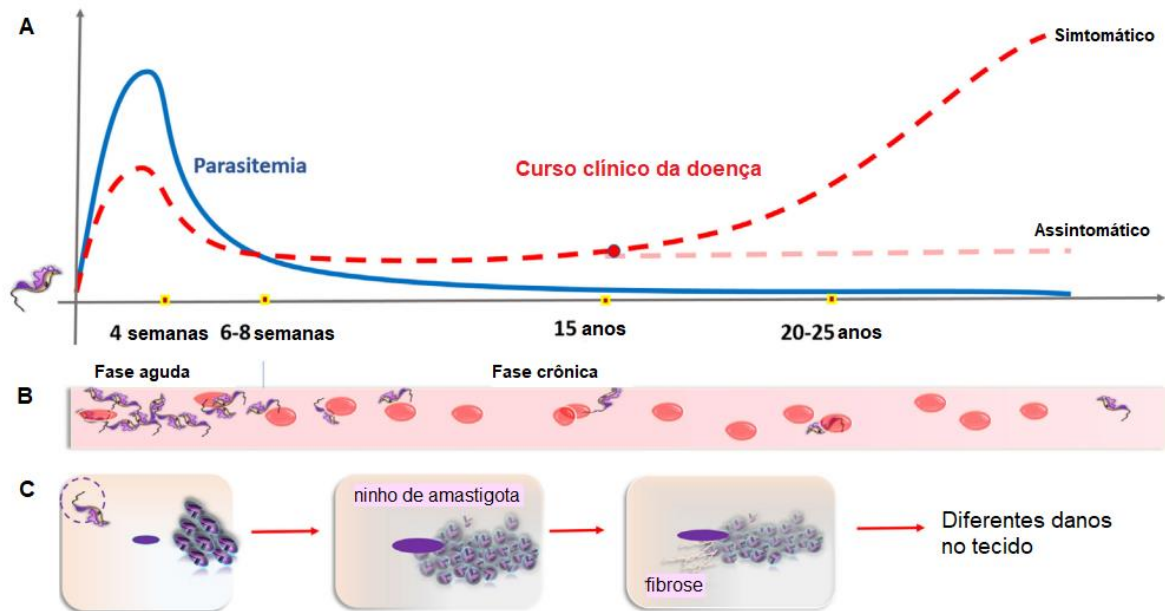
Durante o curso da infecção, a DC apresenta as fases clínicas aguda e crônica (figura 2). A partir da entrada no organismo, pelo contato com o sangue e/ou mucosas, o *T. cruzi* é carregado pelos vasos sanguíneos e linfáticos e pode invadir virtualmente qualquer célula, sendo mais comum em macrófagos, fibroblastos, células musculares (cardíacas/esqueléticas) e nervos entéricos (EPTING *et al.*, 2010).

Uma vez dentro da célula, o parasito passa a se multiplicar no citosol como amastigota, posteriormente se diferencia e rompe a célula, liberando as formas tripomastigotas que irão repetir o processo de invasão, divisão e lise celular por várias semanas. Esse processo caracteriza a alta parasitemia presente na fase aguda (figura 2A), que pode ser detectada no sangue periférico através de exames diretos até quatro meses após a infecção (figura 2B).

Clinicamente, a maioria dos indivíduos infectados apresentam pouco ou nenhum sintoma, embora alguns possam desenvolver manifestações locais (chagoma/sinal de Romaña nos casos de transmissão vetorial), febre prolongada, linfonodos, baço e/ou fígado aumentados, miocardite, entre outros (MANDAL, 2014).

A mortalidade durante a fase aguda sintomática é mais alta em crianças e em decorrência de surtos de contaminação oral (BASTOS *et al.*, 2010).

Figura 2. História natural da doença de Chagas



Fonte: Adaptado de Bona *et al.*, 2018.

Notas: A) Curvas de parasitemia (em azul) e da variabilidade no resultado da infecção (em vermelho). B) Representação de um vaso sanguíneo e da quantidade de tripomastigotas circulantes durante a evolução da doença. C) Representação de uma célula infectada e da proliferação e persistência crônica do parasito no tecido (cardíaco e/ou do sistema digestivo).

A parasitemia é eventualmente controlada pela resposta imune e as funções cardíacas retornam ao normal. No início, esse controle depende da imunidade inata, com destaque para o sistema complemento e citocinas pró-inflamatórias de macrófagos e células NK (do inglês *natural killer*), seguida da ativação da imunidade adquirida mediada por células T CD4⁺ (auxiliares), T CD8⁺ (citotóxicas) e por anticorpos. Juntas, essa resposta imune robusta reduz, mas não elimina toda a carga parasitária (DOS REIS, 2011). Assim, a contínua proliferação e persistência do parasito no tecido levam ao desenvolvimento da fase crônica da DC, caracterizada por baixas cargas parasitárias e sorologia positiva (figura 2).

Para estabelecer uma infecção de longo prazo, o *T. cruzi* desenvolveu estratégias sofisticadas para evadir o sistema imune do hospedeiro. As respostas pró-inflamatórias desencadeadas pelo parasito são neutralizadas por respostas anti-inflamatórias mediadas pelas citocinas IL-10 e TGF- β , em que linfócitos Th1

promovem proteção contra o *T. cruzi* e linfócitos Th2 a persistência do parasito. Com isso, a maioria dos pacientes (cerca de 70%) permanecem assintomáticos ao longo de toda a vida, chamada de forma indeterminada da DC. Enquanto os outros 30% de infectados crônicos evoluem de condições assintomáticas para formas sintomáticas, que incluem danos cardíacos, digestivos ou cardiodigestivos (DOS REIS, 2011; BONNEY; ENGMAN, 2015). Nesses casos, as consequências mais comuns são hipertrofia do coração, dilatações do esôfago e do intestino grosso (megacólon), ou uma combinação de ambos (BOSCARDIN *et al.*, 2010).

A patogênese da DC crônica sintomática ainda não está completamente esclarecida, como o número de parasitos é drasticamente reduzido e permanece restrito à alguns tecidos (figura 2C), há uma discussão em andamento sobre a ação autoimune nas lesões teciduais (BONA *et al.*, 2018). Visto que o resultado da infecção pelo *T. cruzi* é altamente variável, diferentes mecanismos já foram propostos de promover ou contribuir com os danos ao tecido, dentre eles: a ação local do parasito, a resposta imune específica ou não específica e a autoimunidade induzida, que pode ocorrer via mimetismo antigênico ou pela ativação de linfócitos T auto-reativos (BONNEY; ENGMAN, 2015).

Além disso, há evidências da presença de *T. cruzi* no tecido adiposo e na medula óssea, em casos de DC crônica humana, locais onde o parasito pode persistir por décadas e se tornar um reservatório de infecção, reativando a fase aguda no indivíduo em condições de imunossupressão (FERREIRA *et al.*, 2011; TERÁN *et al.*, 2012).

O tratamento tripanocida à disposição até o momento é limitado à dois fármacos, benzonidazol e nifurtimox, que foram desenvolvidos há cerca de 50 anos (CERISOLA, 1977) e são eficazes na fase aguda da doença, chegando até a promover cura. No entanto, a medida que a infecção progride essa eficácia diminui, além dos medicamentos gerarem graves efeitos colaterais que dificultam o seu uso prolongado (WHO, 2020). No Brasil, apenas o benzonidazol tem autorização da ANVISA para ser comercializado devido a alta toxicidade do nifurtimox.

Dessa forma, as descobertas e desenvolvimentos recentes de novos fármacos tripanocidas têm considerado o seu uso em indivíduos crônicos bem como a variabilidade da DC, que pode depender tanto da virulência/origem das cepas específicas de *T. cruzi* quanto da suscetibilidade do indivíduo à infecção (URBINA, 2014; SANTOS SOUZA *et al.*, 2019).

Todavia, os desafios para promover tratamento e prevenção satisfatórios ainda são grandes. Apesar dos avanços no controle vetorial e na triagem de bolsas de sangue em vários países, no Brasil, por exemplo, a transmissão oral pela ingestão de alimentos contaminados com triatomíneos infectados ou seus dejetos continua sendo a mais frequente, 86% em 2018 (SVS/MS, 2019-2). Outra via importante é a transmissão congênita, além de fatores como a emergência das coinfeções de *T. cruzi* com HIV, as condições socioeconômicas das populações afetadas (habitação, educação, saneamento, renda, etc.) e os efeitos da degradação ambiental e das mudanças climáticas no ciclo silvestre do *T. cruzi*, visto o elevado potencial de colonização dos vetores (WHO, 2002; PINTO DIAS *et al.*, 2016).

Nesse cenário que requer permanente vigilância, com as elevadas taxas de morbidade e mortalidade, somado ao fato da DC não ser erradicável devido ao seu caráter enzoótico, a vacinação seria a medida ideal para o controle da doença.

3.3 IMUNIZAÇÃO COM TRIPANOSOMATÍDEOS NÃO PATOGÊNICOS

Abordagens imuno profiláticas ou terapêuticas no contexto da DC requerem a elicitação de citocinas Th1, anticorpos líticos (reativos à epítomos de α -galactose da superfície de tripomastigotas) e atividade de fagócitos, células T auxiliares e T citotóxicas. A ausência de um desses componentes pode resultar na persistência do parasito e consequentes eventos patológicos no hospedeiro (RIOS *et al.*, 2019).

Os esforços no desenvolvimento de vacinas com alvos antigênicos (genes/proteínas) de *T. cruzi* foram revistos por Rios e colaboradores (2019). Contudo, há evidências de que a imunização com antígenos próprios do parasito seja uma abordagem de risco, uma vez que a exposição de camundongos à estes antígenos isolados, na ausência de infecção ativa, já é suficiente para induzir autoimunidade e dano cardíaco nos animais (BONNEY *et al.*, 2011). Desse modo, o estímulo vacinal com tripanosomatídeos não patogênicos para humanos pode ser uma estratégia relevante e mais segura.

As espécies *Trypanosoma rangeli* e *Phytomonas serpens*, um parasito de tomate, têm sido investigadas como potenciais vacinais, pois compartilham antígenos com *T. cruzi* que podem induzir uma resposta imune protetora no hospedeiro (BREGANÓ *et al.*, 2003; BASSO *et al.*, 2008).

A infecção humana natural pelo *T. rangeli* é caracterizada pela ausência de manifestações clínicas e baixos níveis de parasitemia. A presença do parasito tem sido demonstrada por exames diretos, hemoculturas e xenodiagnósticos em pelo menos sete países da América Latina (GUHL; VALLEJO, 2003), totalizando mais de 2.500 casos (com infecções únicas ou mistas com *T. cruzi*). No Brasil há seis casos relatados, sendo o primeiro em um paciente chagásico cardíaco (LUCENA; MARQUES, 1954), três no município de Barcelos no Estado do Amazonas (COURA *et al.*, 1996), no qual nenhum dos indivíduos apresentou sintomas da DC. E dois em pacientes chagásicos crônicos da Bahia, em que um deles apresentava a forma cardíaca e o outro a forma indeterminada da doença (SOUZA *et al.*, 2008).

O ciclo de vida do *T. rangeli* no hospedeiro invertebrado é bem estudado, entretanto, o seu desenvolvimento em vertebrados é pouco compreendido. Os dados a respeito da existência ou não de formas em divisão nos tecidos e no sangue são escassos, divergentes e muito controversos.

Avaliações *in vitro* da interação do *T. rangeli* com diferentes cepas e linhagens celulares seguem que o parasito é capaz de infectar (em baixas taxas), mas não de se multiplicar intracelularmente (EGER-MANGRICH *et al.*, 2001), embora outros trabalhos descrevam estágios de amastigotas abundantes, tanto *in vitro* utilizando cepas Colombianas (ZUÑIGA *et al.*, 1997; CIMADOR *et al.*, 2019), quanto *in vivo* com a cepa Perro 82 (SCORZA *et al.*, 1986; URDANETA-MORALES; TEJERO, 1986). Além de uma observação da replicação de formas tripomastigotas no sobrenadante de culturas celulares (MOLYNEUX, 1973).

De fato, existem evidências de que haja algum mecanismo de multiplicação ou de sobrevivência do *T. rangeli* no hospedeiro mamífero, devido ao aumento (mesmo que pequeno) no número de parasitos circulantes após a infecção e certa persistência nesse hospedeiro (GRISARD; STEINDEL, 2004), porém, o estado biológico e fisiológico deste parasito nos vertebrados ainda precisa ser elucidado.

Apesar dessa lacuna de conhecimento, a infecção humana pelo *T. rangeli* induz uma resposta imune humoral com elevados títulos de anticorpos, o que resulta em uma reatividade sorológica cruzada com *T. cruzi*, pois os parasitos apresentam uma semelhança antigênica de até 60% em diferentes cepas, especialmente para as formas epimastigotas (O'DALY *et al.*, 1984; SALDAÑA; SOUZA, 1996). Estes dados foram confirmados em soros chagásicos de fases e formas distintas, bem como para as formas tripomastigotas (MORAES *et al.*, 2008). Logo, essa forte reação cruzada

associada à dificuldade de diferenciação morfológica entre os parasitos complica o diagnóstico da DC em áreas com sobreposição das espécies, podendo gerar resultados falsos positivos.

Além disso, as coinfeções por *T. cruzi* e *T. rangeli* ainda não foram muito exploradas. Dados sobre o comportamento de infecções mistas são escassos na literatura, muitas vezes restritos apenas a sua existência (NASCIMENTO, 2015). No inseto vetor, já foi demonstrado que não há interações interespecies aparentes ou alterações nos ciclos biológicos de cada parasito (GUEVARA *et al.*, 2005). Nos hospedeiros mamíferos, Guhl e Vallejo (2003) apontaram para uma aparente diminuição da gravidade da sintomatologia da DC quando há infecções mistas em humanos (GUHL; VALLEJO, 2003).

Experimentalmente, a infecção prévia de camundongos com tripomastigotas metacíclicos de *T. rangeli* (cepa Choachí-2V) e posterior infecção com cepas virulentas de *T. cruzi* (Talahuen, SA e clone Dm28c) mostraram diminuição da gravidade da doença, baixos níveis de parasitemia e sobrevida de 100% dos animais (PALÁU *et al.*, 2003), sugerindo que *T. rangeli* é capaz de induzir uma resposta imune específica, controlando a multiplicação parasitária em indivíduos coinfectados. Os autores ainda apontaram para uma possível contribuição da exposição natural ao *T. rangeli* na diversidade de manifestações clínicas, patológicas e imunológicas das infecções pelo *T. cruzi*.

Basso e colaboradores (2008), por sua vez, desenvolveram um modelo de vacinação para camundongos com formas epimastigotas de *T. rangeli* fixadas e demonstraram que os antígenos envolvidos nessa proteção induzida por *T. rangeli* são uma característica comum de diferentes cepas do parasito com origens geográficas distintas (Choachi e SC-58). O efeito protetor desse modelo de vacinação foi avaliado em porcos-da-índia (BASSO *et al.*, 2014), em cães de cativeiro sob condições controladas (BASSO *et al.*, 2007), bem como em cães de áreas rurais (BASSO *et al.*, 2016) e obtiveram resultados semelhantes: redução da carga parasitária, lesões cardíacas brandas ou até ausentes e maior sobrevida após o desafio com *T. cruzi* (cepa Tulahuen), ou apenas a indução de anticorpos contra *T. cruzi* nos casos de modelo canino (BASSO *et al.*, 2007; BASSO *et al.*, 2008; BASSO *et al.*, 2014; BASSO *et al.*, 2016).

Essa resposta protetora parece estar relacionada com a elicitação de células B e T específicas contra *T. cruzi* e um padrão particular de citocinas: elevados níveis

de IL-12 e IFN- γ , baixos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-18 e TNF- α) e uma modulação nos níveis de IL-10 e NO, resultando em um delicado equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2, adequado para superar a infecção (CERVETTA *et al.*, 2002; BASSO *et al.*, 2004; BASSO, 2013). Recentemente, o mesmo grupo demonstrou que esse modelo de vacinação com *T. rangeli* também apresenta ação terapêutica em camundongos (BASSO; MORETTI, 2017), o que é interessante no contexto de imunização de animais domésticos pois não haveria a necessidade de confirmação da infecção ou não pelo *T. cruzi*, visto que ambas abordagens (terapêutica e profilática) foram efetivas em eliminar o parasito da circulação e assim, anular o papel dos animais como reservatórios da doença.

Outra abordagem possível é a utilização do *T. rangeli* como adjuvante imunológico. Aparicio-Burgos e colaboradores (2015), por exemplo, montaram um esquema de vacinação em modelo canino com DNA plasmídico (codificando os antígenos TcG1, TcG2 e TcG4) seguido de epimastigotas fixos de *T. rangeli* que proporcionou proteção significativa contra a cepa Sylvio X10/4 de *T. cruzi*, altamente patogênica para cães. No entanto, em outro trabalho, a imunização com *T. rangeli* fixo após uma vacina de DNA (TcG2/TcG4) não aumentou a sua eficácia em camundongos (GUPTA *et al.*, 2019).

A reatividade antigênica cruzada entre tripanosomatídeos é corroborada pelas evidências de que soros de pacientes chagásicos também reconhecem antígenos de *Phytomonas serpens* (BREGANÓ *et al.*, 2003). Da mesma forma, este parasito foi capaz de conferir certa proteção contra infecções experimentais com *T. cruzi* (cepa Y) em modelos murinos (PINGE-FILHO *et al.*, 2005), onde o efeito protetor pareceu depender da produção aumentada de NO pelo hospedeiro.

Uma vez que *P. serpens* é agente etiológico de uma doença vegetal em fruta comestível (ex.: tomate), o consumo de plantas, por seres humanos ou animais, naturalmente infectadas com tripanosomatídeos, poderia potencialmente estimular uma resposta imune aos antígenos de *T. cruzi* e interferir no desenvolvimento da infecção (BREGANÓ *et al.*, 2003).

Entretanto, os mecanismos imunes e componentes antigênicos envolvidos em todas essas respostas ainda foram pouco elucidados. Santos e colaboradores (2007) descreveram duas cisteína-proteases (de 38 e 40 kDa) de formas promastigotas de *P. serpens* que possuem várias características em comum com a cruzipaína, principal peptidase de *T. cruzi* (SANTOS *et al.* 2007). Enquanto Graça-de-Souza e

colaboradores (2010) identificaram 22 proteínas putativas de *P. serpens* reconhecidas por soros de chagásicos, das quais a maioria foi classificada no processo de metabolismo celular (GRAÇA-DE-SOUZA *et al.* 2010).

Recentemente, foi publicado a primeira análise do proteoma de *P. serpens*, em que os autores apontaram para proteínas que poderiam potencialmente gerar epítomos de MHC de classe I contra tripomastigotas de *T. cruzi*, o que suportaria a reatividade imunológica cruzada entre as espécies (SANTOS JUNIOR *et al.*, 2018).

Outra hipótese é a de que as reações cruzadas poderiam ser induzidas por sialidases homólogas expressas nos tripanosomatídeos, a superfamília das transialidases (TS) de *T. cruzi* (que contém enzimas que catalizam a transferência de ácido siálico da superfície da célula hospedeira para a superfície do parasito) esta diretamente relacionada com os processos de adesão e invasão do protozoário na célula (RUBIN; SCHENKMAN, 2012). *P. serpens* não apresenta atividade de TS mas foi capaz de impedir a depuração plaquetária induzida por TS de *T. cruzi* em imunização oral de camundongos (DA SILVA *et al.*, 2013). A sialidase de *T. rangeli*, também com falta de atividade de TS, é a proteína mais proeminente (banda de 73 kDa) na superfície de formas epimastigotas e tripomastigotas do parasito (WAGNER *et al.*, 2013), e a sua forte antigenicidade já foi demonstrada (SALDAÑA *et al.*, 2002).

Nesse contexto, uma melhor elucidação das semelhanças antigênicas entre tripanosomatídeos pode advir da investigação de informações enviadas via vesículas extracelulares (VEs).

3.4 VESÍCULAS EXTRACELULARES E A INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO

Microrganismos como bactérias, fungos e parasitos liberam moléculas bioativas que modulam a sua interação com o hospedeiro, permitindo a sobrevivência e replicação do patógeno. Nos eucariotos, proteínas secretadas normalmente contêm um peptídeo sinal N-terminal que as direciona para a via clássica de secreção dependente do retículo endoplasmático rugoso e do aparato de Golgi. Proteínas secretadas que não possuem essa sequência sinal usam diferentes vias não convencionais de transporte para fora da membrana plasmática (NICKEL; SEEDORF, 2008).

Entre os diferentes mecanismos de tráfego intracelular propostos para mediar a secreção não convencional, está a associação com vesículas extracelulares (VEs).

As VEs são estruturas complexas e heterogêneas, consistem de formas esféricas delimitadas por uma bicamada lipídica que contém proteínas de membrana e englobam componentes citosólicos provenientes da célula de origem (THÉRY *et al.*, 2009).

