

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO

Curso de Biomedicina

Guilherme Hideki Takahashi Sant'ana

Identificação de fatores que induzem a liberação de microvesículas

contendo moléculas de superfície do *Trypanosoma cruzi*

envolvidas na invasão celular

São Paulo

2018

Guilherme Hideki Takahashi Sant'ana – RA:003627

**Identificação de fatores que induzem a liberação de microvesículas
contendo moléculas de superfície do *Trypanosoma cruzi*
envolvidas na invasão celular**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pela Profa. Dra. Renata Cristina Pardos Baida Andreoli e co-orientado pela Profa. Dra. Nobuko Yoshida, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

São Paulo

2018

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Padre Inocente Radrizzani

Sant'ana, Guilherme Hideki Takahashi

Identificação de fatores que induzem a liberação de microvesículas contendo moléculas de superfície do Trypanosoma cruzi envolvidas na invasão celular / Guilherme Hideki Takahashi
Sant'ana -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2018.

41 p.

Orientação de Renata Cristina Pardos Baida Andreolli

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2018.

1. Glicoproteínas 2. Preparação farmacêuticas 3. Trypanosoma cruzi 4. Tripomastigotas metacílicos 5. Vesículas extracelulares I. Andreolli, Renata Cristina Pardos Baida II. Centro Universitário São Camilo III. Título

CDD: 616.96

Guilherme Hideki Takahashi Sant'ana

**Identificação de fatores que induzem a liberação de microvesículas
contendo moléculas de superfície do *Trypanosoma cruzi*
envolvidas na invasão celular**

São Paulo, 25 de fevereiro de 2018

Professor Orientador - Prof^a Dr^a Renata Cristina Pardos Baida Andreoli

Professor Examinador – Prof. Dr. Fabio Mitsuo Lima

Dedico ao meus pais que me apoiaram em momentos difíceis durante os meus estudos, sempre irei dar muita importância e valor ao que vocês me deram. Muito obrigado, amo vocês.

Sant'ana, G H T. **Identificação de fatores que induzem a liberação de microvesículas contendo moléculas de superfície do *Trypanosoma cruzi* envolvidas na invasão celular.** 2018. 37 f. tese (bacharel em biomedicina). Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2018

A descoberta do *Trypanosoma cruzi*, feita por Carlos Chagas abriu caminho para o início de pesquisas relacionadas ao protozoário causador da doença de chagas, considerada uma doença negligenciada. Em regiões com construções precárias o *Triatoma infestans* (barbeiro) se aloja e pica o ser humana e ao mesmo tempo defeca. As fezes do barbeiro são ricas em tripomastigotas metacíclicos que entram na corrente sanguínea por meio da ferida causada pela coceira. Uma vez dentro do organismo do indivíduo o tripomastigota metacíclico invade células adjacentes da região da picada se diferenciando em amastigotas que por divisão binária irão se multiplicar e se transformar em tripomastigotas sanguíneos até o rompimento da célula. Os tripomastigotas sanguíneos estão livres na corrente sanguínea e prontos para invadir uma nova célula resultando em um ciclo. Casos de infecção por *Trypanosoma cruzi* ainda são recentes, geralmente causados por ingestão de leite materno, carne malcozida e do próprio barbeiro no preparo de sucos devido ao seu pequeno tamanho. A alta eficiência na infecção é devida a participação de glicoproteínas (gp) que são expressas pelo próprio *Trypanosoma cruzi*. A gp82 está relacionada a invasão celular promovendo a adesão do parasita às mucinas gástricas, já as gp90 são reguladoras negativas da invasão celular. Duas cepas foram usadas a cepa G que libera gp90 e gp82 em grandes quantidades e a cepa CL que libera em pequenas quantidades. Experimentos foram conduzidos para determinar as bases da liberação diferenciada de gp82 e gp90, foi examinado o efeito de diferentes meios e drogas que interferem nas vias de sinalização dos parasitas. Utilizando tripomastigotas metacíclicos das cepas G e CL pretendeu-se analisar por western blotting moléculas gp82 e gp90 liberadas em diferentes meios pelos parasitas tratados ou não com diferentes drogas, examinar a cinética de liberação de gp82 e gp90 em diferentes meios pelos parasitas tratados ou não com diferentes drogas, determinar a capacidade de invasão celular das cepas G e CL na ausência e na presença de meio condicionado dos parasitas obtido em diferentes condições. Experimentos foram realizados incluindo drogas que são quelantes de cálcio, depletors dos estoques de cálcio, inibidores da fosfolipase C além de anticorpos específicos para gp82 e gp90. Todos os experimentos demonstraram que a liberação das moléculas de superfície gp90 e gp82 pelos tripomastigotas metacíclicos do *T. cruzi* é dependente de cálcio proveniente predominantemente do retículo endoplasmático e o anticorpo monoclonal contra gp82 induz sua maior liberação no meio, além disso foi constatado que as moléculas gp90 e gp82 são liberadas em níveis proporcionalmente maiores em meios com concentrações crescentes de soro e que tripomastigotas metacíclicos da cepa G invadem pouco a célula hospedeira em meio com ou sem soro.