Atualmente, existem três processos conhecidos pelos quais as VEs são liberadas no meio extracelular: 1) pelo brotamento interno da membrana endossomal somado ao conteúdo citosólico, que formam vesículas intraluminais no interior desse endossomo, denominado de corpo multivesicular (MVB). Então, ocorre a fusão do MVB com a membrana plasmática e a liberação, por exocitose, das vesículas como exossomos; 2) a partir do brotamento externo da membrana plasmática (MP) por um mecanismo dependente de cálcio, em que a dinâmica de proteínas do citoesqueleto é alterada e ocorre uma redistribuição de fosfolipídeos, resultando na fissão da MP e liberação de microvesículas; 3) através da morte celular programada, formando os corpos apoptóticos (AKERS *et al.*, 2013; DEOLINDO *et al.*, 2013).

Dessa forma, os exossomos são caracterizados por serem VEs nanométricas, variando de 30-100 nm de diâmetro e revestidas por uma membrana de origem endocítica, enquanto as microvesículas são maiores, apresentando diâmetro entre 0,1-1 µm e os corpos apoptóticos 1-5 µm, ambos revestidos por fragmentos da MP (GYÖRGY *et al.*, 2011). Contudo, atribuir uma VE à uma via de biogênese única é extremamente difícil, devido à ausência de marcadores específicos para os subtipos citados, sendo preferível o uso do termo genérico “vesículas extracelulares” (THÉRY *et al.*, 2018).

O campo de estudo de VEs expandiu rapidamente na última década, com o uso de diferentes termos e metodologias na literatura, de maneira que a Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV) estabeleceu requerimentos experimentais mínimos para definir VEs e suas funções - MISEV (LÖTVALL *et al.*, 2014; THÉRY *et al.*, 2018).

Embora a existência de VEs tenha sido por muito tempo ignorada, o reconhecimento desse mecanismo de comunicação intercelular está agora sendo bem documentado, com diversas funções biológicas já descritas, tanto em processos patológicos (MARCILLA *et al.*, 2014) quanto fisiológicos (YÁÑEZ-MÓ *et al.*, 2015), de modo que as emergentes evidências demonstram que a secreção de VEs é um processo celular adaptativo universal (GYÖRGY *et al.*, 2011).

O papel das VEs como veículos potentes de comunicação intercelular se dá pela capacidade de transferir proteínas, lipídios e ácidos nucleicos funcionais entre as células. Já foram descritas VEs contendo RNA mensageiro (RNAm), pequenos RNAs não codificantes (microRNA), DNA cromossômico e mitocondrial, retrotransposons, antígenos, fatores de virulência e moléculas de MHC (BARTENEVA *et al.*, 2013; ROBBINS; MORELLI, 2014).

Após o reconhecimento da célula-alvo, as VEs estabelecem interações com os receptores de superfície, seguido em muitos casos, pela fusão com a MP e liberação do seu conteúdo, sinalizando diferentes eventos intracelulares. Todavia, VEs também podem ser endocitadas pelas células alvo ou colapsar após a sua secreção, liberando o seu conteúdo no espaço extracelular. Desse modo, ao apresentar diferentes estratégias, as VEs podem agir tanto local quanto sistemicamente (TURTURICI *et al.*, 2014; MELDOLESI, 2018).

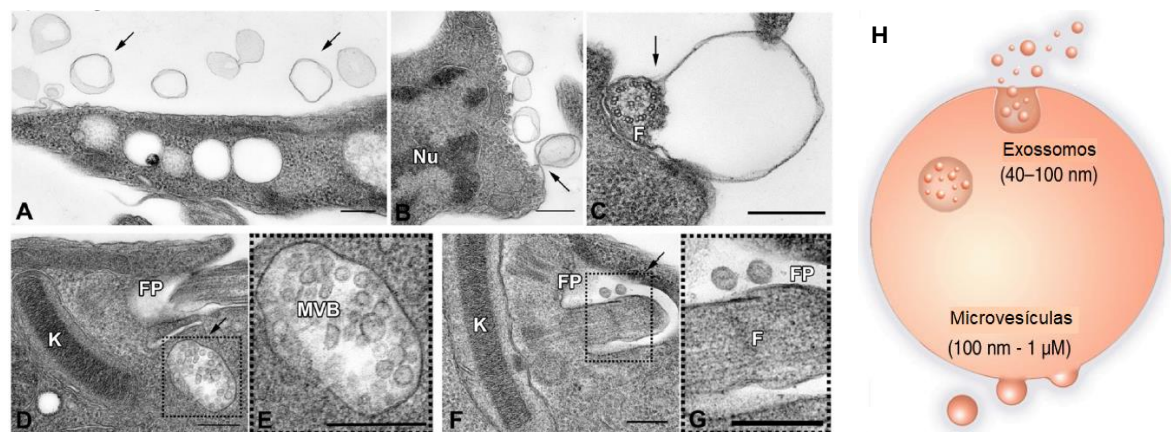
Para *T. cruzi*, Gonçalves e colaboradores (1991) foram os primeiros a descrever a liberação de antígenos de superfície como vesículas de membrana pelas formas tripomastigotas do parasito. A análise posterior do secretoma de *T. cruzi* revelou que apenas uma pequena fração (~9%) do total de proteínas indentificadas continha peptídeo sinal N-terminal, indicando secreção pelas vias clássicas, o que sugere que o restante das proteínas foram secretadas por vias alternativas, incluindo a associação com VEs (BAYER-SANTOS *et al.*, 2013). Atualmente, já foi demonstrado que o *T. cruzi* secreta VEs de diferentes subtipos (figura 3), e por ambas as formas epimastigota e tripomastigota (TORRECILHAS *et al.*, 2009; BAYER-SANTOS *et al.*, 2013).

A maioria das funções atribuídas às VEs de *T. cruzi*, até agora, sugerem uma modulação do ambiente para facilitar a sua infecção. Há evidências com diferentes cepas do parasito em modelos *in vivo* (TORRECILHAS *et al.*, 2009; NOGUEIRA *et al.*, 2015; LOVO-MARTINS *et al.*, 2018), assim como em linhagens celulares fagocíticas e não-fagocíticas (CESTARI *et al.*, 2012; NEVES *et al.*, 2014; RAMIREZ *et al.*, 2017), de que as VEs de *T. cruzi* aumentam o número de células infectadas, contribuem com a resposta inflamatória e medeiam mecanismos de imuno evasão.

Recentemente, foi demonstrado que a interação com VEs isoladas de *T. cruzi* (cepa Pan4), na ausência de infecção, já é suficiente para induzir mudanças fisiológicas em culturas celulares de epitélio (linhagem Vero) e de cardiomiócito HL-1,

sugerindo o possível papel das VEs em algumas das manifestações características da doença de Chagas (MOREIRA *et al.*, 2019).

Figura 3. Origem das vesículas extracelulares de *Trypanosoma cruzi*



Fonte: Adaptado de Bayer-Santos *et al.*, 2013 e Marcilla *et al.*, 2014.

Notas: A-C) Microscopia eletrônica (MET) de formas epimastigotas da cepa Dm28c secretando microvesículas (setas) e D-G) exossomos (Nu: núcleo, F: flagelo, K: cinetoplasto, FP: bolsa flagelar, MVB: corpo multivesicular). Barra de escala = 250 nm. H) Representação de uma célula secretando diferentes subtipos de VEs e as suas respectivas faixas de tamanho.

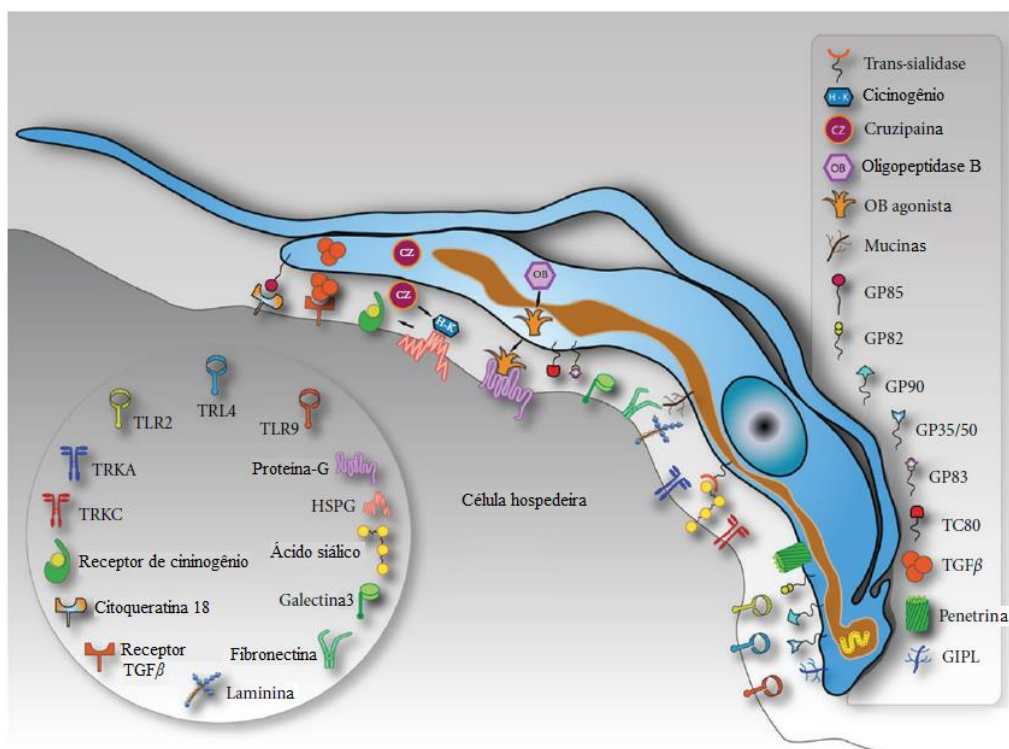
As VEs secretadas pelo *T. cruzi* podem utilizar rotas locais e sistêmicas para mediar um efeito durante o curso da infecção, por meio da sinalização endócrina (células distantes), parácrina (células vizinhas), justácrina (células adjacentes) ou autócrina (auto-direcionada). Além das diferentes formas de interação possíveis: parasito-parasito, parasito-célula hospedeira, célula infectada-célula hospedeira e célula hospedeira-célula hospedeira (TORRÓ *et al.*, 2018), de forma que o ciclo de vida natural do *T. cruzi* e a situação real da sinalização celular na DC são ainda mais complexos do que considerado até então.

Novas evidências corroboram que a sinalização através de VEs durante a infecção por *T. cruzi* é essencial nas interações parasito-hospedeiro. Posto que macrófagos humanos (TPH-1) infectados com *T. cruzi* (cepa Y) aumentam a própria secreção de VEs e promovem uma resposta pró-inflamatória, por meio do receptor Toll-like 2, que favorece o parasito (CRONEMBERGER-ANDRADE *et al.*, 2020).

De modo geral, o processo de interação entre o *T. cruzi* e a célula hospedeira pode ser dividido em três fases sucessivas: adesão, sinalização e invasão (SOUZA *et al.*, 2010). A etapa de adesão envolve o reconhecimento de moléculas presentes na superfície de ambos parasito e célula hospedeira (resumidas na figura 4). Nesse

cenário, não podemos mais ignorar as moléculas secretadas via VEs pelo parasito e o papel desempenhado por elas (BORGES *et al.*, 2016; COSTA *et al.*, 2016).

Figura 4. Modelo esquemático das moléculas envolvidas na interação do *Trypanosoma cruzi* com a célula hospedeira



Fonte: Adaptado de Souza *et al.*, 2010.

Notas: O quadro à direita resume as principais moléculas presentes nas formas tripomastigotas de *T. cruzi*, e à esquerda os respectivos receptores em uma célula hipotética.

Quadro 2. Conteúdo de vesículas extracelulares de *Trypanosoma cruzi* e suas funções

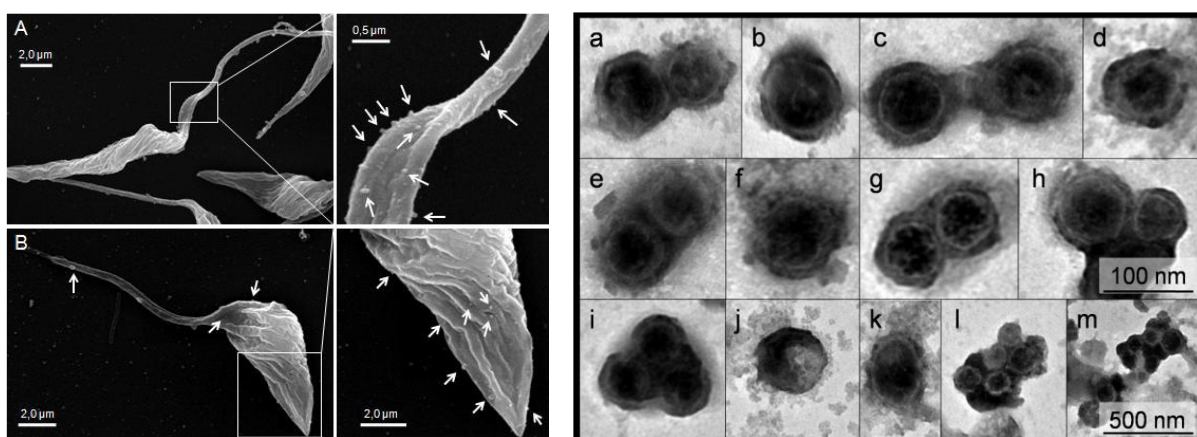
Componentes	Funções
- Proteína flagelar ligadora de cálcio (FcaBP) - α- galactosil glicoconjugados - GP 35/50	Adesão do parasito na célula hospedeira
- Pequenos tRNAs - TcPIWI-tryp (proteína argonauta)	Metaciclogênese e susceptibilidade a infecção
- Cruzipaina	Invasão do parasito na célula hospedeira, digestão de “dobradiças” de todas as subclasses de IgG humanas
- GP 85/superfamília das trans-sialidases (TS)	Adesão celular, ativação de ERK1/2
- GP 82	Ligação à fosfolipase C da célula hospedeira
- Proteínas SAP	Adesão celular, exocitose de lisossomos, influxo de cálcio
- TGF-β	Invasão de <i>T. cruzi</i> , contribui para escape do sistema complemento

Fonte: Adaptado de Borges *et al.*, 2016.

O conteúdo molecular já revelado das VEs de *T. cruzi* é composto por várias das moléculas relacionadas com a interação parasito-célula hospedeira, muitas destas conhecidas por contribuírem para o mecanismo de evasão do sistema imunológico do hospedeiro (quadro 2), o que resulta em uma sinalização eficiente e no sucesso da invasão celular pelo *T. cruzi* (BORGES *et al.*, 2016; TORRÓ *et al.*, 2018).

No caso de *T. rangeli*, o trabalho de Aggio (2017) foi o primeiro a descrever a secreção de VEs por formas epimastigotas do protozoário (figura 5). E recentemente, o nosso grupo observou que VEs isoladas de formas epimastigotas de ambos *T. cruzi* (cepa Y) e *T. rangeli* (cepa Choachi) são imunogênicas e apresentam reatividade sorológica cruzada no soro de camundongos previamente infectados com cada um dos parasitos, bem como no soro de pacientes chagásicos de diferentes formas crônicas e da fase aguda (VEDAM *et al.*, 2017). Porém, a composição das VEs de *T. rangeli* ainda não foi descrita.

Figura 5. Vesículas extracelulares de formas epimastigotas de *Trypanosoma rangeli*



Fonte: Adaptado de Aggio, 2017.

Notas: A-B) Microscopia eletrônica (MEV) mostrando o brotamento de VEs (setas) da superfície de epimastigotas da cepa Choachi. a-m) Morfologia das VEs isoladas de *T. rangeli* por microscopia eletrônica (MET).

Considerando a ausência de um bom entendimento sobre a reação antigênica cruzada entre *T. cruzi* e *T. rangeli*, as crescentes funções atribuídas às VEs na comunicação intercelular, interação parasito-hospedeiro e na imunomodulação; além de que antígenos imunogênicos parecem ser carregados na membrana dessas VEs, o presente trabalho buscou indentificar quais são as proteínas antigênicas presentes nas VEs de formas epimastigotas de *T. cruzi* e *T. rangeli*.

Estes dados podem contribuir para o desenvolvimento de uma futura profilaxia contra a doença de Chagas, uma vez que VEs derivadas de *T. rangeli* poderiam induzir uma resposta imune protetora contra as VEs *T. cruzi*, através da formação de uma resposta específica contra antígenos reconhecidos de forma cruzada. Isso anularia os efeitos das VEs do patógeno, diminuindo o sucesso e amenizando os danos da infecção pelo *T. cruzi*.

Visto que a aplicação terapêutica de VEs em ensaios clínicos já está sendo desenvolvida para terapias anti-tumorais, desordens imunológicas e metabólicas ou para a administração de medicamentos (LENER *et al.*, 2015), o fato de *T. rangeli* ser um parasito não patogênico para humanos favorece esse tipo de aplicação. Dessa forma, a descrição do conteúdo proteico de VEs de *T. rangeli* pode trazer novas perspectivas para o desenvolvimento de estratégias imunoproláticas para doença de Chagas.

Este estudo faz parte de um projeto maior e multicêntrico (Instituto Carlos Chagas/Fiocruz-Paraná, Universidade Estadual de Londrina, Universidade Estadual de Ponta Grossa e Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná) que tem como objetivo caracterizar VEs secretadas por diferentes tripanosomatídeos (*T. cruzi*, *T. rangeli* e *P. serpens*), bem como avaliar o seu efeito imunomodulador *in vitro* e *in vivo* no curso da infecção pelo *T. cruzi*.

4 MATERIAS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

- **Becton, Dickinson and Company – BD** (Sparks, MD, EUA): Difco™ *Liver Infusion Broth*; Difco™ *Tryptose Broth*;
- **BioRad Laboratories** (Hercules, CA, EUA): Precision Plus Protein™ *All Blue Prestained Protein Standards*;
- **GE Healthcare Life Sciences** (São Paulo, SP, BR): Amersham ECL *Human IgG*, *HRP-linked whole Ab (from sheep)*;
- **Gibco** (Grand Island, NY, EUA): Soro Fetal Bovino (SFB);
- **Invitrogen Inc.** (Carlsbad, CA, EUA): *Total Exosome Isolation Reagent - from cell culture media*;
- **Lonza Group AG** (Walkersville, MD, EUA): *Endotoxin-Free Phosphate Buffered Saline (PBS endofree)*; *Roswell Park Memorial Institute medium – RPMI-1640* (solução comercial líquida);
- **Merck KGaA** (Darmstadt, Alemanha): Ácido fórmico 98-100%;
- **Sigma-Aldrich** (St. Louis, MO, EUA): *Acetonitrile (ACN)*; *Ammonium bicarbonate (ABC)*; *Anti-Mouse IgG (whole molecule) – Peroxidase antibody produced in goat*; *Dimethyl sulfoxide (DMSO)*; *DL-Dithiothreitol (DTT)*; *Iodacetamida*; *Penicilina-Estreptomicina*; pó para meio *Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640)*; *Trifluoroacetic acid (TFA)*;
- **Thermo Fisher Scientific** (Waltham, MA, EUA): *Membrana de PVDF 0,45 µm*; *Nunc MaxiSorp™ flat-bottom*;
- **Kasvi** (São José dos Pinhais, PR, BR): Filtro para seringa com membrana de polietersulfona 0,45 µm.

4.2 SOLUÇÕES E MEIOS

- **Gel de corrida 10%:** acrilamida + bis-acrilamida 30% (concentração final 10%), Tris-HCl 2,5 M pH 8,8 (concentração final 400 mM), SDS 10% (concentração final 0,1%), persulfato de amônio 10% (concentração final 0,075%) e TEMED (concentração final 0,07%);

- **Gel de empilhamento 5%:** acrilamida + bis-acrilamida 30% (concentração final 5%), Tris-HCl 1 M pH 6,8 (concentração final 120 mM), SDS 10% (concentração final 0,1%), persulfato de amônio 10% (concentração final 0,075%) e TEMED (concentração final 0,07%);
- **Meio LIT:** infusão de fígado 0,5%, NaCl 75,3 mM, KCl 5,4 mM, glicose 10 mM, triptose 0,5%, Na₂HPO₄ 56,4 mM, hemina 0,0025%, SBF 10% e 100 U/ml de penicilina-estreptomicina;
- **Meio RPMI:** RPMI-1640 (Sigma) suplementado com 10% SBF, 0,25 µg/ml de gentamicina e 50 U/ml de penicilina-estreptomicina;
- **PBS 1x:** NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 4,3 mM e KH₂PO₄ 1,5 mM;
- **Solução substrato-cromógeno:** peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30% 1 µl/ml e OPD 2 mg/ml de tampão citrato;
- **Tampão citrato:** citrato de sódio (Na₃C₆H₅O₇.2H₂O) 40 mM; ácido cítrico (C₆H₈O₇) 11 mM (pH 5,6);
- **Tampão de amostra 5x:** Tris-HCl (pH 6,8) 0,3 M, SDS 10%, glicerol 50%, azul de bromofenol 0,005% e β-mercaptoetanol 5%;
- **Tampão de corrida 1x:** Tris 25 mM, glicina 190 mM e SDS 0,1%;
- **Tampão de transferência 1x:** Tris 25 mM, glicina 192 mM e metanol 20%;
- **TBS-T:** NaCl 150 mM, Tris-HCl (pH 7,4) 20 mM e Tween 0,05%.

4.3 SOROS

Os soros murinos foram cedidos pela Dra. Alessandra Guarneri do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR-Fiocruz/MG), provenientes de camundongos (n=3) da linhagem Swiss após 28 dias de infecção por *T. cruzi* ou *T. rangeli*. Soro de camundongos Swiss não infectados foram utilizados como controle negativo.

Os soros de pacientes chagásicos crônicos (n=5) nas formas indeterminada, cardíaca, digestiva e cardiodigestiva foram cedidos pela Dra. Iara José de Messias-Reason da Universidade Federal do Paraná/Hospital das Clínicas-UFPR de Curitiba, bem como o de indivíduos soro negativos para a doença de Chagas.

Os soros de pacientes chagásicos na fase aguda (n=5) foram cedidos pelo Prof. Dr. Mário Steindel da UFSC, provenientes do surto por contaminação oral que ocorreu em Santa Catarina no ano de 2005 (STEINDEL *et al.*, 2008).

Vale ressaltar que nenhum procedimento em humanos ou em animais foi realizado no presente trabalho e que as instituições parceiras têm as aprovações dos respectivos comitês de ética (CEUA/Fiocruz: LW-61/12, CEP/HC-UFPR: 1457.122/2007-06). Cada conjunto de soros foi reunido em um *pool* e a titulação está descrita nos itens referentes à imunoensaios (item 4.10).

4.4 PARASITOS

Formas epimastigotas da cepa Choachi de *Trypanosoma rangeli* (SCHOTTELIUS, 1987) e da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* (SILVA; NUSSENZWEIG, 1953) foram mantidas a 27°C em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 100 U/ml de penicilina e estreptomicina, através de dois repiques semanais.

A curva de crescimento de cada espécie foi determinada semeando os epimastigotas em tubos de cultura com um inóculo inicial de 5×10^6 parasitos/ml nas condições descritas anteriormente. Então, a proliferação foi avaliada ao longo de 7 dias através da contagem celular diária em câmara de Neubauer e os dados analisados no programa GraphPad Prism 7.

O aspecto morfológico das formas epimastigotas foi observado através de coloração por Giemsa. Brevemente, 1 ml de cada cultura em fase exponencial foi lavado três vezes com PBS (2.000 x *g* por 10 minutos), ressuspendido no mesmo volume e 10 µl foram aplicados na lâmina. As amostras foram fixadas com metanol durante 2 minutos e após secagem completa, a lâmina foi coberta com solução de Giemsa (30% de corante de Giemsa em tampão fosfato misto) durante 30 minutos e lavada delicadamente em água corrente. As imagens foram realizadas em microscópio óptico Olympus BX41 com câmera acoplada.

A coleta dos epimastigotas para a extração de vesículas extracelulares (VEs) foi realizada na fase exponencial de crescimento, 72 ou 96 horas, utilizando parasitos provenientes da 5ª a 10ª passagem, conforme estabelecido em Vedam (2017).

4.5 CÉLULA VERO

Células da linhagem Vero 76 clone E6 (ATCC – *American Type Culture Collection*) foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de SFB em

garrafas de cultura de 75 cm² e mantidas a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂ e atmosfera umidificada.

Periodicamente, o meio foi renovado e ao atingir a confluência da garrafa a monocamada de células foi lavada com PBS e tratada com solução de tripsina/EDTA 0,05% durante 10 minutos a 37°C. Em seguida, foi adicionado meio RPMI suplementado para o SFB inibir a atividade da tripsina e a solução foi homogeneizada com a pipeta. Após uma centrifugação (1.000 x *g* por 5 minutos a temperatura ambiente) as células foram recuperadas e uma alíquota transferida para a garrafa de cultivo na qual foram mantidas.

4.6 ISOLAMENTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES

A extração e purificação de VEs foi realizada conforme descrito por Aggio (2017) e pelo manual do fabricante do kit *Total Exosome Isolation* (Invitrogen, EUA). As culturas de formas epimastigotas de *T. rangeli* e *T. cruzi* em fase exponencial de crescimento, com densidade mínima de 10⁹ parasitos, foram lavadas duas vezes em PBS *endofree* (solução comercial Lonza) a 2.500 x *g* por 10 minutos.

Então, para estimular a secreção de VEs, 10⁸ parasitos/ml foram incubados em meio RPMI sem suplementação (solução comercial Lonza) durante 2 horas a 27°C. Em seguida, a suspensão contendo os parasitos e as VEs foi centrifugada (condições descritas anteriormente) e o sobrenadante rico em VEs recolhido e filtrado em membrana de 0,45 µm. O precipitado contendo os parasitos foi congelado a -20°C para posterior extração de proteínas (item 4.8).

Ao volume total de sobrenadante filtrado contendo as VEs, sempre tratado de forma estéril, foi adicionado ¼ do reagente *Total Exosome Isolation Reagent* (Invitrogen, EUA), metade do volume indicado pelo fabricante. Essa solução foi delicadamente homogeneizada (reagente viscoso) e incubada a 4°C. Após 16 horas, a suspensão de VEs foi transferida para microtubos e centrifugada a 10.000 x *g* por 1 hora a 4°C. O máximo ou todo sobrenadante foi removido com micropipeta e cada precipitado (não visível) ressuspenso em 20 µl de PBS *endofree* (Lonza) contendo ou não detergente (NP40 1%), para a extração de proteínas totais ou validação das amostras por NTA respectivamente.

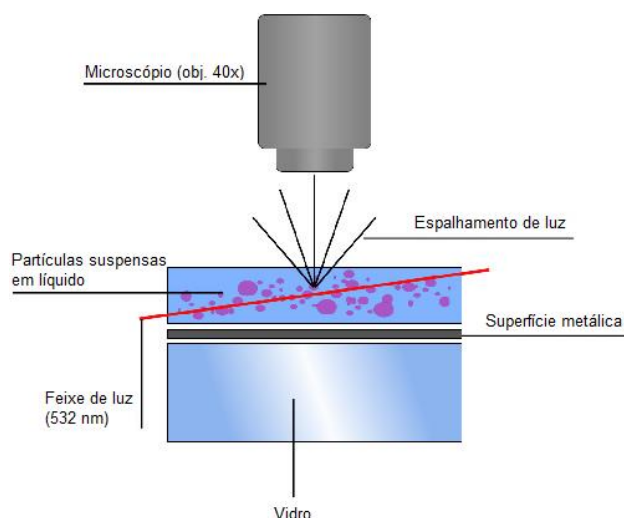
4.6.1 Extração De Vesículas Extracelulares Para Células Aderentes

Foram obtidas VEs de células Vero, linhagem celular normal de origem epitelial renal de macaco, para avaliação de VEs não relacionadas com as de tripanosomatídeos. O isolamento ocorreu de acordo com Théry *et al.* (2006) e o manual do kit *Total Exosome Isolation* (Invitrogen, EUA). Brevemente, as células foram cultivadas até atingir confluência de 70% a 80%. O meio de cultura foi retirado, a garrafa lavada duas vezes com PBS *endofree* (solução comercial Lonza) e adicionado um volume semelhante de RPMI sem suplementação (solução comercial Lonza). Após 24 horas a 37°C em 5% de CO₂, o sobrenadante foi recolhido e submetido a uma centrifugação (300 x *g* por 10 minutos a 4°C) para remover possíveis células mortas. Então, esse sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,45 µm e seguiu para purificação, com o auxílio do kit comercial, conforme descrito anteriormente (item 4.6). Paralelamente, a monocamada de células foi tratada com tripsina/EDTA 0,05%, feita a contagem celular em câmara de Neubauer, seguida do congelamento a -20°C para extrato (item 4.8).

4.7 ANÁLISE DE RASTREAMENTO DE NANOPARTÍCULAS (NTA)

Tamanho, distribuição e concentração de VEs isoladas foram caracterizados pelo programa NTA (*Nanoparticle tracking analysis*) versão 3.0, utilizando o sistema NanoSight LM10 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, RU) equipado com laser de 532 nm (figura 6) no Instituto Carlos Chagas (Fiocruz/PR). A análise ocorre de acordo com as propriedades de espalhamento de luz e movimento Browniano das partículas. As amostras foram diluídas (1:50) em PBS *endofree* (Lonza), aplicadas em um sistema de injeção automática e avaliadas por 30 ou 60 segundos a 25°C, com velocidade de infusão 50. Para minimizar estatisticamente VEs agregadas, as amostras foram analisadas em duplicatas biológicas e cinco réplicas técnicas. Os dados foram tratados pelos programas Microsoft Office Excel e GraphPad Prism 7.

Figura 6. Representação do sistema NanoSight NTA



Fonte: Adaptado do site do fabricante (Malvern).

4.8 EXTRAÇÃO E DOSAGEM DE PROTEÍNAS

Para a extração de proteínas de VES isoladas, os precipitados foram ressuspensos em 20 µl de PBS (Lonza) com NP40 1% e inibidores de proteases (PMSF e EDTA 1mM), conforme o item 4.6, e mantidos sempre a 4°C com periódicas homogeneizações por vortéx. Após 1 hora de extração, todas as amostras iguais foram reunidas em um mesmo microtubo e armazenadas a -20°C (para uso) ou -80°C (para estoque).

Em paralelo, cada precipitado seco (congelado) proveniente de um dos parasitos ou das células foi dissolvido em tampão de lise (TrisHCl 50 mM pH 7,4; NaCl 150 mM; Desoxicolato de Sódio 0,3%; NP40 1%; EDTA e PMSF 1mM) e conservado no gelo por no mínimo 1 hora para extração de proteínas. Após periódicas homogeinizações, cada suspensão foi transferida para microtubos e centrifugada a 20.000 x g por 15 minutos a 4°C. Apenas os sobrenadantes (proteínas dissolvidas) foram recolhidos e armazenados a -20 ou -80°C, denominados de extratos totais (ET).

Todas as amostras foram quantificadas pelo método de Bradford (1976) em comparação com a curva de BSA padrão. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (BioTek ELx800) a 570 nm, utilizando o programa Gen5. As absorvâncias obtidas de triplicatas de cada amostra foram interpoladas na curva padrão calculando-se a equação da reta ($y=ax-b$), e os valores obtidos foram divididos pela respectiva diluição para obter a concentração de proteínas totais em µg/µl. A dosagem das

amostras de VEs foi confirmada com o auxílio do equipamento Qubit® 2.0 *Fluorometer* (Invitrogen, EUA), no Instituto Carlos Chagas (Fiocruz/PR), seguindo as instruções do fabricante.

4.9 SDS-PAGE

Os extratos proteicos (10 a 60 µg) foram acrescidos de tampão de amostra 5 ou 2x (v/v), fervidos a 100°C por 5 minutos e submetidos à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida a 10%. A corrida eletroforética ocorreu em 15 mA constantes na presença de tampão de corrida por aproximadamente 2 horas, seguida da coloração com nitrato de prata ou azul de Coomassie para avaliação do perfil e da representatividade de proteínas nas amostras.

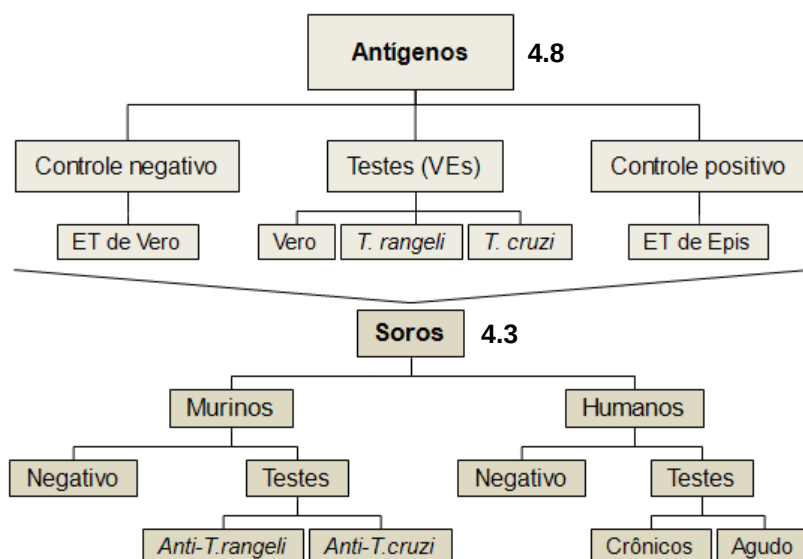
A coloração por nitrato de prata ocorreu incubando o gel em solução fixadora (etanol 10%/ácido acético 0,5%) por até 24 horas sob agitação. Ao ser retirada, essa solução foi reservada e adicionada a solução corante (AgNO₃ 0,2%). Após 15 minutos em agitação suave, o gel foi lavado rapidamente em água ultrapura uma vez e em seguida, lavado novamente sob agitação por 2 minutos. A água foi desprezada e a solução de revelação (NaOH 0,75 M; formaldeído 0,1 M) adicionada e mantida sob agitação até o aparecimento das bandas, cerca de 10 a 15 minutos. Ao observar uma boa intensidade de bandas, a solução de revelação foi retirada e o gel retornou para a solução fixadora previamente reservada. O gel foi mantido a 4°C nesta solução e após o registro por meio de digitalização foi seco em papel celofane,

Para a coloração com azul de Coomassie, o gel foi incubado por 1 hora em Coomassie R-350 0,02% à temperatura ambiente. Em seguida, foi descorado em metanol 25%/ácido acético 8% (v/v) para visualização das bandas proteicas e mantido nessas condições até o registro e secagem.

4.10 IMUNOENSAIOS

Os ensaios descritos a seguir apresentaram reações testes e de controle conforme exposto na figura 7.

Figura 7. Fluxograma detalhando as amostras de antígenos e de soros e as suas características de controle ou teste



Fonte: As autoras.

Notas: ET= Extrato total, VEs= Vesículas extracelulares, Epis= Epimastigotas.

4.10.1 Western Blot

Os extratos proteicos (10 a 20 µg) foram submetidos a SDS-PAGE 10% conforme descrito anteriormente seguido da transferência para uma membrana de PVDF a 25 V por 1 hora e 30 minutos em tampão de transferência a 4°C. A membrana foi previamente ativada em metanol e incubada por cerca de 10 minutos no tampão, juntamente com o gel, as esponjas e os filtros separadores.

Após a eletrotransferência, a membrana foi corada com Coomassie R-250 (0,1% em metanol 50%) por 1 minuto e descorada em metanol 50%/ácido acético 25% (v/v) por 30 minutos para verificar a integridade das proteínas e a eficiência da transferência, ou foi considerado apenas a transferência do padrão de peso molecular (Biorad, EUA).

Em seguida, a membrana foi lavada em água deionizada corrente e bloqueada com solução de TBS-T acrescida de 5% de leite em pó desnatado. Após 16 horas a 4°C, a membrana foi incubada com os soros murinos (titulação 1:200) ou humanos (titulação 1:500 a 1:2000) a temperatura ambiente em TBS-T/leite 2%.

Depois de 2 horas, a membrana foi lavada quatro vezes por 5 minutos com TBS-T e incubada com o respectivo anticorpo secundário anti-IgG murino (titulação 1:3000 a 1:4000) ou humano (titulação 1:5000) conjugado à peroxidase (HRP) por 1

hora a temperatura ambiente, e então, novamente lavada quatro vezes por 5 minutos em TBST-T. A revelação foi realizada a partir do reagente ECL (GE Healthcare) em filme radiográfico utilizando o processador de filmes SRX-101A (Konica Minolta Medical & Graphic) em sala escura.

4.10.2 ELISA

A sensibilização de placas de 96 poços Nunc MaxiSorp™ (Thermo Scientific, EUA) foi realizada com 100 a 500 ng/poço dos extratos proteicos em tampão carbonato-bicarbonato (0,05 M pH 9,6). Foram aplicados 100 µl/poço da solução e a placa foi incubada a 4°C em câmara úmida por 16 horas. Após a remoção da solução de sensibilização por inversão da placa, foram adicionados 300 µl/poço da solução de bloqueio (PBS 1x; Tween 0,05%; leite 5%).

Depois de 1 hora, a placa foi incubada com 50 µl/poço dos soros murinos (titulação 1:50) ou humanos (titulação 1:500) em tampão de bloqueio por 2 horas a 37°C. Após cinco lavagens com PBS 1x/Tween 0,05% (300 µl/poço), foram adicionados 50 µl/poço do respectivo anticorpo secundário anti-IgG conjugado à peroxidase (murino 1:1000 e humano 1:4000) em tampão de bloqueio por 1 hora a 37°C, e então, a placa foi lavada cinco vezes nas condições anteriores e mais uma vez com tampão citrato.

Em seguida, a revelação ocorreu pela adição de 60 µl/poço de solução substrato-cromógeno (H₂O₂/OPD) por 10 minutos no escuro. A reação foi interrompida com 30 µl/poço de ácido sulfúrico P.A. (H₂SO₄ diluído 1:9) seguida da leitura das absorbâncias a 520 nm em leitor de microplacas (BioTek ELx800) acoplado ao programa Gen5. Os ensaios foram realizados em duplicatas biológicas e os resultados analisados pelo GraphPad Prism 7, subtraindo o valor do branco (poço com ausência de antígeno e soro) de todas as absorbâncias. O limiar de reatividade (*cut off*) foi determinado a partir do controle negativo de antígeno (ET de Vero).

4.11 ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-MS/MS)

A identificação do proteoma de VEs de formas epimastigotas de *T. rangeli* e formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* foi realizada conforme descrito por Wowk *et al.* (2017). As amostras de VEs utilizadas foram isoladas no Instituto Carlos

Chagas (Fiocruz/PR) por meio de ultracentrifugação. Brevemente, o sobrenadante filtrado contendo as VEs de cada organismo foi centrifugado a 100.000 x g durante 2 horas a 4°C (Sorvall WX80 *Ultracentrifuge* – Thermo Fisher Scientific), lavado com PBS Lonza e ultracentrifugado por mais 2 horas nas mesmas condições para a obtenção do precipitado enriquecido de VEs.

Após o isolamento, as amostras foram submetidas a digestão em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de modo que ao fim da corrida eletroforética, as bandas foram cortadas em pedaços de 1mm³, os pedaços descorados de Coomassie em etanol 50%, bicarbonato de amônio (ABC) 50 mM e desidratados em etanol 100% por 10 minutos a 25°C. Então, os pedaços de gel foram secos por 7 minutos em centrífuga de baixa pressão, reidratados com DTT 10 mM, ABC 50 mM por 1 hora a 56°C e incubados em iodacetamida 55 mM, ABC 50 mM por 45 minutos a 25°C. A seguir, o gel foi lavado e desidratado com ABC 50 mM durante 20 minutos, seguido de etanol durante 10 minutos, com repetição deste processo. O gel foi então reidratado a 4°C por 20 minutos em solução de tripsina a 12,5 ng/μl (Promega) e a digestão proteica foi realizada com solução de ABC 50 mM (pH 8,0), tripsina 12,5 ng/μl a 37°C.

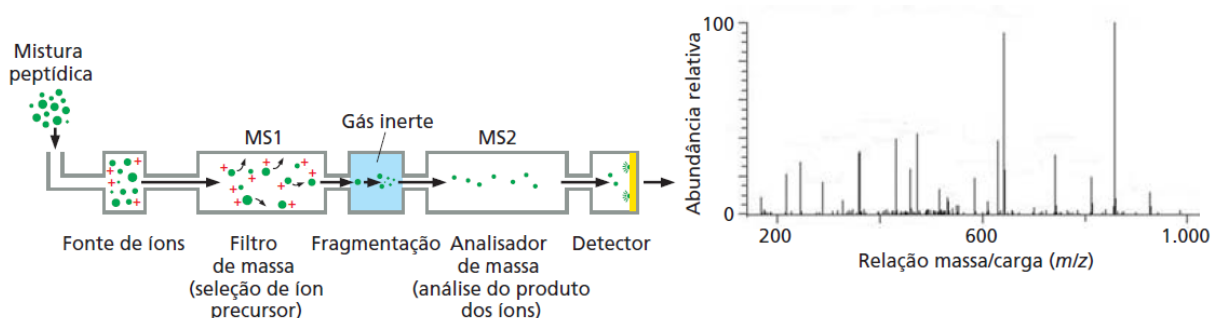
Para a extração de peptídeos, os sobrenadantes foram recolhidos em novos tubos e o gel incubado com solução de extração (TFA 3%, acetonitrila 30%), em duas etapas, e com acetonitrila (ACN) 100%, em duas etapas, todas de 10 minutos a 25°C. Os sobrenadantes destas incubações foram juntados ao sobrenadante da digestão. O sobrenadante final contendo os peptídeos produto da digestão foram completamente secos usando uma centrífuga de baixa pressão (com vácuo). Antes da LC-MS/MS, os peptídeos foram purificados em C18 *StageTip* para a dessalinização das amostras e ressuspensos em ácido fórmico 0,1%, DMSO 5% para a injeção no espectrômetro de massas.