Palavras-chave: Glicoproteínas. Preparação farmacêutica. *Trypanosoma cruzi*. Tripomastigotas metacíclicos. Vesículas extracelulares

Sant'ana, G H T. **Identificação de fatores que induzem a liberação de microvesículas contendo moléculas de superfície do *Trypanosoma cruzi* envolvidas na invasão celular.** 2018. 37 f. tese (bacharel em biomedicina). Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2018

The discovery of the *Trypanosoma cruzi*, made by Carlos Chagas, opened the way for the beginning of researches related to the protozoan that causes chagas disease, considered a neglected disease. In regions with precarious constructions *Triatoma infestans* (barber) lodges and strikes the human being and at the same time defecates. Barrier feces are rich in metacyclic trypomastigotes that enter the bloodstream through the itchy wound. Once within the organism of the individual the metacyclic trypomastigote invades adjacent cells of the bite region differentiating into amastigotes that by binary division will multiply and transform into blood trypomastigotes until the cell breaks. Blood trypomastigotes are free in the bloodstream and ready to invade a new cell resulting in a cycle. Cases of *Trypanosoma cruzi* infection are still recent, usually caused by ingestion of breast milk, malcozed meat and the barber himself in the preparation of juices due to their small size. The high efficiency in infection is due to the participation of glycoproteins (gp) that are expressed by *Trypanosoma cruzi* itself. Gp82 is related to cell invasion promoting the adhesion of the parasite to the gastric mucins, whereas the gp90 are negative regulators of the cellular invasion. Two strains were used the G strain which releases gp90 and gp82 in large amounts and the CL strain releasing in small amounts. Experiments were conducted to determine the bases of the differential release of gp82 and gp90, we examined the effect of different media and drugs that interfere in the signaling pathways of the parasites. Using metacyclic trypomastigotes of the G and CL strains it was intended to analyze by western blotting gp82 and gp90 molecules released in different media by the parasites treated or not with different drugs, to examine the kinetics of release of gp82 and gp90 in different media by the treated or non-treated parasites different drugs, determine the cellular invasiveness capacity of the G and CL strains in the absence and presence of conditioned medium of the parasites obtained under different conditions. Experiments were performed including drugs that are calcium chelators, calcium stock depletors, phospholipase C inhibitors in addition to antibodies specific for gp82 and gp90. All experiments demonstrated that the release of the gp90 and gp82 surface molecules by *T. cruzi* metacyclic trypomastigotes is dependent on calcium predominantly from the endoplasmic reticulum and the monoclonal antibody against gp82 induces its greater release in the medium, in addition it was found that the molecules gp90 and gp82 are released at proportionally higher levels in media with increasing serum concentrations and that metacyclic trypomastigotes of strain G invade the host cell little in serum or serum free medium.

Key words: Glycoproteins. Pharmaceutical preparation. *Trypanosoma cruzi*. Metacyclic of Tripomatstigotes. Extracellular vesicles