Após esses tratamentos, as amostras foram submetidas ao sistema de cromatografia líquida de ultra desempenho Thermo Scientific Easy-nLC 1.000 acoplado ao espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap XL ETD na Plataforma de Espectrometria de Massas-RPT02H no Instituto Carlos Chagas (Fiocruz/PR).

As misturas peptídicas foram carregadas em uma coluna analítica (15 cm de comprimento, 75 μm de diâmetro interno e com partículas de C18 de 3 μm de diâmetro) e eluídas com um fluxo de 250 nl/minuto em gradiente linear de 5 a 40% de ACN, 0,1% de ácido fórmico e 5% de DMSO por 120 minutos.

O espectrômetro de massas (figura 8) contendo dois analisadores de massa sequenciais foi definido para que o MS1 realizasse uma verificação completa de espectro (m/z) na janela de 300-2.000, com resolução de $R=60.000$. Para então, o MS2 verificar os 10 picos mais intensos, com exclusão dinâmica de 90 segundos.

Figura 8. Componentes principais do arranjo MS/MS



Fonte: Alberts *et al.*, 2017.

Notas: A espectrometria de massa sequencial (MS/MS) apresenta dois analisadores de massa, MS1 e MS2, separados por uma câmara de colisão. Esta contém um gás inerte de alta energia que fragmenta as ligações peptídicas. Então, com o auxílio de um computador, o padrão dos fragmentos detectados é utilizado para deduzir a sequência de aminoácidos do peptídeo original.

4.12 ANÁLISE DOS DADOS

Os espectros de massas gerados pela Plataforma de Espectrometria de Massas RPT02H (Fiocruz/PR) foram analisados pelo algoritmo MaxQuant versão 1.6.3.4, que permite a identificação de peptídeos por *peptide spectrum match* (PSM). Essa identificação é baseada na comparação de espectros de massas de peptídeos de um banco de dados teórico com os espectros de massas gerados experimentalmente na análise por LC-MS/MS (COX; MANN, 2008).

Desse modo, a identificação e quantificação de peptídeos e proteínas das amostras de VEs foi realizada com base nos bancos de dados do TriTrypDB (versão 46) para *T. rangeli* SC58 e para *T. cruzi* Dm28c 2018, com critério de FDR (*false-discovery rate*) de 1%. Os dados apresentados neste trabalho são referentes à três réplicas biológicas e três réplicas técnicas de VEs de cada parasito e forma evolutiva frente aos dois bancos de dados, sendo que apenas a média dos valores das réplicas técnicas seguiu para as demais análises.

A partir das proteínas identificadas, foram retirados os potenciais contaminantes, identificações do banco reverso e identificações apenas por sítio de

modificação. O critério para presença de uma proteína na amostra foi de pelo menos 2 peptídeos únicos indentificados em pelo menos uma réplica, e ao menos 1 peptídeo único identificado em uma segunda réplica.

Para comparar o conteúdo proteico das VEs dos diferentes organismos, foi realizado o enriquecimento de ontologia genética (GO, do inglês *gene ontology*) das proteínas presentes em cada amostra. A GO foi gerada utilizando as ferramentas do TriTrypDB-46 em relação às anotações de componente celular, função molecular, processo biológico e via metabólica. Somente os termos que apresentaram $p\text{-value} < 0,05$ para o teste exato de Fisher e para o critério de FDR foram considerados estatisticamente significativos. A visualização/interpretação dos dados foi feita com o auxílio da plataforma REVIGO, que permite a remoção de termos redundantes de GO e a seleção dos termos representativos (SUPEK *et al.*, 2011).

Uma análise da antigenicidade *in silico* do proteoma das VEs também foi realizada, esta ocorreu pela predição de proteínas que continham semelhanças com os epítomos identificados na base de dados *Immune Epitope Database and Analysis Resource* (IEDB) para o organismo *Trypanosoma cruzi* Dm28c 2018. As sequências de epítomos fornecidas pelo IEDB foram mapeadas (similaridade BLAST $\geq 97\%$) para os identificadores de genes (IDs) correspondentes no TriTrypDB. Os níveis de confiança considerados foram o alto e médio, atribuídos a cada conjunto de epítomos com base na qualidade desse mapeamento. O conjunto de dados foi analisado utilizando os programas Perseus, Microsoft Office Excel e GraphPad Prism 7.

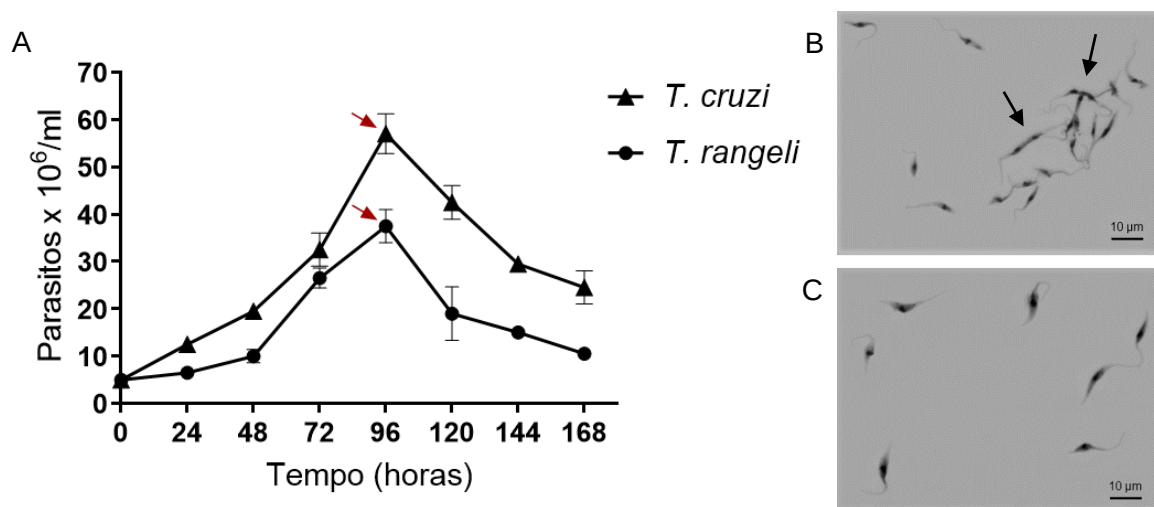
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EPIMASTIGOTAS DE *T. CRUZI* E *T. RANGELI* EM CULTIVO AXÊNICO

A fase exponencial de crescimento das culturas de formas epimastigotas dos tripanosomas foi definida como o período de 72 à 96 horas (figura 9A), intervalo em que ambas as espécies atingem a sua densidade populacional máxima. A partir dessa fase da cultura que foram feitas as coletas dos parasitos para extração de suas vesículas extracelulares (VEs).

O aspecto morfológico dos protozoários *in vitro* está representado na figura 9B-C, onde é possível perceber o predomínio de formas delgadas característico da cepa Y de *T. cruzi* (BRENER; CHIARI, 1963).

Figura 9. Perfil da curva de crescimento e morfologia de formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* e da cepa Choachi de *T. rangeli* cultivadas em meio LIT



Fonte: As autoras.

Notas: A) Curvas de crescimento de *T. cruzi* e *T. rangeli* em 10 ml de cultura (média de duas réplicas biológicas $\pm$ desvio padrão). As setas indicam os picos de crescimento (*T. cruzi* = $5,7 \times 10^8$ e *T. rangeli* = $3,75 \times 10^8$ parasitos totais). B) Morfologia típica de epimastigota (formas alongadas com cinetoplasto anterior ao núcleo) das culturas de *T. cruzi* e C) *T. rangeli* coradas com Giemsa (aumento 1000X). As setas indicam parasitos em divisão celular.

Apesar do estágio evolutivo de *T. cruzi* utilizado não ser considerado infectante para os hospedeiros mamíferos, devido a sua suscetibilidade à lise mediada por sistema complemento (CESTARI *et al.*, 2008), a semelhança antigênica entre as formas epimastigotas de *T. cruzi* e de *T. rangeli* (SALDAÑA; SOUZA, 1996), bem como a capacidade de epimastigotas de *T. rangeli* induzirem uma resposta imune

protetora contra *T. cruzi* em diferentes modelos de mamíferos (BASSO *et al.*, 2007; BASSO *et al.*, 2008; BASSO *et al.*, 2014), justificam o uso das formas epimastigotas neste estudo.

Recentemente, Kessler e colaboradores (2017) demonstraram que epimastigotas de *T. cruzi* recém diferenciados, ao contrário dos epimastigotas de longo prazo de cultura, são infectantes para o hospedeiro mamífero. Esse dado acarreta mais uma camada de complexidade ao ciclo natural do patógeno, em que estudos dos estágios de epimastigotas podem contribuir para uma melhor compreensão das interações parasito-hospedeiro (KESSLER *et al.* 2017).

Na transmissão oral, por exemplo, alimentos contaminados com o inseto vetor levam a ingestão de ambas as formas do parasito (epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas), o que sugere que a participação de epimastigotas no curso da infecção e/ou na ativação da resposta imune ainda precisa ser melhor elucidada.

Quanto ao papel que VEs secretadas por formas epimastigotas de *T. cruzi* podem desempenhar, já foi relatado que estas são capazes de aumentar a suscetibilidade de células de mamíferos à infecção, e de participarem da regulação da metaciclogênese no ciclo de vida do parasito (GARCIA-SILVA *et al.*, 2014).

5.2 ORIGEM E PURIFICAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES

A extração das VEs de *T. cruzi* e *T. rangeli* foi realizada a partir de 45 a 90 ml do sobrenadante das culturas de epimastigotas, com densidades populacionais médias de $23,5 \times 10^8$ parasitos para *T. cruzi* e $11,5 \times 10^8$ parasitos para *T. rangeli*. Partindo dessas condições, foi alcançado um rendimento final em volume de VEs isoladas de 200 a 500 μ l, que apresentaram concentrações bastante variadas conforme descrito na tabela 1.

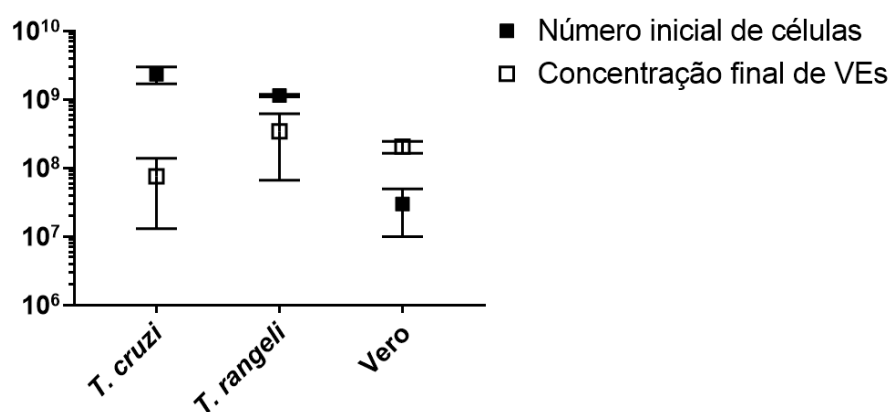
Para as células Vero foi observado um rendimento maior, pois a partir de uma a três garrafas de 75 cm² confluentes (3×10^8 células em média) foram obtidos volumes finais semelhantes de VEs isoladas, com valores altos e mais homogêneos de concentração (figura 10; tabela 1).

Tabela 1. Comparação das características de vesículas extracelulares isoladas de epimastigotas de *T. cruzi* Y e *T. rangeli* Choachi e de células Vero E6. Amostras referentes à dois lotes de extração representativos analisados por NTA (média de 5 réplicas técnicas de cada amostra $\pm$ desvio padrão)

Organismo de origem	Data de extração	Número de parasitos/células (10^8)	Média do tamanho $\pm$ DP (nm)	Moda ¹ do tamanho $\pm$ DP (nm)	Concentração $\pm$ DP (10^7 partículas/ml)
<i>T. cruzi</i>	11/18	30,0	203,9 $\pm$ 2,9	196,3 $\pm$ 11,7	13,9 $\pm$ 1,37
	08/19	17,0	278,9 $\pm$ 26,3	237,1 $\pm$ 47,4	1,36 $\pm$ 0,36
	Média	23,5	241,4 $\pm$ 40,5	216,7 $\pm$ 34,8	7,63 $\pm$ 6,32
<i>T. rangeli</i>	11/18	12,0	174,8 $\pm$ 7,1	133,9 $\pm$ 7,5	60,6 $\pm$ 17,5
	07/19	11,0	188,8 $\pm$ 20,4	153,0 $\pm$ 9,2	8,6 $\pm$ 2,16
	Média	11,5	181,8 $\pm$ 14,3	143,45 $\pm$ 11,7	34,6 $\pm$ 27,9
Vero E6	11/18	1,0	187,0 $\pm$ 2,9	169,5 $\pm$ 11,4	23,5 $\pm$ 2,17
	07/19	5,0	296,3 $\pm$ 19,1	190,9 $\pm$ 55,1	17,7 $\pm$ 4,58
	Média	3,0	240,1 $\pm$ 54,3	180,2 $\pm$ 34,2	20,6 $\pm$ 4,12

DP=desvio padrão.

Figura 10. Rendimento na obtenção de vesículas extracelulares em relação à densidade da cultura de origem



Fonte: As autoras.

Notas: Concentração média de vesículas extracelulares determinada por NTA e o respectivo número de células de origem. Dados referentes à média de duas réplicas biológicas $\pm$ desvio padrão.

Curiosamente, foi observado uma tendência de baixo rendimento na obtenção de VEs para *T. cruzi* em comparação com o número inicial de parasitos (figura 10;

¹ A moda é o valor que apareceu com maior frequência no conjunto de dados.

tabela 1). Isso pode estar relacionado à uma característica da cepa utilizada, visto que Ribeiro e colaboradores (2018) purificaram VEs das cepas Y e YuYu de *T. cruzi*, por um protocolo de fracionamento (cromatografia SEC), e obtiveram concentrações diferentes: $2,7 \times 10^6 - 8,9 \times 10^8$ partículas/ml para a cepa Y e $1,0 \times 10^7 - 9,7 \times 10^9$ partículas/ml para a cepa YuYu. Esses dados foram amparados por microscopia eletrônica, que mostraram uma maior secreção de VEs por YuYu. De forma semelhante, um trabalho anterior também mostrou menor rendimento de VEs para a cepa Y de *T. cruzi* (NOGUEIRA *et al.*, 2015).

Para VEs de *T. rangeli*, Aggio (2017) obteve concentrações médias entre $1,5 \times 10^8 - 3,5 \times 10^9$ partículas/ml, a partir de um número de réplicas técnicas e biológicas superiores aos deste trabalho. Apesar da grande variação entre os lotes de extração (tabela 1), os valores obtidos ficaram próximos aos descritos para *T. rangeli*.

Em todos os organismos (tabela 1), a secreção de VEs foi induzida pela retirada do SFB e portanto, em condição de estresse nutricional. Contudo, a liberação de VEs também pode ocorrer espontaneamente, nesses casos faz-se necessário a rigorosa depleção de VEs do SFB antes da suplementação do meio de cultura (RAMIREZ *et al.*, 2018). No presente trabalho, as lavagens iniciais das culturas retiraram os potenciais contaminantes do soro.

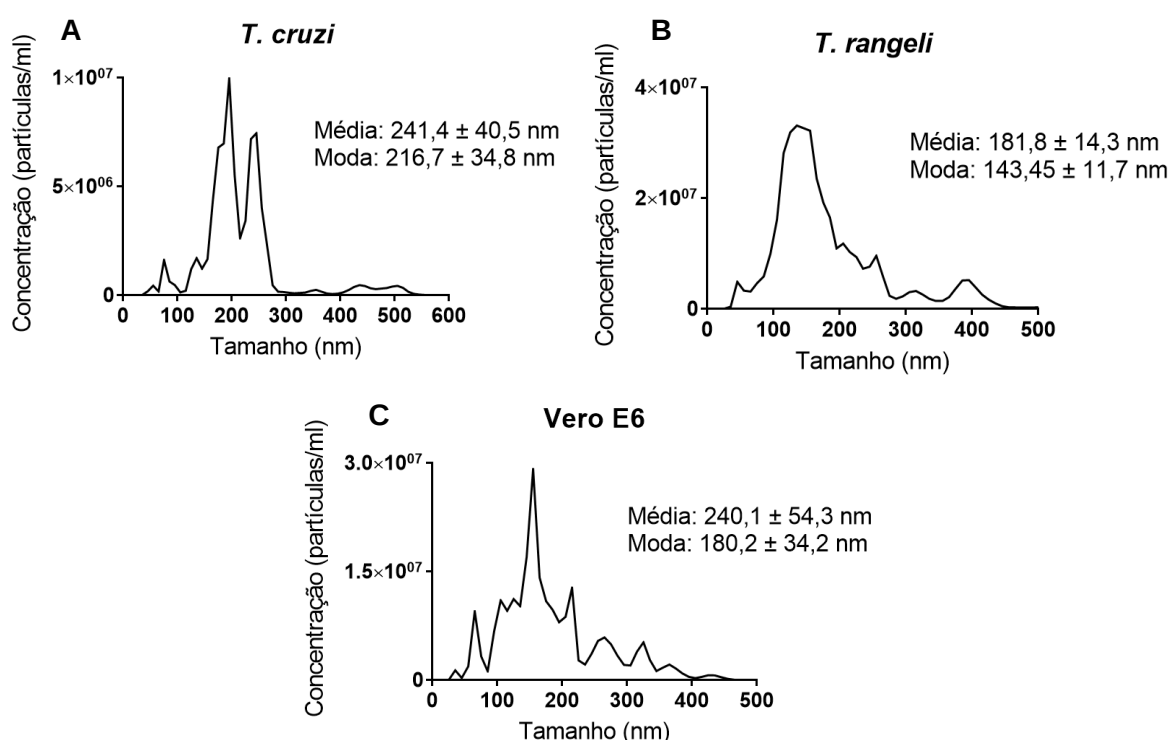
Posto que os estudos de VEs requerem o seu isolamento de algum fluido biológico, diversos protocolos e reagentes disponíveis comercialmente foram desenvolvidos para purificação dessas estruturas. A ultracentrifugação ($100.000 \times g$) é um dos métodos mais utilizados (THÉRY *et al.*, 2006; ROSSI *et al.*, 2019), uma alternativa à ela é o uso de kits comerciais de purificação, estes capazes de sedimentar as VEs durante uma centrifugação de baixa velocidade. Outras estratégias de purificação de VEs são a centrifugação por gradiente de densidade, cromatografia (SEC), afinidade com anticorpos ou *beads* magnéticas específicos, e ultrafiltração (RAMIREZ *et al.*, 2018).

De modo geral, a sedimentação de uma VE depende do seu tamanho, densidade e formato, assim como da viscosidade da solução em que se encontra, tornando difícil a implementação de um protocolo eficiente. Aggio (2017), por exemplo, purificou VEs de *T. rangeli* por duas técnicas: ultracentrifugação e kit comercial, e obteve resultados semelhantes. Dessa forma, o presente estudo optou por seguir o protocolo de purificação pelo kit *Total Exosome Isolation* (Invitrogen, EUA) em conjunto de uma filtração prévia, estratégia padronizada pela autora.

Para a certificação de que o material biológico isolado seja caracterizado como VEs, conforme as recomendações da ISEV (THÉRY *et al.*, 2018), foi empregado o método de caracterização de tamanho das partículas por NTA, amplamente empregado na literatura para essa finalidade.

As VEs obtidas dos três organismos permaneceram dentro da faixa de tamanho de 50 e 300 nm (figura 11), sendo que alguns picos maiores podem corresponder a leitura de agregados de VEs. Considerando o desvio padrão, a média dos tamanhos (diâmetros) foi semelhante entre as VEs de formas epimastigotas de *T. cruzi* e *T. rangeli* e de células Vero: $241,4 \pm 40,5$ nm, $181,8 \pm 14,3$ nm e $240,1 \pm 54,3$ nm respectivamente, em que as VEs de *T. rangeli* apresentaram os menores valores de média e moda (figura 11B).

Figura 11. Caracterização das vesículas extracelulares de epimastigotas de *T. rangeli* e *T. cruzi* e de células Vero purificadas por kit comercial



Fonte: As autoras.

Notas: Distribuição e concentração das populações de VEs por NTA (A-C). Média e moda de duas réplicas biológicas (e cinco réplicas técnicas) $\pm$ desvio padrão.

Os tamanhos obtidos são compatíveis com o descrito para VEs de vários tipos celulares e parasitos (GYÖRGY *et al.*, 2011; NOGUEIRA *et al.*, 2015; AGGIO, 2017;

WOWK *et al.*, 2017), e mostraram populações de VEs heterogêneas adquiridas a partir das condições experimentais adotadas.

Visto essa heterogeneidade, e posto que Bayer-Santos e colaboradores (2013) demonstraram para *T. cruzi*, cepa Dm28c, através de microscopia eletrônica e ultracentrifugação diferencial, a presença de duas populações diferentes de VEs (exossomos <100 nm e microvesículas = 100-200 nm ou maiores). Dado que nenhum tipo de fracionamento foi adotado (figura 11), optou-se pela manutenção do termo “vesículas extracelulares” para designação das amostras neste trabalho.

5.2.1 Determinação Da Extração E Dosagem De Proteínas Para VEs

A partir do isolamento das VEs, foram testadas diferentes estratégias para a extração de proteínas totais, utilizando processos apenas físicos como ciclos de congelamento-descongelamento em nitrogênio líquido e sonicação, ou processos químicos com diferentes tampões de lise.

Dentre os processos testados, a melhor condição encontrada foi ressuspender as VEs diretamente no diluente contendo detergente (PBS Lonza, NP40 1%) para a lise das membranas biológicas, evitando assim a diluição excessiva das amostras.

Dessa forma foi possível dosar os extratos proteicos de VEs com maior precisão (tabela 2) e visualizá-los em gel de poliacrilamida (figura 12), situações que tiveram limitações maiores em outras condições experimentais, como as de processos físicos citadas, que requereriam altos volumes de amostra para a aplicação de 5-10 µg de proteínas no sistema de eletroforese (pente com limite de 40 µl/poço).

Tabela 2. Quantificação de proteínas totais de VEs a partir de dois métodos, Bradford e Qubit

Amostras	Bradford (µg/µl)	Qubit (µg/µl)	Volume total aproximado (µl)
VE <i>T. cruzi</i>	0,50	0,90	400
VE <i>T. rangeli</i>	0,85	0,96	250
VE Vero	0,80	0,94	450
ET <i>T. cruzi</i>	2,40	-	2.000
ET <i>T. rangeli</i>	5,50	-	2.000
ET Vero	5,70	-	1.000

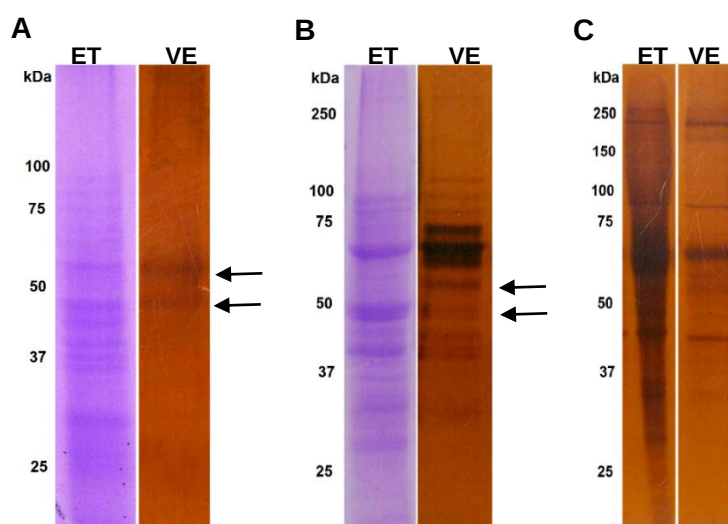
VE=vesícula extracelular
ET=extrato total

Foi possível perceber discordâncias entre as dosagens com Bradford e Qubit (tabela 2), nas quais foram adotados os valores obtidos pelo Qubit, devido à visualização de alterações colorimétricas causadas pelo tampão (PBS, NP40 1%) ao realizar a técnica de Bradford. Uma vez que o rendimento proteico dos ETs foi muito superior, não houve alteração colorimétrica a partir do volume de amostra utilizado na dosagem dessas amostras.

De forma geral, as VEs dos três organismos apresentaram rendimento proteico semelhantes (900-960 ng/ μ l). Contudo, considerando o limite de acurácia do equipamento Qubit *Fluorometer*, optou-se por também expor a proporção do número de células que secretaram o volume de VEs utilizado nos experimentos.

Como forma de controle, os géis da eletroforese (SDS-PAGE 10%) foram corados para avaliação dos extratos proteicos antes de dar seguimento para os ensaios de *Western blot*. O perfil eletroforético obtido para as VEs (figura 12) apresentou semelhanças com os extratos totais (ETs) das respectivas células de origem. Além disso, VEs de *T. cruzi* e *T. rangeli* mostraram o compartilhamento de bandas de peso molecular próximo de 50 kDa (setas figura 12A-B) e perfis divergentes aos de VEs provenientes de células Vero (figura 12C).

Figura 12. Perfil eletroforético das proteínas totais de vesículas extracelulares em comparação com os extratos dos organismos de origem



Fonte: As autoras.

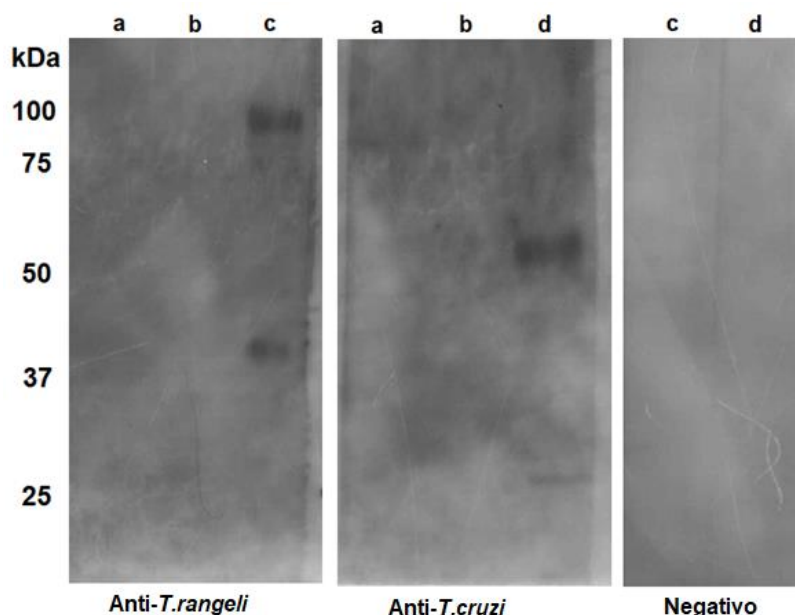
Notas: A) *T. cruzi* Y. B) *T. rangeli* Choachi. C) Vero E6. Foram aplicados 60 μ g/poço para ET e 10 μ g/poço para VE, ou o equivalente à VEs de aproximadamente 2×10^7 epimastigotas de *T. cruzi*, 1×10^7 de *T. rangeli* e 3×10^6 de células Vero. Géis corados com Coomassie e Prata respectivamente (VE: vesícula extracelular, ET: extrato total).

A alta representatividade de proteínas de peso molecular entre 70-75 kDa no perfil de *T. rangeli*, para ambos ET e VE, é compatível com o demonstrado em outros trabalhos com este parasito (WAGNER *et al.*, 2013). Em contrapartida, a baixa representatividade de proteínas totais no perfil de VE para *T. cruzi* pode ter ocorrido devido à menor secreção de VEs da cepa utilizada (NOGUEIRA *et al.*, 2015; RIBEIRO *et al.*, 2018), somado às limitações de dosagem proteica.

5.3 IMUNORREATIVIDADE DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE *TRYPANOSOMA CRUZI* E *TRYPANOSOMA RANGELI*

Após a obtenção dos extratos de VEs mediante à lise de suas membranas, as amostras seguiram para a avaliação do perfil imunoeletroforético por meio de *Western blotting* (WB). Ao serem testadas frente aos soros murinos, não foi possível definir um perfil de imunorreatividade nas amostras de VEs de *T. rangeli* e *T. cruzi* (figura 13a-b), ao contrário dos ETs, que frente aos soros próprios, resultaram em uma reação específica (figura 13c-d).

Figura 13. Imunorreção representativa dos extratos proteicos de vesículas extracelulares lisadas e epimastigotas de *T. rangeli* e *T. cruzi* frente aos soros murinos



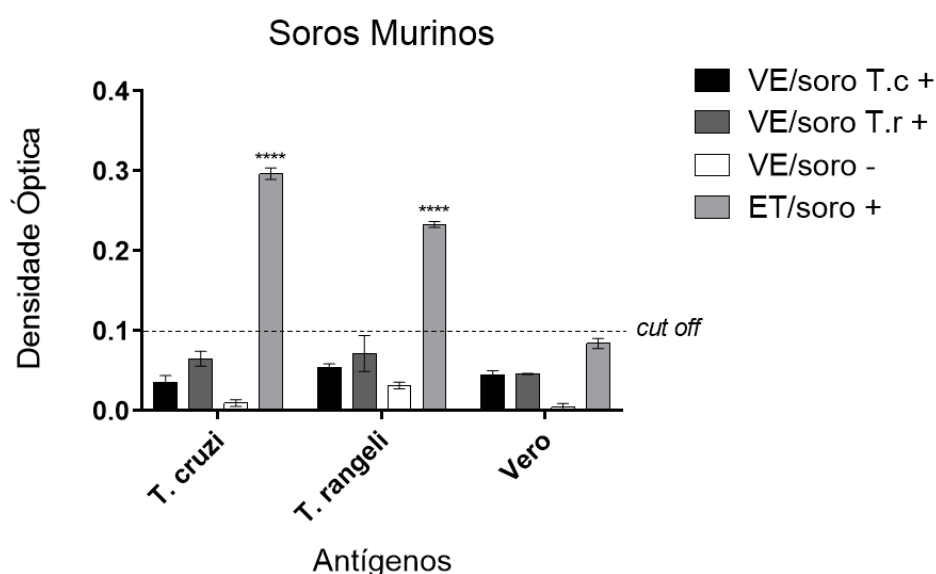
Fonte: As autoras.

Notas: a) VE de *T. rangeli*, b) VE de *T. cruzi*, c) ET de *T. rangeli*, d) ET de *T. cruzi*. Foram aplicados 10 µg/poço para ET e VE, ou o equivalente à VEs de aproximadamente 1×10^7 epimastigotas de *T. rangeli* e 2×10^7 de *T. cruzi*. Identificação dos soros na parte inferior.

Devido ao limite de volume/concentração de amostra possível de ser submetida ao SDS-PAGE, além das relativas perdas de proteínas durante a eletrotransferência para a membrana de PVDF, na qual só foi possível detectar proteínas pela coloração com azul de Coomassie (sensibilidade >50 ng/banda), corante que pode acabar gerando artefatos na técnica de WB (PRYOR *et al.*, 1992; GOLDMAN *et al.*, 2017), uma nova estratégia foi adotada.

As VEs foram submetidas ao ensaio de ELISA para confirmação da imunogenicidade das amostras, em razão dessa técnica ser mais sensível e exigir menor volume/concentração para as reações imunes. Contudo, os resultados obtidos no WB se mantiveram no ELISA (figura 14), em que somente os ETs de epimastigotas apresentaram reações positivas frente aos soros murinos.

Figura 14. Ausência de imunorreatividade dos extratos proteicos obtidos de vesículas extracelulares de *T. cruzi* e *T. rangeli* previamente lisadas



Fonte: As autoras.

Notas: Resultados expressos como média e desvio padrão de duplicatas com o valor do branco (0,065) subtraído. Sensibilização com 500 ng/poço para ET e VE, ou o equivalente à VEs de aproximadamente 1×10^7 epimastigotas de *T. cruzi*, 5×10^6 de *T. rangeli* e 1×10^6 de células Vero. Cut-off=0,10 (determinado a partir do ET de Vero) e ****p<0,0001 one-way ANOVA (soro + ou T.c +: anti-*T. cruzi*, soro T.r +: anti-*T. rangeli*, soro -: negativo).

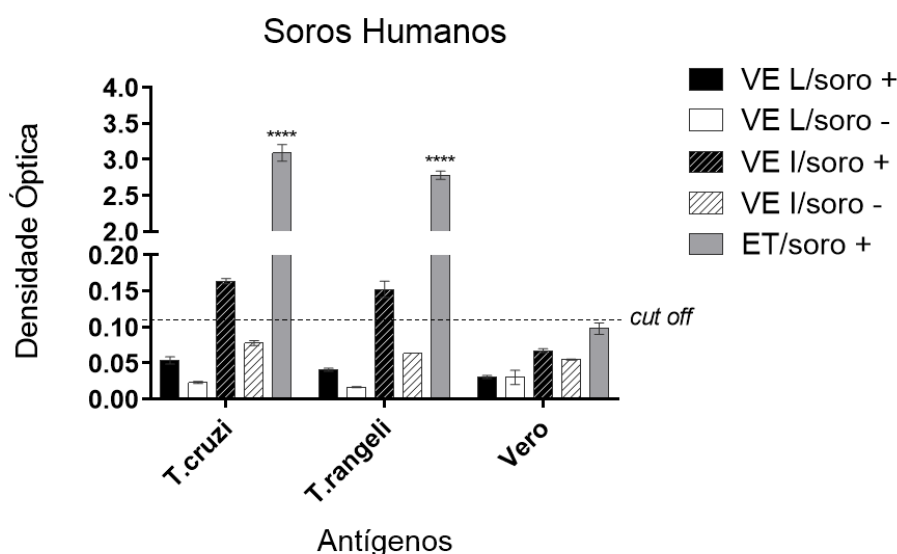
Posto que estudos anteriores do nosso grupo detectaram a imunogenicidade e reatividade cruzada de VEs íntegras de *T. cruzi* e *T. rangeli*, por meio de ELISA, frente à todos os soros murinos e humanos à disposição (figura 7) (VEDAM *et al.*, 2017; VEDAM, 2017), suspeitou-se que a ausência de imurreatividade nos ensaios de

WB e ELISA poderia estar ocorrendo devido à lise das VEs durante a extração proteica e/ou às condições desnaturantes do SDS-PAGE.

Desse modo, os experimentos foram repetidos comparando os extratos de VEs lisadas (VEs L) com amostras de VEs íntegras (VEs I), as últimas foram ressuspensas apenas no diluente PBS sem sofrer nenhum processo de lise das suas membranas, conforme as condições experimentais de Vedam *et al.* (2017).

A partir dessa comparação (figura 15) foi possível perceber uma relação entre a integridade da estrutura das VEs e a sua imunorreatividade, uma vez que os soros testados foram reativos apenas às amostras de VEs íntegras de *T. cruzi* e de *T. rangeli*, e de forma específica, visto que VEs íntegras de células Vero resultaram em reação negativa.

Figura 15. Comparação da imunogenicidade de vesículas extracelulares lisadas e íntegras de *T. cruzi* e *T. rangeli* frente aos soros humanos com a forma cardíaca da doença de Chagas



Fonte: As autoras.

Notas: Resultados expressos como média e desvio padrão de duplicatas com o valor de branco (0,067) subtraído. Sensibilização com 500 ng/poço para ET e VE, ou o equivalente à VEs de aproximadamente 1×10^7 epimastigotas de *T. cruzi*, 5×10^6 de *T. rangeli* e 1×10^6 de células Vero. Cut off=0,11 (determinado a partir do ET de Vero) e **** $p < 0,0001$ one-way ANOVA (soro +: forma cardíaca, soro -: negativo).

Na literatura, o perfil imunogênico de VEs em soro de pacientes chagásicos já foi demonstrado por meio de WB em condições desnaturantes, mas somente para VEs totais da interação do *T. cruzi* com células de mamíferos (BAUTISTA-LÓPEZ *et al.*, 2017; RAMIREZ *et al.*, 2017). No caso de VEs provenientes de cultivo axênico do

parasito, apenas a presença de proteínas alvos, como glicoproteínas (GP82, GP35/50, GP85), FCaBP, TS, cruzipaina e α -glactose, foram visualizadas por WB mediante o uso de anticorpos específicos (BAYER-SANTOS *et al.*, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2018, TORRECILHAS *et al.*, 2009), e não com soro policlonal como no nosso estudo.

Assim, tomados em conjunto, esses resultados sugerem que a imunogenicidade e reatividade sorológica cruzada observadas nas VEs de *T. cruzi* e *T. rangeli* ocorrem provavelmente a partir de antígenos de membrana, além de serem dependentes da conformação nativa de proteínas, uma vez que lisadas e/ou em condições desnaturantes (SDS-PAGE) não houve a imunorreação no WB nem no ELISA.

5.4 ANÁLISE COMPARATIVA DO PROTEOMA DE VESÍCULAS EXTRACELULARES SECRETADAS POR TRIPANOSOMAS

A investigação do proteoma das VEs, afim de identificar as proteínas antigênicas presentes em VEs de formas epimastigotas de *T. rangeli* e de formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*, tanto proteínas em comum aos parasitos como exclusivas à alguma das formas, resultou na detecção de 424 proteínas distintas.

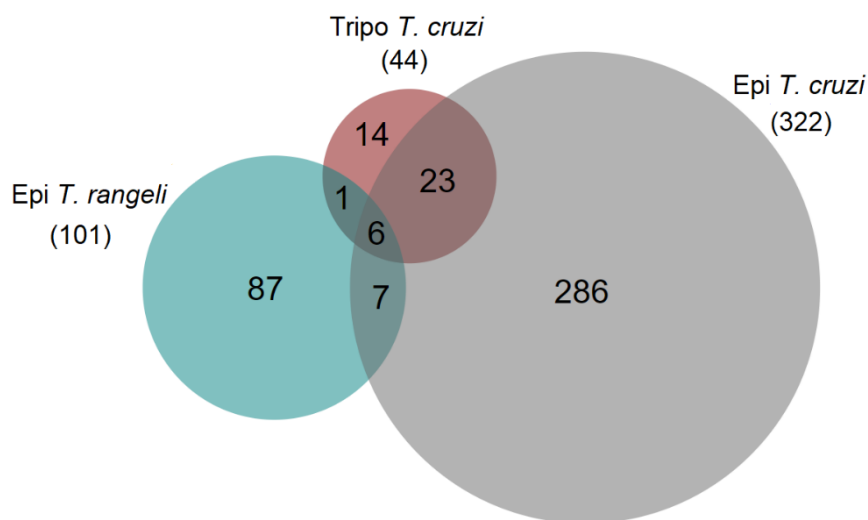
No total, foram identificadas 101 proteínas nas VEs isoladas de epimastigotas de *T. rangeli*, 322 nas de epimastigotas de *T. cruzi* e 44 nas VEs de tripomastigotas de *T. cruzi*. As semelhanças entre cada proteoma estão representadas na figura 16.

O baixo número de proteínas identificadas para as VEs de tripomastigotas de *T. cruzi* chamou a atenção, a forma utilizada foi de tripomastigotas derivados de células de cultura (TCTs). Isso pode ter ocorrido devido à característica biológica desse estágio ser não-replicativo e apresentar níveis de expressão gênicos diferentes aos de epimastigotas (GODOY *et al.*, 2012; MARTINS *et al.*, 2015). Todavia, não podemos descartar a possibilidade que esse número seja reflexo de alguma limitação técnica.

Bayer-Santos e colaboradores (2013) detectaram 345 proteínas secretadas por epimastigotas de *T. cruzi* Dm28c e 265 por tripomastigotas metacíclicos da mesma cepa, um estágio evolutivo molecularmente diferente dos TCTs (KESSLER *et al.*, 2017), sendo que 243 dessas proteínas foram comuns à ambas as formas. Já Ribeiro

e colaboradores (2018) identificaram 197 proteínas em VEs de tripomastotas (TCTs) da cepa Y e 140 em VEs da cepa YuYu, a partir do seu isolamento por cromatografia (SEC), diferentemente do nosso trabalho que utilizou a ultracentrifugação.

Figura 16. Diagrama de Venn mostrando proteínas comuns e únicas identificadas nas VEs secretadas por epimastigotas de *T. rangeli* e por epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*



Fonte: As autoras.