Lista de figuras

Figura 1 – Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> no interior do inseto e do mamífero hospedeiro.....	12
Figura 2 – Surtos da doença de Chagas por infecção oral no Brasil.....	14
Figura 3 – Distribuição geográfica das DTUs de <i>T. cruzi</i> nos ciclos de transmissão doméstico e silvestre.	15
Figura 4 – Liberação espontânea de vesículas por formas metacíclicas do <i>T. cruzi</i>	18
Figura 5 – Efeito do EGTA na liberação da molécula de superfície gp90 expressa nas formas metacíclicas do <i>T. cruzi</i> em diferentes condições e meios.	25
Figura 6 – Efeito do EGTA na liberação da molécula de superfície gp82 expressa nas formas metacíclicas do <i>T. cruzi</i> em diferentes condições e meios.	26
Figura 7 – Efeito de drogas que afetam a mobilização de cálcio sobre a liberação de gp90 e gp82 pelas formas metacíclicas do <i>T. cruzi</i>	28
Figura 8 – Efeito de anticorpos monoclonais contra moléculas de superfície de formas metacíclicas do <i>T. cruzi</i> (cepa G) sobre a liberação de gp90 e gp82.	30
Figura 9 – Efeito de inibidores da fosfolipase sobre a liberação de gp90 e gp82 de tripomastigotas metacíclicos do <i>T. cruzi</i> (cepa G).	32
Figura 10 – Efeito da concentração de soro sobre a liberação de moléculas de superfície pelas formas metacíclicas do <i>T. cruzi</i> (cepa G).	34
Gráfico 1 – Invasão celular de formas metacíclicas do <i>T. cruzi</i> (cepa G) em meio DMEM com ou sem soro.	36

Lista de abreviações

BSA: Albumina Bovina Sérica

D0: Meio DMEM sem soro fetal bovino

D1: Meio DMEM com 1% de soro fetal bovino

D2: Meio DMEM com 2% de soro fetal bovino

D5: Meio DMEM com 5% de soro fetal bovino

D10: Meio DMEM com 10% de soro fetal bovino

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

Gp: Glicoproteína

PBS: Tampão fosfato-salino

PBS++: PBS suplementado com Ca^{2+} e Mg^{2+}

TCT: Tripomastigota de cultura

U73122: Inibidor de fosfolipase C

Sumário

1 Introdução.....	11
2 Objetivo.....	21
2.1 Objetivos específicos.....	21
3 Material e métodos.....	22
4 Resultados e Discussão.....	25
5 Conclusão.....	38
6 Referências Bibliográficas.....	39

1 Introdução

A descoberta de protozoários flagelados no sangue deu início a uma nova pesquisa

O *Trypanosoma cruzi* é o protozoário responsável por causar a doença de Chagas. No Brasil, as pesquisas relacionadas ao *Trypanosoma cruzi* foram iniciadas em 1907, no interior de Minas Gerais, por Carlos Chagas, e comissionadas pelo Dr. Oswaldo Cruz. (DIAS et al, 1945).

Carlos Chagas foi encarregado de chefiar as pesquisas relacionadas ao combate à malária em Minas Gerais, onde estava sendo construída a Estrada de Ferro Central do Brasil. Examinando o inseto hematófago *Triatoma infestans*, popularmente conhecido como barbeiro, constatou a presença de protozoários flagelados que, em seguida, também foram encontrados em um sagui, *Callithrix penicillata*, o que possibilitou relacionar a infecção do barbeiro e do símio. Ao examinar amostras de sangue de uma criança da região, encontrou a presença dos mesmos protozoários. (NEVES, 1991).

A partir das informações obtidas foi dado início a inúmeras pesquisas sobre o tema, com diversas publicações científicas para o entendimento do protozoário.

Animais silvestres e construções precárias favorecem a disseminação da doença

O *Trypanosoma cruzi* possui formas de vida capazes de se replicar, como o epimastigota, encontrado no intestino médio do barbeiro, e o amastigota, encontrado em células do hospedeiro vertebrado, e formas com alta taxa de infectividade, como o tripomastigota metacíclico, encontrado nas fezes do barbeiro e o tripomastigota sanguíneo, encontrado na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado. As principais complicações da doença de Chagas são a cardiomegalia e o megacólon, manifestações da fase crônica da doença.