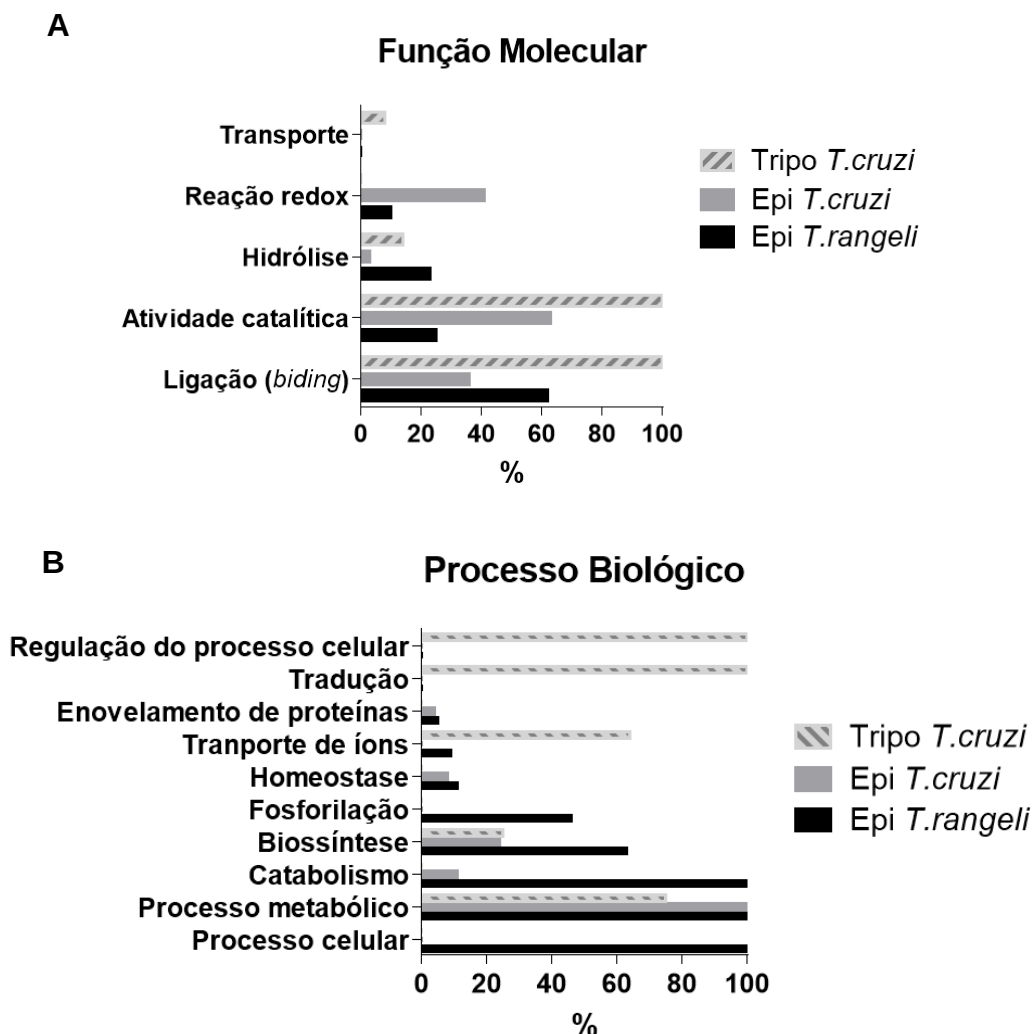
Notas: Referente às proteínas identificadas com pelo menos 2 peptídeos únicos em pelo menos uma réplica, e ao menos 1 peptídeo único numa segunda réplica. Epi= epimastigota, Tripo= tripomastigota (TCT). Diagrama criado com a ferramenta BioVenn (HULSEN *et al.*, 2018).

A despeito do número de proteínas detectadas, os dados mostraram semelhanças entre os componentes proteicos de VEs de epimastigotas e de tripomastigotas infectivos de *T. cruzi* (figura 16). Além de 14 proteínas em comum ao proteoma de VEs provenientes de *T. rangeli*.

De acordo com a análise de ontologia genética, o conteúdo proteico das amostras de VEs (figura 17A) revelou um enriquecimento de proteínas com funções enzimáticas nas VEs de todos os organismos, mesmo que em diferentes proporções. VEs de epimastigotas de *T. rangeli* e *T. cruzi* apresentaram similaridades de enriquecimento para todas as ontologias, enquanto as provenientes de tripomastigotas tiveram o enriquecimento mais diferenciado (figura 17).

Para a ontologia de componente celular, houve enriquecimento somente em VEs de tripomastigotas de *T. cruzi* e relacionado ao termo complexo proteico (*fold-enrichment*>100). Já em relação às anotações de via metabólica, o enriquecimento foi principalmente no metabolismo energético para todas as amostras, como nas vias da glicólise/gliconeogênese e síntese de ATP.

Figura 17. Enriquecimento diferencial de proteínas em vesículas extracelulares de tripanosomas



Fonte: As autoras.

Notas: Número percentual de termos associados à função molecular (A) e processo biológico (B), com base no *fold enrichment*. Os valores de 100% representam *fold-enrichment*>100. Epi= epimastigota, Tripo= tripomastigota.

O proteoma identificado das VEs secretadas por epimastigotas de *T. rangeli* (listado no apêndice A) exibiu diversos componentes frequentes em VEs, que já foram descritos para o secretoma de ambas as formas de *T. cruzi* (BAYER-SANTOS *et al.*, 2013). Dentre eles estão proteínas de choque térmico (ex.: HSP 70), chaperonas, proteínas associadas com filamentos (ex.: tubulina) e com tráfego (ex.: Rab1A), além de moléculas do metabolismo e da síntese proteica (WOWK *et al.*, 2017; THÉRY *et al.*, 2009; SILVERMAN; REINER, 2011).

As proteínas presentes em VEs de *T. rangeli* relacionadas com a interação parasito-hospedeiro (tabela 3) foram identificadas unicamente nesse organismo, não situando entre as proteínas em comum com VEs de *T. cruzi* (figura 16). Muitas delas,

exceto a calreticulina, são proteínas associadas à membrana plasmática via âncora de glicosilfosfatidilinositol-GPI ou de miristoil, no caso da FCaBP, e foram caracterizadas por Wagner *et al.* (2013) como proteínas da superfície de epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli*. Genes homólogos para essas proteínas em *T. cruzi* já foram identificados no genoma de *T. rangeli*, alguns inclusive com suporte de dados de transcriptoma (FERREIRA *et al.*, 2010; GRISARD *et al.*, 2010).

Tabela 3. Proteínas com função na interação parasito-hospedeiro identificadas nas vesículas extracelulares de *T. rangeli* e homólogas às proteínas de *T. cruzi*

Descrição da proteína	Acesso (IDs)	Peptídeos	Peptídeos únicos	Cobertura da sequência (%)	Peso molecular (kDa) ^a
Calreticulina	TRSC58_05116	9	7	24,1	45,366
Protease de superfície GP63 ^b	TRSC58_07141	6	6	15,2	66,415
Protease de superfície GP63 ^b	TRSC58_04178	2	2	12,0	20,991
Proteína de ligação ao cálcio flagelar (FCaBP) ^c	TRSC58_06706	7	5	39,0	23,296
Trans-sialidase ^b	TRSC58_06522	3	3	5,7	64,459

Fonte: As autoras.

Notas: ^a Peso molecular teórico, ^b Proteína com âncora de GPI, ^c Proteína ancorada em miristoil.

A GP63 compreende uma grande família de metaloproteases, com diferentes isoformas descritas em *T. cruzi* e *Leishmania* spp. (CUEVAS *et al.*, 2003), já tendo sido reportada nas VEs desses parasitos (BAYER-SANTOS *et al.*, 2013; MARSHALL *et al.*, 2018). De forma semelhante, a FCaBP também já foi descrita nas VEs de *T. cruzi* por Bayer-Santos e colaboradores (2013) e foi identificada neste trabalho em VEs provenientes de epimastigotas de *T. cruzi* através do identificador C4B63_35g99, tratam-se de proteínas homólogas com função na montagem e funcionalidade do flagelo que apresentam alta similaridade (PORCEL *et al.*, 1996). Ademais, essas duas

proteínas em questão já foram propostas como marcadores específicos para o diagnóstico diferencial de *T. rangeli* (WAGNER *et al.*, 2013).

Calreticulina e trans-sialidase (TS) também foram identificadas em VEs provenientes de *T. cruzi* por meio de identificadores (IDs) diferentes aos de *T. rangeli*, presenças em concordância com estudos anteriores (BAYER-SANTOS *et al.*, 2013). Apesar de serem homólogas, a TS de *T. rangeli* não possui atividade trans-sialidase (transferência de ácido siálico), um fator chave na adesão celular de *T. cruzi*, e mantém apenas a atividade de sialidase (AMAYA *et al.*, 2003). De modo que as evidências sugerem que essa enzima seja necessária para o estabelecimento da infecção do *T. rangeli* no inseto vetor, e que a falta de atividade catalítica de TS poderia estar relacionada com a baixa virulência desse parasito nos hospedeiros vertebrados (STOCO *et al.*, 2014).

Mesmo não situando dentre as proteínas encontradas em comum no proteoma das VEs estudadas, essas proteínas de superfície de membrana presentes nas VEs de epimastigotas de *T. rangeli* (tabela 3) são homólogas à diferentes fatores de virulência de *T. cruzi*, e poderiam ser responsáveis pelo padrão de imunorreatividade das VEs relatado neste trabalho (item 5.3), bem como pela reatividade sorológica cruzada entre as VEs dos parasitos (VEDAM *et al.*, 2017).

Visto que a antigenicidade dessas moléculas – GP63, FCaBP e TS – já foram demonstradas por *immunoblotting* na literatura (SALDAÑA *et al.*, 2002; BAYER-SANTOS *et al.*, 2013; WAGNER *et al.*, 2013), os dados obtidos sobre o proteoma das VEs de *T. rangeli* corroboram com o potencial imuno protetor dessas VEs e/ou a sua aplicação como biomarcador.

5.5 ANTIGENICIDADE *IN SILICO* DAS PROTEÍNAS DE VESÍCULAS EXTRACELULARES IDENTIFICADAS

A fim de complementar os dados adquiridos pela análise de proteômica, e superar as limitações encontradas na técnica de WB, foi adotada uma estratégia de avaliação da antigenicidade das amostras por meio de ferramentas de imunoinformática. Considerando as 14 proteínas encontradas em comum nas VEs de formas epimastigotas de *T. rangeli* e VEs de formas epimastigotas e/ou tripomastigotas de *T. cruzi* (tabela 4), que são do interesse do nosso estudo, foi possível perceber a presença de vários dos componente característico de VEs: como

proteínas de citoesqueleto, choque térmico, formação de MVB (ubiquitina relacionada), metabolismo de proteínas (glutamato desidrogenase) e relacionadas à transcrição e síntese proteica (BAYER-SANTOS *et al.*, 2013; SILVERMAN; REINER, 2011).

Tabela 4. Descrição das 14 proteínas identificadas em comum no proteoma de vesículas extracelulares de *T. rangeli* e *T. cruzi*

Descrição da proteína	Acesso (IDs)	Peptídeos únicos			Peso molecular (kDa) ^a
		R	C	T	
Alpha tubulina	C4B63_51g126	5	6	5	49,799
Beta tubulina	C4B63_51g127	8	8	7	49,700
Fator de iniciação eucariótico 4A	TRSC58_04008	6	6	-	45,636
Fator de ribosilação do ADP tipo 3 (Arf-3)	TRSC58_06196	4	-	2	20,256
Glutamato desidrogenase	C4B63_57g131	3	18	5 ^c	48,817
HSP 70 kDa, precursor mitocondrial	C4B63_18g293	2	7	-	71,043
<i>Kinetoplastid membrane protein 11 (KMP-11)</i> ^b	C4B63_2g165c	2	2	-	10,883
Peroxirredoxina	C4B63_149g19	2	4	-	25,522
Pirofosfatase de próton vacuolar 1 ^b	C4B63_44g146	3	9	8 ^c	85,422
Poliubiquitina (fragmento)	C4B63_292g27	4	4	4	17,445
Porina da membrana externa mitocondrial	C4B63_34g299	3	8	2	29,643
Proteína 14-3-3 tipo 1	C4B63_39g344	3	5	4	29,979
RABA1A relacionada com Ras	C4B63_45g134	3	5	3	22,431
Seril-tRNA sintetase	C4B63_70g63	2	2	-	53,392

Fonte: As autoras.

Notas: A presença da proteína na amostra está representada pelo número de peptídeos únicos >1, sendo R=VEs de epimastigotas de *T. rangeli*, C=VEs de epimastigotas de *T. cruzi* e T=VEs de tripomastigotas de *T. cruzi*. ^a Peso molecular teórico, ^b Proteínas com epítomos identificados no IEDB, ^c Proteínas que não passaram no critério de presença na amostra, mas possuem um número significativo de peptídeos únicos em apenas uma das réplicas.

Uma vez que algumas dessas moléculas já foram apontadas como proteínas que potencialmente poderiam gerar epítomos de MHC I contra tripomastigotas de *T. cruzi* (SANTOS JUNIOR *et al.*, 2018), reforçando o caráter imunogênico das VEs de

T. rangeli, foi realizada uma busca por epítomos nos proteomas das VEs através do IEDB para investigar essa suspeita. A partir dessa busca foram encontradas duas proteínas no proteoma das VEs de epimastigotas de *T. rangeli*, e situadas entre as 14 em comum, com a presença de epítomos identificados (tabela 5).

Outras proteínas descritas na tabela 4 também tiveram epítomos identificados, como a Beta tubulina, HSP70 mitocondrial e a glutamato desidrogenase. Porém, com o nível de confiança baixo, no qual alguns, mas não todos os epítomos foram encontrados em uma determinada proteína, e a proteína não foi identificada pelo BLAST.

Tabela 5. Proteínas em comum no proteoma de vesículas extracelulares de *T. rangeli* e *T. cruzi* com epítomos indentificados

Acesso (IDs)	Descrição da proteína	Sequência do epítopo	Localização na proteína	Confiança
C4B63_2g165c	Kinetoplastid membrane protein 11 (KMP-11)	41158 MATTLEEFSAKLDRDL	1_16	Média
C4B63_2g165c	Kinetoplastid membrane protein 11 (KMP-11)	9997 DRLDAEFAKKMEEQNK	13_28	Média
C4B63_2g165c	Kinetoplastid membrane protein 11 (KMP-11)	13888 EQNKFFADKPDESTL	25_40	Média
C4B63_2g165c	Kinetoplastid membrane protein 11 (KMP-11)	8175 DESTLSPEMKEHYEK	36_50	Média
C4B63_2g165c	Kinetoplastid membrane protein 11 (KMP-11)	30719 KFEKMIQEHTDKFNKKM	50_66	Média
C4B63_2g165c	Kinetoplastid membrane protein 11 (KMP-11)	17181 FNKKMHEHSEHFKAFAE	62_79	Média
C4B63_44g146	Pirofosfatase de próton vacuolar 1	16977 FLYAEYRYM	137_145	Média
C4B63_44g146	Pirofosfatase de próton vacuolar 1	16070 FGTLIFFLL	152_160	Média
C4B63_44g146	Pirofosfatase de próton vacuolar 1	18109 FTYMMYPLL	374_382	Média
C4B63_44g146	Pirofosfatase de próton vacuolar 1	5111 ATQAALQQM	682_690	Média
C4B63_44g146	Pirofosfatase de próton vacuolar 1	69478 VLFGRYTLA	106_714	Média

Fonte: As autoras.

Notas: Os epítomos foram identificados pela base de dados *Immune Epitope Database and Analysis Resource* (IEDB) para o organismo *Trypanosoma cruzi* Dm28c 2018.

O proteoma das VEs de epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* tiveram outras 22 proteínas com epítomos identificados pelo IEDB, com nível de confiança médio. Destas, vale ressaltar as proteínas que foram comuns às VEs de ambas as

formas, como a trans-sialidase do grupo II (C4B63_24g328), *heat shock protein* 70 (C4B63_6g317) e *heat shock protein* 85 (C4B63_84g89).

O KMP-11 (tabela 5) é um antígeno com 92 aminoácidos presente em uma ampla variedade de tripanosomatídeos, sendo um alvo da resposta imune humoral do hospedeiro contra infecções por *Leishmania* spp. e *T. cruzi*, no qual induz uma resposta imunoprotetora (DIEZ *et al.*, 2006). Dessa forma, o KMP-11 é considerado como um potencial candidato à vacina para ambos os parasitos (MENDONÇA *et al.*, 2015; RIOS *et al.*, 2019).

O antígeno KMP-11 de *T. rangeli* compartilha 97% de identidade de aminoácidos com seu homólogo de *T. cruzi* (DIEZ *et al.*, 2005), e está distribuído pelo citoplasma, membrana, flagelo e bolsa flagelar, provavelmente associado ao citoesqueleto desse protozoário (DIEZ *et al.*, 2008). Como esse antígeno é um alvo da resposta imune em mamíferos, o alto número de genes da família KMP-11 presente em *T. rangeli* pode ter contribuído para a baixa patogenicidade desse organismo (STOCO *et al.*, 2014). Assim, a presença desse antígeno nas VEs de epimastigotas de *T. rangeli*, descoberta neste estudo, pode ser explorada para a indução de uma resposta imuno protetora contra o *T. cruzi*.

Já a pirofosfatase de próton vacuolar (tabela 5) está mais relacionada com a manutenção das funções celulares dos parasitos, importante para a resistência do *T. cruzi* às condições de estresse osmótico no hospedeiro (GALIZZI *et al.*, 2013). Além disso, já foi relatado atividade de exoenzima para uma pirofosfatase (H^+ -PPase) de *T. rangeli* (FONSECA-DE-SOUZA *et al.*, 2014).

Em conjunto, os dados obtidos pela análise *in silico* do proteoma das VEs demonstraram concordância com a semelhança antigênica observada experimentalmente entre as VEs de epimastigotas de *T. cruzi* e *T. rangeli*, sugerindo a realização de estudos adicionais para investigar o potencial vacinal das VEs de *T. rangeli* para a doença de Chagas.

6 CONCLUSÕES

- O extrato total de proteínas de VEs de epimastigotas de *T. cruzi* e *T. rangeli* apresentaram bandas em comum de peso molecular próximo de 50 kDa;
- A imunorreatividade das VEs de *T. cruzi* e *T. rangeli* foi dependente da integridade dessas estruturas, nas condições deste estudo.
- Foram identificadas 101 proteínas em VEs de epimastigotas de *T. rangeli*, 322 em VEs de epimastigotas de *T. cruzi* e 44 em VEs de tripomastigotas de *T. cruzi*;
- O proteoma das VEs de *T. rangeli* apresentou 14 proteínas em comum e 5 proteínas homólogas ao proteoma das VEs de *T. cruzi*;
- KMP-11 e pirofosfatase de próton vacuolar 1, presentes nas VEs de ambos *T. cruzi* e *T. rangeli*, tiveram epítomos indentificados *in silico*.

REFERÊNCIAS

- AGGIO, J. B. **Avaliação do potencial imunomodulador de vesículas extracelulares secretadas por *Trypanosoma rangeli* e seu efeito na infecção por *Trypanosoma cruzi* in vitro**. Dissertação de Mestrado – Instituto Carlos Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Curitiba, 2017.
- AKERS, J. C.; GONDA, D.; KIM, R.; CARTER, B. S.; CHEN, C. C. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 113, n. 1, p. 1-11, 2013.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN, D.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 6. ed. Artmed, 2017.
- AMAYA, M. F.; BUSHIAZZO, A.; NGUYEN, T.; ALZARI, P. M. The high resolution structures of free and inhibitor-bound *Trypanosoma rangeli* sialidase and its comparison with *T. cruzi* Trans-sialidase. **Journal of Molecular Biology**, v. 325, n. 4, p.773-784, 2003.
- APARICIO-BURGOS, J. E.; ZEPEDA-ESCOBAR, J. A.; OCA-JIMENEZ, R. M. de; ESTRADA-FRANCO, J. G.; BARBABOSA-PLIEGO, A.; OCHOA-GARCÍA, L.; ALEJANDRE-AGUILAR, R.; RIVAS, N.; PEÑUELAS-RIVAS, G.; VAL-ARREOLA, M. GUPTA, S.; SALAZAR-GARCÍA, F.; GARG, N. J.; VÁZQUEZ-CHAGOYÁN, J. C. Immune protection against *Trypanosoma cruzi* induced by TcVac4 in a canine model. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 4, 2015.
- AUFDERHEIDEA, A. C.; SALO, W.; MADDEN, M.; STREITZ, J.; BUIKSTRA, J.; GUHL, F.; ARRIAZA, B.; RENIER, C.; WITTMERS JR, L. E.; FORNACIARI, G.; ALLISON, M. A 9,000-year record of Chagas' disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 7, p. 2034-2039, 2004.
- BARTENEVA, N. S.; MALTSEV, N.; VOROBJEV, I. A. Microvesicles and intercellular communication in the context of parasitism. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, n. 49, 2013.
- BASSO, B.; CASTRO, I.; INTROINI, V.; GIL, P.; TRUYENS, C.; MORETTI, E. Vaccination with *Trypanosoma rangeli* reduces the infectiousness of dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Vaccine**, v. 25, n. 19, p. 3855-3858, 2007.
- BASSO, B.; CERVETTA, L.; MORETTI, E.; CARLIER, Y.; TRUYENS, C. Acute *Trypanosoma cruzi* infection: IL-12, IL-18, TNF, sTNFR and NO in *T. rangeli*-vaccinated mice. **Vaccine**, v. 22, n. 15-16, p. 1868–1872, 2004.
- BASSO, B.; MARINI, V.; GAUNA, D.; FRIAS, M. Vaccination of dogs with *Trypanosoma rangeli* induces antibodies against *Trypanosoma cruzi* in a rural area of Córdoba, Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 4, p. 271-274, 2016.

BASSO, B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. **World Journal of Experimental Medicine**, v.3, n.1, p. 1-10, 2013.

BASSO, B.; MORETTI, E. Experimental Chagas disease: Therapeutic Vaccination with *Trypanosoma rangeli* Modulates the Antibody Response and Helps to Control *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Veterinary Medicine and Research**, v. 4, n. 1, p. 1066-1070, 2017.

BASSO, B.; MORETTI, E.; FRETES, R. Vaccination with epimastigotes of different strains of *Trypanosoma rangeli* protects mice against *Trypanosoma cruzi* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 4, p. 370-374, 2008.

BASSO, B.; MORETTI, E.; FRETES, R. Vaccination with *Trypanosoma rangeli* induces resistance of guinea pigs to virulent *Trypanosoma cruzi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 157, n. 1-2, p. 199-123, 2014.

BASTOS, C. J. C.; ARAS, R.; MOTA, G.; REIS, F.; DIAS, J. P.; JESUS, R. S. de; FREIRE, M. S.; ARAÚJO, E. G. de; PRAZERES, J.; GRASSI, M. F. R. Clinical outcomes of thirteen patients with acute Chagas disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in Northeastern Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 6, 2010.

BAUTISTA-LÓPEZ, N. L.; NDAO, M.; CAMARGO, F. V.; NARA, T. ANNOURA, T.; HARDIE, D. B.; BORCHERS, C. H.; JARDIM, A. Characterization and diagnostic application of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote excreted-secreted antigens shed in extracellular vesicles released from infected mammalian cells. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, p. 744-758, 2017.

BAYER-SANTOS, E.; AGUILAR-BONAVIDES, C.; RODRIGUES, S. P.; CORDERO, E. M.; MARQUES, A. F.; VARELA-RAMIREZ, A.; CHOI, H.; YOSHIDA, N.; SILVEIRA, J. F. da; ALMEIDA, I. C. Proteomic Analysis of *Trypanosoma cruzi* secretome: characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins. **Journal of Proteome Research**, v.12, n. 2, p. 883-897, 2013.

BONA, E. de; LIDANI, K. C. F.; BAVIA, L.; OMIDIAN, Z.; GREMSKI, L. H.; SANDRI, T. L.; REASON, I. J. de M. Autoimmunity in chronic Chagas disease: a road of multiple pathways to cardiomyopathy? **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1-8, 2018.

BONNEY, K. M.; ENGMAN, D. M. Autoimmune pathogenesis of Chagas heart disease. Looking back, looking ahead. **The American Journal of Pathology**, v. 185, n. 6, p. 1537-1547, 2015.

BONNEY, K. M.; TAYLOR, J. M.; DANIELS, M. D.; EPTING, C. L.; ENGMAN, D. M. Heat-killed *Trypanosoma cruzi* induces acute cardiac damage and polyantigenic autoimmunity. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, 2011.

BORGES, B. C.; UEHARA, I. A.; DIAS, L. O. S.; BRÍGIDO, P. C.; SILVA, C. V. da; SILVA, M. J. B. Mechanisms of Infectivity and Evasion Derived from Microvesicles Cargo Produced by *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, 2016.

BOSCARDIN, S. B.; TORRECILHAS, A. C. T.; MANARIN, R.; REVELLI, S.; REY, E. G.; TONELI, R. R.; SILBER, A. M. Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, p. 1373-1384, 2010.

BRADFORD, M. M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BREGANÓ, J. W.; PICÃO, R. C.; GRAÇA, V. K.; MENOLI, R. A.; JANKEVICIUS, S. I.; PINGE FILHO, P.; JANKEVICIUS, J. V. *Phytomonas serpens*, a tomato parasite, shares antigens with *Trypanosoma cruzi* that are recognized by human sera and induce protective immunity in mice. **Pathogens and Disease**, v. 39, n. 3, p. 257-264, 2003.

BRENER, Z.; CHIARI, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 5, n. 5, p. 220-224, 1963.

CAVALIER-SMITH, T. Higher classification and phylogeny of Euglenozoa. **European Journal of Protistology**, v. 56, p. 250-276, 2016.

CERISOLA, J. A. Chemotherapy of Chagas' infection in man. **PAHO Scientific Publication**, v. 347, p. 35-47, 1977.

CERVETTA, L.; MORETTI, E.; BASSO, B. Experimental Chagas' disease: the protection induced by immunization with *Trypanosoma rangeli* is associated with down-regulation of IL-6, TNF- α , and IL-10 synthesis. **Acta Parasitologica**, v. 47, n.1, p. 73-78, 2002.

CESTARI, I.; ANSA-ADDO, E.; DEOLINDO, P.; INAL, J. M.; RAMIREZ, M. I. *Trypanosoma cruzi* immune evasion mediated by host cell-derived microvesicles. **The Journal of Immunology**, v. 188, p. 1942-1952, 2012.

CESTARI, I. dos S.; EVANS-OSSES, I.; FREITAS, J. C.; INAL, J. M.; RAMIREZ, M. I. Complement C2 receptor inhibitor trispanning confers an increased ability to resist complement-mediated lysis in *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 198, p. 1276-1283, 2008.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159-218, 1909.

CIMADOR, A. L.; GALANTE, E. L.; MUÑOZ, L. I.; ROMANO, P. S.; LOSINNO, A. D.; VANRELL, M. C. *Trypanosoma rangeli*: growth in mammalian cells in vitro and action of a repositioned drug (17-AAG) and a natural extract (*Artemisia* sp. essential oil). **BIOCELL**, v. 43, n. 1, p. 13-19, 2019.

COSTA, R. W.; SILVEIRA, J. F. da; BAHIA, D. Interactions between *Trypanosoma cruzi* secreted proteins and host cell signaling pathways. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.

COURA, J. R. Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 8, p. 962-967, 2013.

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

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 31-40, 2009.

COURA, J. R.; FERNANDES, O.; ARBOLEDA, M.; BARRET, T. V.; CARRARA, N.; DEGRAVE, W.; CAMPBELL, D. A. Human Infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 3, p. 278-279, 1996.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature Outlook: Chagas Disease**, v. 465, n. 7301, p. S3-S22, 2010.

COX, J.; MANN, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. **Nature Biotechnology**, v. 26, p. 1367-1372, 2008.

CRONEMBERGER-ANDRADE, A.; XANDER, P.; SOARES, R. P.; PESSOA, N. L.; CAMPOS, M. A.; ELLIS, C. C.; GRAJEDA, B.; OFIR-BIRIN, Y.; ALMEIDA, I. C.; REGEV-RUDZKI, N.; TORRECILHAS, A. C. *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**, v. 10, 2020.

CUEVAS, I. C.; CAZZULO, J. J.; SÁNCHEZ, D. O. gp63 homologues in *Trypanosoma cruzi*: surface antigens with metalloprotease activity and a possible role in host cell infection. **Infection and Immunity**, v. 71, n.10, p. 5739-5749, 2003.

DARIO, M. A.; MORATELI, R.; SCHWABL, P.; JANSEN, A. M.; LLEWELLYN, M. S. Small subunit ribosomal metabarcoding reveals extraordinary trypanosomatid diversity in Brazilian bats. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, 2017.

DA SILVA, R. V.; MALVEZI, A. D.; AUGUSTO, L. da S.; KIAN, D.; TATAKIHARA, V. L. H.; YAMAUCHI, L. M.; YAMADA-OGATTA, S. F.; RIZZO, L. V.; SCHENKMAN, S.; PINGE-FILHO, P. Oral exposure to *Phytomonas serpens* attenuates thrombocytopenia and leukopenia during acute Infection with *Trypanosoma cruzi*. **PLoS ONE**, v.8, n.7, 2013.

DEOLINDO, P.; EVANS-OSSES, I.; RAMIREZ, M. I. Microvesicles and exosomes as vehicles between protozoan and host cell communication. **Biochemical Society Transactions**, v. 41, p. 252-257, 2013.

DIAS, F. B. S.; DIOTAIUTI, L.; ROMANHA, A. J.; BEZERRA, C. M.; MACHADO, E. M. de M. First report on the occurrence of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 in the state of Ceará, Brazil, in naturally infected triatomine *Rhodnius nasutus* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 1-3, 2007.

DIEZ, H.; LÓPEZ, M. C.; THOMAS, M. del C.; GUZMÁN, F.; ROSAS, F.; VELAZCO, V.; GONZÁLEZ, J. M. PUERTA, C. Evaluation of IFN- γ production by CD8⁺ T lymphocytes in response to the K1 peptide from KMP-11 protein in patients infected with *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunology**, v. 28, n.3, p. 101-105, 2006.

DIEZ, H.; SARMINETO, L.; CALDAS, M. L.; MONTILLA, M.; THOMAS, M. del C.; LÓPEZ, M. C.; PUERTA, C. Cellular location of KMP-11 protein in *Trypanosoma rangeli*. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 8. n. 1, 2008.

DIEZ, H.; THOMAS, M. C.; URUEÑA, C. P.; SANTANDER, S. P.; CUERVO, C. L.; LÓPEZ, M. C.; PUERTA, C. J. Molecular characterization of the kinetoplastid membrane protein-11 genes from the parasite *Trypanosoma rangeli*. **Parasitology**, v. 130, p. 643-651, 2005.

DOS REIS, G. A. Evasion of immune responses by *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 2, p. 84-90, 2011.

EGER-MANGRICH, I.; OLIVEIRA, M. A. de; GRISARD, E. C.; SOUZA, W. de; STEINDEL, M. Interaction of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 with different cell lines *in vitro*. **Parasitology Research**, v.87, p.505-509, 2001.

EPTING, C. L.; COATESA, B. M.; ENGMAN, D. M. Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v.126, n. 3, p. 283-291, 2010.

ESPINOSA-ÁLVAREZ, O.; ORTIZ, P. A.; LIMA, L.; COSTA-MARTINS, A. G.; SERRANO, M. G.; HERDER, S.; BUCK, G. A.; CAMARGO, E. P.; HAMILTON, P. B.; STEVENS, J. R.; TEIXEIRA, M. M. G. *Trypanosoma rangeli* is phylogenetically closer to Old World trypanosomes than to *Trypanosoma cruzi*. **International Journal for Parasitology**, v. 48, p. 569-584, 2018.

FERREIRA, A. V. M.; SEGATTO, M.; MENEZES, Z.; MACEDO, A. M.; GELAPE, C.; ANDRADE, L. de O.; NAGAJYOTHI, F.; SCHERER, P. E.; TEIXEIRA, M. M.; TANOWITZ, H. B. Evidence for *Trypanosoma cruzi* in adipose tissue in human chronic Chagas disease. **Microbes and Infection**, v.13, n. 12-13, p. 1002-1005, 2011.

FERREIRA, K. A. M.; RUIZ, J. C.; DIAS, F. C.; LARGES-SILVA, E.; TOSI, L. R. O.; RAMÍREZ, L. E.; PEDROSA, A. L. Genome survey sequence analysis and

identification of homologs of major surface protease (gp63) genes in *Trypanosoma rangeli*. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, n. 9, p. 847-853, 2010.

FONSECA-DE-SOUZA, A. L.; FREITAS-MESQUITA, A. L.; VIEIRA, L. P.; MAJEROWICZ, D.; DAFLON-YUNES, N.; SOARES-DE-MEDEIROS, L. C. A.; MIRANDA, K.; GONDIM, K. C.; MEYER-FERNANDES, J. B. Identification and characterization of an ecto-pyrophosphatase activity in intact epimastigotes of *Trypanosoma rangeli*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, 2014.

FREITAS, L. M. *et al.* Genomic analyses, gene expression and antigenic profile of the trans-aialidase superfamily of *Trypanosoma cruzi* reveal an undetected level of complexity. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, 2011.

GALIZZI, M.; BUSTAMANTE, J. M.; FANG, J.; MIRANDA, K.; MEDEIROS, L. C. S.; TARLETON, R. L.; DOCAMPO, R. Evidence for the role of vacuolar soluble pyrophosphatase and inorganic polyphosphate in *Trypanosoma cruzi* persistence. **Molecular Microbiology**, v. 90, n. 4, p. 699-715, 2013.

GARCIA-SILVA, M. R.; NEVES, R. F. C. das; CABRERA-CABRERA, F.; SANGUINETTI, J.; MEDEIROS, L. C.; ROBELLO, C.; NAYA, H.; FERNANDEZ-CALERO, T.; SOUTO-PADRON, T.; SOUZA, W. de; CAYOTA, A. Extracellular vesicles shed by *Trypanosoma cruzi* are linked to small RNA pathways, life cycle regulation, and susceptibility to infection of mammalian cells. **Parasitology Research**, v. 113, p.285-304, 2014.

GODOY, L. M. F. de; MARCHINI, F. K.; PAVONI, D. P.; RAMPAZZO, R. de C. P.; PROBST, C. M.; GOLDENBERG, S.; KRIEGER, M. A. Quantitative proteomics of *Trypanosoma cruzi* during metacyclogenesis. **Proteomics**, v. 12, n. 17, p. 2694-2703, 2012.

GONÇALVES, M. F.; UMEZAWA, E. S.; KATZIN, A. M.; SOUZA, W. de; ALVES, M. J. M.; ZINGALES, B.; COLLI, W. *Trypanosoma cruzi*: shedding of surface antigens as membrane vesicles. **Experimental Parasitology**, v. 72, p. 43-53, 1991.

GOLDMAN, A.; HARPER, S.; SPEICHER, D. W. Detection of proteins on blot membranes. **Current Protocols in Protein Science**, v. 86, 2017.

GRAÇA-DE-SOUZA, V. K.; MONTEIRO-GÓES, V.; MANQUE, P.; SOUZA, T. A. C. B.; CORRÊA, P. R. C.; BUCK, G. A.; ÁVILA, A. R.; YAMAUCHI, L. M.; PINGE-FILHO, P.; GOLDENBERG, S.; KRIEGER, M. A.; YAMADA-OGATTA, S. Sera of Chagasic patients react with antigens from the tomato parasite *Phytomonas serpens*. **Biological Research**, v. 43, n. 2, p. 233-241, 2010.

GRISARD, E. C. *et al.* Transcriptomic analyses of the avirulent protozoan parasite *Trypanosoma rangeli*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 174, p. 18-25, 2010.

GRISARD, E. C. STEINDEL, M.; GUARNERI, A. A.; EGER-MANGRICH, I.; CAMPBELL D. A.; ROMANHA, A. J. Characterization of *Trypanosoma rangeli* strains

isolated in Central and South America: an overview. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 2, p. 203-209, 1999.

GRISARD, E. C.; STEINDEL, M. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2004. cap. 12. p. 109-113.

GRISARD, E. C.; STOCO, P. H.; WAGNER, G.; SINCERO, T. C. M.; ROTAVA, G.; RODRIGUES, J. B.; SNOEIJER, C. Q.; KOERICH, L. B.; SPERANDIO, M. M.; BAYER-SANTOS, E.; FRAGOSO, S. P.; GOLDENBERG, S.; TRIANA, O.; VELLEJO, G. A.; TYLER, K. M.; DÁVILA, A. M. R.; STEIDEL, M. Transcriptomic analyses of the avirulent protozoan parasite *Trypanosoma rangeli*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 174, p. 18-25, 2010.

GRUPTA, S.; SALGADO-JIMÉNEZ, B.; LOKUGAMAGE, N.; VÁZQUEZ-CHAGOYÁN, J. C.; GARG, N. J. TcG2/TcG4 DNA Vaccine induces Th1 immunity against acute *Trypanosoma cruzi* infection: adjuvant and antigenic effects of heterologous *T. rangeli* booster immunization. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 2019.

GUEVARA, P.; DIAS, M.; ROJAS, A.; CRISANTE, G.; ABREU-BLANCO, M. T.; UMEZAWA, E.; VAZQUEZ, M.; LEVIN, M.; AÑEZ, N.; RAMIREZ, J. L. Expression of fluorescent genes in *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): its application to parasite-vector biology. **Journal of Medical Entomology**, v. 42, n. 1, p. 48-56, 2005.

GUHL, F.; VALLEJO, G. A. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920 - an updated review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 435-442, 2003.

GYÖRGY, B.; SZABÓ, T. G.; PÁSZTÓI, M.; PÁL, Z.; MISJÁK, P.; ARADI, B.; LÁSZLÓ, V.; PÁLLINGER, É.; PAP, E.; KITTEL, Á.; NAGY, G.; FALUS, A.; BUZÁS, E. I. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 16, p. 2667-2688, 2011.

HULSEN, T.; VLIEG, J. de; ALKEMA, W. BioVenn – a web application for the comparison and visualization of biological lists using area-proportional Venn diagrams. **BMC Genomics**, v. 9, 2018.

KESSLER, R. L.; CONTRERAS, V. T.; MARLIÉRE, N. P.; GUARNERI, A. A.; SILVA, L. H. V.; MAZZAROTTO, G. A. C. A.; BATISTA, M.; SOCCOL, V. T.; KRIEGER, M. A.; PROBST, C. M. Recently differentiated epimastigotes from *Trypanosoma cruzi* are infective to the mammalian host. **Molecular Microbiology**, v.104, n. 5, p. 712-736, 2017.

LENER, T. *et al.* Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials – an ISEV position paper. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 4, n. 1, 2015.

LÖTVALL, J. *et al.* Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 3, n. 1, 2014.

LOVO-MARTINS, M. I.; MALVEZI, A. D.; ZANLUQUI, N. G.; LUCCHETTI, B. F. C.; TATAKIHARA, V. L. H.; MÖRKING, P. A.; OLIVEIRA, A. G. de; GOLDENBERG, S.; WOWK, P. F.; PINGE-FILHO, P. Extracellular vesicles shed by *Trypanosoma cruzi* potentiate infection and elicit lipid body formation and PGE₂ production in murine macrophages. **Frontiers in Immunology**, v 9, p. 1-16, 2018.

LUCENA, D. T.; MARQUES, R. J. Primeiro caso de infecção humana por *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920, no Brasil. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 11, p. 535-540, 1954.

MAIA DA SILVA, F.; MARCILI, A.; LIMA, L.; CAVAZZANA JR., M.; ORTIZ, P. A.; CAMPANER, M.; TAKEDA, G. F.; PAIVA, F.; NUNES, V. L. B.; CAMARGO, E. P.; TEIXEIRA, M. M. G. *Trypanosoma rangeli* isolates of bats from Central Brazil: genotyping and phylogenetic analysis enable description of a new lineage using spliced-leader gene sequences. **Acta Tropica**, v.109, p. 199-207, 2009.

MALVERN. Disponível em: <malvernpanalytical.com/en/products/technology/nanoparticle-tracking-analysis/>. Acesso em: 28 out. 2019.

MANDAL, S. Epidemiological aspects of Chagas disease - a review. **Journal of Ancient Diseases & Preventive Remedies**. v.2, n.2, p. 1-7, 2014.

MARCILLA, A.; MARTIN-JAULAR, L.; TRELIS, M.; MENEZES-NETO, A. de; OSUNA, A.; BERNAL, D.; FERNANDEZ-BECERRA, C.; ALMEIDA, I. C.; DEL PORTILLO, H. A. Extracellular vesicles in parasitic diseases. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 3, n. 1, 2014.

MARSHALL, S.; KELLY, P. H.; SINGH, B. K.; POPE, R. M.; KIM, P.; ZHANBOLAT, B.; WILSON, M. E.; YAO, C. Extracellular release of virulence factor major surface protease via exosomes in *Leishmania infantum* promastigotes. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 355, 2018.

MARTINS, N. O.; SOUZA, R. T. de; CORDERO, E. M.; MALDONADO, D. C.; CORTEZ, C.; MARINI, M. M.; FERREIRA, E. R.; BAYER-SANTOS, E.; ALMEIDA, I. C. de; YOSHIDA, N.; SILVEIRA, J. F. de. Molecular characterization of a novel family of *Trypanosoma cruzi* surface membrane proteins (TcSMP) involved in mammalian host cell invasion. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 11, 2015.

MELDOLESI, J. Exosomes and ectosomes in intercellular communication. **Current Biology**, v. 28, n. 8, 2018.

MENDONÇA, S. C. F. de; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; MATOS, D. C. de S. Kinetoplastid membrane protein-11 as a vaccine candidate and a virulence factor in *Leishmania*. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. 524, 2015.

MOLINARI, J.; MORENO, A. The correct subgeneric name of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 (Euglenozoa: Trypanosomatidae), a human-infective endoparasite of neotropical mammals. **Zootaxa**, v. 4418, n. 1, p. 98-100, 2018.

MOLYNEUX, D. Division of the human trypanosome, *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 67, n. 3, p. 371-372, 1973.

MORAES, M. H. de; GUARNERI, A. A.; GIRARDI, F. P.; RODRIGUES, J. B.; EGER, I.; TYLER, K. M.; STEINDEL, M.; GRISARD, E. C. Different serological cross-reactivity of *Trypanosoma rangeli* forms in *Trypanosoma cruzi*-infected patients sera. **Parasites & Vectors**, v.1, n. 20, 2008.