Animais silvestres como o gambá servem como reservatório natural para o *Trypanosoma cruzi*. Esses animais são alvos de insetos hematófagos que, ao se

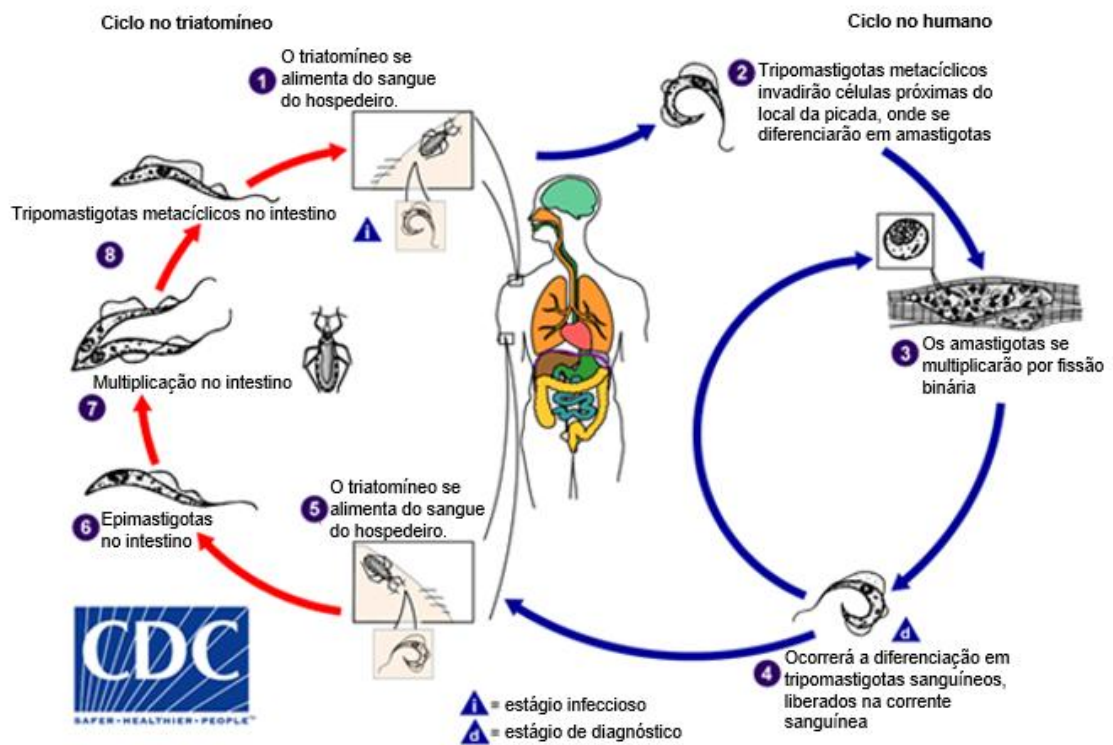
alimentarem do sangue infectado, contraem formas tripomastigotas sanguíneas do parasita e, uma vez no barbeiro, transformam-se em epimastigotas, capazes de se dividir binariamente. Ao atingirem a porção final do intestino do inseto, os epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, formas infectantes do parasita. (ROQUE, 2010).

Os barbeiros se alojam em casas de taipa e, ao anoitecer, picam a região do rosto do indivíduo e ao mesmo tempo defecam. As fezes do barbeiro são ricas em formas tripomastigotas metacíclicas, que entram no corpo do indivíduo quando esse coça o local da picada. No hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas metacíclicos invadem as células adjacentes à picada, onde se diferenciam em amastigotas, que se multiplicam por divisão binária e se diferenciam em tripomastigotas sanguíneos, que por sua vez rompem a célula e se lançam na corrente sanguínea, podendo invadir outras células, resultando em um ciclo (**FIGURA 1**).

Poucos dias após a infecção do parasita no hospedeiro vertebrado ocorre a fase aguda da doença, com sintomas muitas vezes inespecíficos, como febre. O edema de pálpebra unilateral ou bilateral, normalmente causado quando a picada ocorre próxima aos olhos, assim como o inchaço na região da picada, podem ser indícios da infecção.

As principais consequências da doença de Chagas são as implicações cardíacas e digestivas, decorrentes de sua fase crônica. A cardiopatia chagásica crônica trata-se de uma cardiomegalia causada por insuficiência cardíaca congestiva. Já a forma digestiva é caracterizada por um quadro de megaesôfago, com sintomas de disfagia, soluço, tosse e regurgitação, e megacólon, que leva a perfurações, constipação intestinal e desnutrição (NEVES, 1991)

Figura 1 – Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi* no interior do inseto e do mamífero hospedeiro.



Fonte: Modificado de (CDC, 2015)

Casos de infecção por *Trypanosoma cruzi* ainda são frequentes nos dias atuais

A doença de Chagas é endêmica em regiões como as Américas Central e do Sul, onde cerca de 8 milhões de pessoas estão infectadas. Nos Estados Unidos, estima-se que 300.000 pessoas sejam portadoras do *Trypanosoma cruzi*, apesar desse país possuir uma população de triatomíneos, a maioria das pessoas adquire essa doença em países endêmicos, onde uma população de baixa renda é afetada por essa doença. (CDC, 2013).

Com o desenvolvimento econômico, o avanço tecnológico e o desmatamento, a maioria das casas construídas atualmente é de alvenaria e está longe de áreas de mata fechada onde os animais silvestres e o barbeiro habitam. Isso dificulta o contato entre o barbeiro portador do *Trypanosoma cruzi* com o homem, diminuindo os casos de transmissão vetorial. (NEVES, 1991)

Apesar da ocorrência em menor escala, ainda há casos de doença de Chagas relatados em regiões urbanas. Os primeiros casos em regiões urbanas foram relatados no Rio Grande do Sul na década de 1960 e, posteriormente, no Pará, em áreas da região amazônica, em Santa Catarina, na Bahia e no Ceará. (**FIGURA 2**). As formas de contágio mais frequentes nessas regiões são a ingestão de leite materno e de carne malcozida e, especialmente, a ingestão do próprio barbeiro infectado. (SBMT, 2011).

Nesse último caso, o contágio é decorrente da preparação de sucos ou extratos derivados do açaí, ou na preparação de caldo de cana em presença do barbeiro infectado que, triturado com esses alimentos, ocasiona a liberação dos protozoários no suco. Quando ingeridos, os protozoários invadem a mucosa da região do esôfago e estômago, infectando o indivíduo. (SBMT, 2011).

Figura 2 – Surtos da doença de Chagas por infecção oral em regiões urbanas do Brasil.