MOREIRA, L. R.; SERRANO, F. R.; OSUNA, A. Extracellular vesicles of *Trypanosoma cruzi* tissue-culture cell-derived trypomastigotes: induction of physiological changes in nonparasitized culture cells. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 2, 2019.

NASCIMENTO, A. P. M. do. **Estudo da dinâmica da co-infecção por *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* no hospedeiro invertebrado e no hospedeiro mamífero**. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

NEVES, R.F. FERNANDES, A. C. S.; MEYER-FERNANDES J. R.; SOUTOT-PADRÓN T. *Trypanosoma cruzi*-secreted vesicles have acid and alkaline phosphatase activities capable of increasing parasite adhesion and infection. **Parasitology Research**, v.113, n.8, p. 2961-2972, 2014.

NICKEL, W.; SEEDORF, M. Unconventional mechanisms of protein transport to the cell surface of eukaryotic cells. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 24, p. 287-208, 2008.

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. Vesicles from different *Trypanosoma cruzi* strains trigger differential innate and chronic immune responses. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 4, n. 1, 2015.

O'DALY, J. A.; CARRASCO, H.; FERNANDEZ, V.; RODRÍGUEZ, M. B. Comparison of chagasic and non-chagasic myocardiopathies by ELISA and immunoblotting with antigens of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **Acta Tropica**, v. 56, p. 265-287, 1994.

PALÁU, M. T.; MEJÍA, A. J.; VERGARA, U.; ZÚÑIGA, C. A. Action of *Trypanosoma rangeli* in infections with virulent *Trypanosoma cruzi* populations. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, n. 4, p. 543-548, 2003.

PEÑA, C. P. *et al.* Molecular analysis of surface glycoprotein multigene family TrGP expressed on the plasma membrane of *Trypanosoma rangeli* epimastigotes forms. **Acta Tropica**, v. 111, p. 255–62, 2009.

PINGE-FILHO, P.; PERON, J. P. S.; MOURA, T. R. de; MENOLLI, R. A.; GRAÇA, V. K.; ESTEVÃO, D.; TADOKORO, C. E.; JANKEVICIUS, J. V.; RIZZO, L. V. Protective immunity against *Trypanosoma cruzi* provided by oral immunization with *Phytomonas serpens*: role of nitric oxide. **Immunology Letters**, v. 96, p. 283-290, 2005.

PINTO DIAS, J. C. *et al.* II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 25, p. 7-86, 2016.

PORCEL, B. M.; BONTEMPI, E. J.; HENRIKSSON, J.; RYDAKER, M.; ASLUND, L.; SEGURA, E. L.; PETTERSSON, U.; RUIZ, A. M. *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*: molecular characterization of genes encoding putative calcium-binding proteins, highly conserved in trypanosomatids. **Experimental Parasitology**, v. 84, n. 3, p. 387-399, 1996.

PRYOR, J. L.; XU, W.; HAMILTON, D. W. Immunodetection after complete destaining of Coomassie Blue-stained proteins on immobilon-PVDF. **Analytical Biochemistry**, v. 202, p.100-104, 1992.

RAMIREZ, L. E.; LAGES-SILVA, E.; ALVARENGA-FRANCO, F.; MATOS, A.; VARGAS, N.; FERNANDES, O.; ZINGALES, B. High prevalence of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in opossums and triatomids in a formerly-endemic area of Chagas disease in Southeast Brazil. **Acta Tropica**, v.84, p. 189-198, 2002.

RAMIREZ, L. E.; MACHADO, M. I.; MAYWALD, P. G.; MATOS, A.; CHIARI, E.; LAGES-SILVA, E. Primeira evidência de *Trypanosoma rangeli* no sudeste do Brasil, região endêmica para doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 1, p. 99-102, 1998.

RAMIREZ, M. I.; DEOLINDO, P.; MESSIAS-REASON, I. J. de; ARIGI, E. A; CHOI, H.; ALMEIDA, I. C.; EVANS-OSSES, I. Dynamic flux of microvesicles modulate parasite–host cell interaction of *Trypanosoma cruzi* in eukaryotic cells. **Cellular Microbiology**, v.19, 2017.

RIBEIRO, K. S.; VASCONCELLOS, C. I.; SOARES, R. P.; MENDES, M. T.; ELLIS, C. C.; AGUILERA-FLORES, M.; ALMEIDA, I. C. de; SCHENKMAN, S.; IWAI, L. K.; TORRECILHAS, A. C. Proteomic analysis reveals different composition of extracellular vesicles released by two *Trypanosoma cruzi* strains associated with their distinct interaction with host cells. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 7, 2018.

RIOS, L. E.; VÁZQUEZ-CHAGOYÁN, J. C.; PACHECO, A. O.; ZAGO, M. P.; GARG, N. J. Immunity and vaccine development efforts against *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 200, 2019.

ROBBINS, P. D., MORELLI, A. E. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 3, p. 195-208, 2014.

RUBIN, S. S. C. de C.; SCHENKMAN, S. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase as a multifunctional enzyme in Chagas' disease. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 10, p. 1522-1530, 2012.

SALDAÑA, A.; HARRIS, R. A.; ÖRN, A.; MONROY, C.; ORTEGA-BARRIA, E.; SOUZA, O. E. Antigenic significance of a *Trypanosoma rangeli* sialidase. **The Journal of parasitology**, v. 88, n. 4, p. 697-701, 2002.

SALDAÑA, A.; SOUSA, O. E. *Trypanosoma rangeli*: epimastigote immunogenicity and cross-reaction with *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of parasitology**, v. 82, n. 2, p. 363-366, 1996.

SANTOS, A. L. S.; D'AVILA-LEVY, C. M.; ELIAS, C. G. R.; VERMELHO, A. B.; BRANQUINHA, M. H. *Phytomonas serpens*: immunological similarities with the human trypanosomatid pathogens. **Microbes and Infection**, v. 9, p. 915-921, 2007.

SANTOS JUNIOR, A. de C. M. dos; RICART, C. A. O.; PONTES, A. H.; FONTES, W.; SOUZA, A. R. de; CASTRO, M. S.; SOUZA, M. V. de; LIMA, B. D. de. Proteome analysis of *Phytomonas serpens*, a phytoparasite of medical interest. **PLoS ONE**, v. 13, n. 10, 2018.

SANTOS SOUZA, H. F. ; ROCHA, S. C.; DAMASCENO, F. S.; RAPADO, L. N.; PRAL, E. M. F.; MARINHO, C. R. F.; SILBER, A. M. The effect of memantine, an antagonist of the NMDA glutamate receptor, in *in vitro* and *in vivo* infections by *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 9, 2019.

SCORZA, C.; URDANETA-MORALES, S.; TEJERO, F. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920: preliminary report on histopathology in experimentally infected mice. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, p. 371-378, 1986.

SCHOTTELIUS J. Neuraminidase fluorescent test for differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **Tropical Medicine and Parasitology**, v. 38, p. 323-327, 1987.

SILVA, L. H. P.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia Clinica et Biologica**, v.20, p. 201-210, 1953.

SILVERMAN, J. M.; REINER, N. E. Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes. **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 1-9, 2011.

SOUZA, M. A de; FONSECA, T. da S.; SANTOS, B. N. dos; PEREIRA, S. M. dos S.; CARVALHAL, C.; MORENO, A. M. H. *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920, in chronic Chagas' disease patients under ambulatory care at the Evandro Chagas Clinical Research Institute (IPEC—Fiocruz, Brazil). **Parasitology Research**, v. 103, n. 3, p. 697-703, 2008.

SOUZA, W. de; CARVALHO, T. M. de; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. **International Journal of Cell Biology**, 2010.

STEINDEL, M. PACHECO, L. K.; SCHOLL, D.; SOARES, M.; MORAES, M. H. de; EGER, I.; KOSMANN, C.; SINCERO, T. C. M.; STOCO, P. H.; MURTA, S. M. F.; CARVALHO-PINTO, C. J. de; GRISARD, E. D. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 60, p. 25-32, 2008.

STEVENS, J. R.; TEIXEIRA, M. M. G.; BINGLE, L. E. H.; GIBSON, W. C. The taxonomic position and evolutionary relationships of *Trypanosoma rangeli*. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 5, p. 749-757, 1999.

STOCO, P. H. *et al.* Genome of the avirulent human-infective Trypanosome–*Trypanosoma rangeli*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 9, 2014.

SUPEK, F.; BOSNJAK, M.; SKUNCA, N.; SMUC, T. REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, 2011.

SVS/MS. Doença de Chagas: 14 de abril – Dia Mundial. **Boletim Epidemiológico**, v. 51, n. esp, p. 1-43, 2020.

SVS/MS. Doença de Chagas Aguda e distribuição espacial dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016. **Boletim Epidemiológico**, v. 50, n. 2, 2019-1.

SVS/MS. Panorama da doença de Chagas no Brasil. **Boletim Epidemiológico**, v. 50, n. 36, 2019-2.

TERÁN, R. B. ; ARANCIBIA, A.; BASQUIERA, A. L.; DE LA FUENTE, J. L.; RICCHI, B.; DE DILLER, A. B. *Trypanosoma cruzi* in the bone marrow. **British Journal of Hematology**, v. 157, n.1, 2012.

TEJERA, E. Un nouveau flagellé de *Rhodnius prolixus*, *Trypanosoma* (ou *Crithidia*) *rangeli* n. sp. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v. 13, p. 527-530, 1920.

THÉRY, C.; CLAYTON, A.; AMIGORENA, S.; RAPOSO, G. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. **Current Protocols in Cell Biology**, v. 3, n. 22, p. 1-29, 2006.

THÉRY, C.; OSTROWSKI, M.; SEGURA, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. **Nature Reviews Immunology**, v.9, p. 581-593, 2009.

THÉRY, C.; WITWER, K. W. *et al.* 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. **Jornal of Extracellular Vesciles**, v. 7, n. 1, 2018.

TORRECILHAS, A. C. T.; TONELLI, R. R.; PAVANELLI, W. R.; SILVA, J. S. da; SCHUMACHER, R. I.; SOUZA, W. de; SILVA, N. C. E.; ABRAHAMSOHN, I de A.; COLLI, W.; ALVES, M. J. M. *Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. **Microbes and Infection**. v. 11, n. 1, p. 29-39, 2009.

TORRÓ, L. M. de P.; MOREIRA, L. R.; OSUNA, A. Extracellular vesicles in Chagas disease: a new passenger for an old disease. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018.

TURTURICI, G.; TINNIRELLO, R.; SCONZO, G.; GENARI, F. Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages. **Cell Physiology**, v. 306, n. 7, p. C621-C633, 2014.

URBINA, J. A. Recent clinical trials for the etiological treatment of chronic Chagas disease: advances, challenges and perspectives. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 62, p.149-156, 2014.

URDANETA-MORALES, S.; TEJERO, F. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920. Intracellular amastigote stages of reproduction in white mice. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, p. 166-169, 1986.

VALLEJO, G. A.; GUHL, F.; CARRANZA, J. C.; LOZANO, L. E.; SÁNCHEZ, J. L.; JARAMILLO J. C.; GUALTERO, D.; CASTAÑEDA, N.; SILVA J. C.; STEINDEL, M. kDNA markers define two major *Trypanosoma rangeli* lineages in Latin-America. **Acta Tropica**, v. 81, p. 77-82, 2002.

VALLEJO, G. A.; GUHL, F.; SCHAUB, G. A. Triatominae–*Trypanosoma cruzi*/T. *rangeli*: vector–parasite interactions. **Acta Tropica**, v. 110, p. 137-147, 2009.

VEDAM, V. V. **Avaliação da reatividade sorológica cruzada de microvesículas de *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi***. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2017.

VEDAM, V. V.; SILVA, R. V. da; WOWK, P. F.; EGER, I. Avaliação da reatividade sorológica cruzada de microvesículas de protozoários não patogênicos e *Trypanosoma cruzi*. **Anais do XXVI Encontro Anual de Iniciação Científica**, 2017.

WAGNER, G.; YAMANAKA, L. E.; MOURA, H.; LÜCKEMEYER, D. D.; SCHLINDWEIN, A. D.; STOCO, P. H.; FERREIRA, H. B.; BARR, J. R.; STEINDEL, M.; GRISARD, E. C. The *Trypanosoma rangeli* trypomastigote surfaceome reveals novel proteins and targets for specific diagnosis. **Journal of Proteomics**, v. 82, p. 52-63, 2013.

WHO 2020. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Disponível em: <who.int/chagas/en/>.

WHO. Control of Chagas disease: second report of the WHO expert committee. **WHO Technical Report Series**, Geneva, v. 905, 120 p., 2002.

WOWK, P. F.; ZARDO, M. L.; MIOT, H. T.; GOLDENBERG, S.; CARVALHO, P. C.; MÖRKING, P. A. Proteomic profiling of extracellular vesicles secreted from *Toxoplasma gondii*. **Proteomics**, v. 17, 2017.

YÁÑEZ-MÓ, M.; SILJANDER, P. R. M. *et al.* Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 4, n.1, 2015.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; BRIONES, M. R. S.; CAMPBELL, D. A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GHUL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A. M.; MACHADO, C.

R.; MILES, M. A.; ROMANHA, A. J.; STURM, N. R.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, A. G. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, n. 7, p. 1051-1054, 2009.

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

ZUÑIGA, C.; PALAU, T.; PENIN, P.; GAMALLO, C.; DIEGO, J. A. de. Characterization of a *Trypanosoma rangeli* Strain of Colombian Origin. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 4, p. 523-530, 1997.

**APÊNDICE A – PROTEOMA DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DE
*TRYPANOSMA RANGELI***

Tabela 6. Lista das proteínas identificadas em vesículas extracelulares secretadas por formas epimastigotas de *Trypanosoma rangeli*

(continua)

IDS	Descrição da proteína
TRSC58_05116	Calreticulin
TRSC58_06901	Hexokinase
C4B63_39g344	14-3-3 protein 1
TRSC58_01051	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase
TRSC58_05897	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase
TRSC58_07060	40S ribosomal protein S3a
TRSC58_01009	40S ribosomal protein S4
TRSC58_04395	60S ribosomal protein L35
TRSC58_03782	ABC transporter
TRSC58_06196	ADP-ribosylation factor 3
TRSC58_05738	alcohol dehydrogenase
TRSC58_03588	alpha tubulin
C4B63_51g126	alpha tubulin
TRSC58_02928	Aminopeptidase
TRSC58_00214	arginine kinase
TRSC58_05843	aspartate aminotransferase
TRSC58_04043	aspartate aminotransferase, mitochondrial
TRSC58_01540	ATP synthase, epsilon chain
C4B63_51g127	beta tubulin
TRSC58_04313	branched-chain amino acid aminotransferase
TRSC58_06606	carboxypeptidase Taq
TRSC58_04835	chaperonin GroEL
C4B63_69g74	cytochrome c oxidase subunit V
TRSC58_06262	cytoskeleton-associated protein CAP5.5
TRSC58_06888	cytosolic malate dehydrogenase
TRSC58_06590	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase-protein
TRSC58_06766	elongation factor 1-alpha (EF-1-alpha)
TRSC58_06854	elongation factor 2
TRSC58_07150	Enolase
TRSC58_03729	enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein
TRSC58_04008	eukaryotic initiation factor 4 ^a
TRSC58_03581	fatty acyl CoA synthetase
TRSC58_05627	fatty acyl CoA synthetase 2
TRSC58_06706	flagellar calcium-binding protein
TRSC58_00236	fructose-bisphosphate aldolase, glycosomal
TRSC58_00392	glucokinase 1
TRSC58_03733	glucose-regulated protein 78
C4B63_57g131	glutamate dehydrogenase
TRSC58_06364	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
TRSC58_06452	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, cytosolic
TRSC58_07237	glycerol dehydrogenase
TRSC58_03342	glycosomal malate dehydrogenase
TRSC58_03941	heat shock 70 kDa protein, mitochondrial precursor

Tabela 6. Lista das proteínas identificadas em vesículas extracelulares secretadas por formas epimastigotas de *Trypanosoma rangeli*

(continuação)

IDS	Descrição da proteína
<i>C4B63_18g293</i>	<i>heat shock 70 kDa protein, mitochondrial precursor</i>
<i>TRSC58_06812</i>	<i>heat shock 70kDa protein 1/8</i>
<i>TRSC58_07144</i>	<i>heat shock 70kDa protein 1/8</i>
<i>TRSC58_03283</i>	<i>heat shock 70kDa protein 4</i>
<i>TRSC58_06436</i>	<i>hypothetical protei</i>
<i>TRSC58_05950</i>	<i>hypothetical protein</i>
<i>TRSC58_02923</i>	<i>hypothetical protein</i>
<i>TRSC58_06770</i>	<i>hypothetical protein</i>
<i>TRSC58_00814</i>	<i>hypothetical protein</i>
<i>TRSC58_06682</i>	<i>hypothetical protein</i>
<i>TRSC58_03809</i>	<i>hypothetical protein</i>
<i>TRSC58_06569</i>	<i>hypothetical protein</i>
<i>TRSC58_06913</i>	<i>hypothetical protein</i>
<i>TRSC58_00699</i>	<i>hypothetical protein</i>
<i>TRSC58_05886</i>	<i>hypothetical protein</i>
<i>TRSC58_02343</i>	<i>hypothetical protein</i>
<i>TRSC58_06516</i>	<i>hypothetical protein</i>
<i>TRSC58_02868</i>	<i>hypothetical protein</i>
<i>TRSC58_00147</i>	<i>hypothetical protein</i>
<i>TRSC58_04620</i>	<i>hypothetical protein</i>
<i>TRSC58_07191</i>	<i>hypothetical protein</i>
<i>TRSC58_06034</i>	<i>Kinesin</i>
<i>TRSC58_02382</i>	<i>kinesin-like protein</i>
<i>C4B63_2g165c</i>	<i>kinetoplastid membrane protein 11</i>
<i>TRSC58_05935</i>	<i>lipophosphoglycan biosynthetic protein</i>
<i>TRSC58_02250</i>	<i>L-threonine 3-dehydrogenase</i>
<i>C4B63_34g299</i>	<i>Mitochondrial outer membrane protein porin</i>
<i>TRSC58_00727</i>	<i>molecular chaperone HtpG</i>
<i>C4B63_15g18</i>	<i>NADH-dependent fumarate reductase</i>
<i>TRSC58_01180</i>	<i>nucleoside diphosphate kinase</i>
<i>TRSC58_00386</i>	<i>nucleoside transporter</i>
<i>TRSC58_057302</i>	<i>oxoisovalerate dehydrogenase alpha subunit</i>
<i>TRSC58_02201</i>	<i>peptidase M20/M25/M40</i>
<i>C4B63_149g19</i>	<i>Peroxidoxin</i>
<i>TRSC58_05925</i>	<i>phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)</i>
<i>TRSC58_02767</i>	<i>phosphoglycerate kinase</i>
<i>C4B63_292g27</i>	<i>polyubiquitin(fragment)</i>
<i>TRSC58_06376</i>	<i>protein disulfide isomerase</i>
<i>TRSC58_04120</i>	<i>P-type H⁺-ATPase</i>
<i>TRSC58_03675</i>	<i>pyridoxal kinase</i>
<i>TRSC58_06266</i>	<i>pyruvate phosphate dikinase</i>
<i>TRSC58_00615</i>	<i>quinone oxidoreductase</i>
<i>C4B63_45g134</i>	<i>ras-related protein RAB1A</i>

Tabela 6. Lista das proteínas identificadas em vesículas extracelulares secretadas por formas epimastigotas de *Trypanosoma rangeli*

(conclusão)

IDS	Descrição da proteína
<i>TRSC58_04758</i>	<i>S-adenosylhomocysteine hydrolase</i>
<i>C4B63_70g63</i>	<i>seryl-tRNA synthetase</i>
<i>TRSC58_04856</i>	<i>succinate dehydrogenase flavoprotein</i>
<i>TRSC58_01479</i>	<i>succinyl-coA:3-ketoacid-coenzyme A transferase, mitochondrial precursor</i>
<i>TRSC58_04178</i>	<i>surface protease GP63</i>
<i>TRSC58_07141</i>	<i>surface protease GP63</i>
<i>TRSC58_00510</i>	<i>thiol-dependent reductase 1</i>
<i>TRSC58_03503</i>	<i>threonyl-tRNA synthetase</i>
<i>TRSC58_06522</i>	<i>trans-sialidase</i>
<i>TRSC58_03469</i>	<i>triosephosphate isomerase</i>
<i>TRSC58_01995</i>	<i>trypanothione synthetase</i>
<i>TRSC58_04735</i>	<i>Tryparedoxin</i>
<i>TRSC58_02563</i>	<i>tryparedoxin peroxidase</i>
<i>TRSC58_06538</i>	<i>tyrosine aminotransferase</i>
<i>C4B63_44g146</i>	<i>Vacuolar proton pyrophosphatase 1</i>