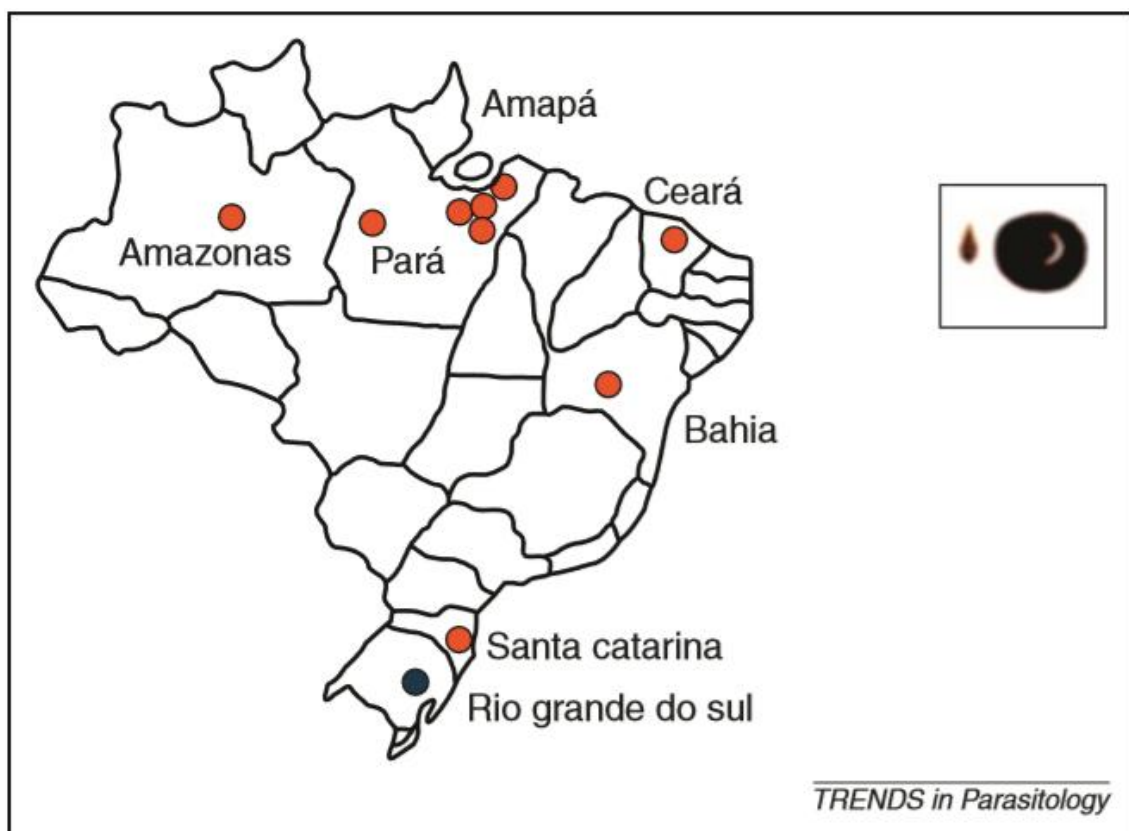


Figura 2 - Casos de infecção oral pelo *Trypanosoma cruzi* em regiões do Brasil, o primeiro caso foi registrado no Rio Grande do Sul na década de 1960.

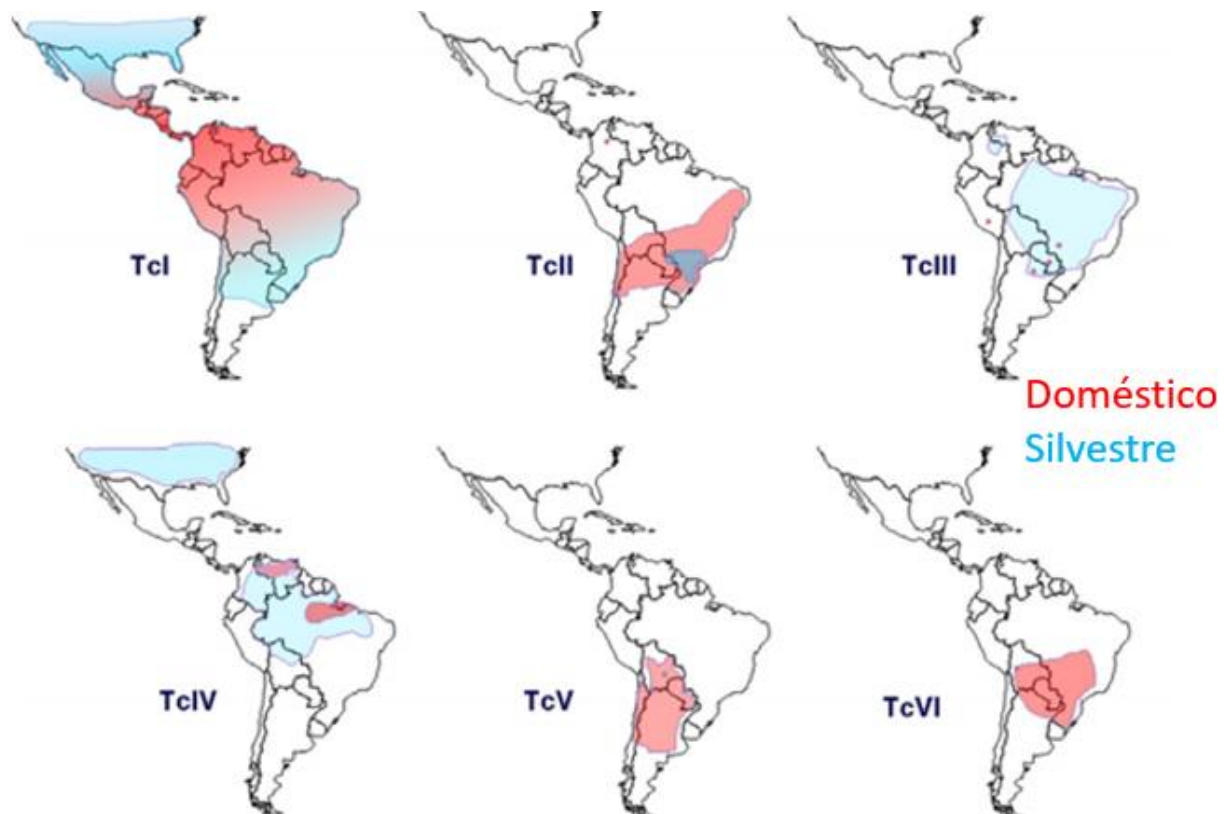
Fonte: (Yoshida et al., 2011)

As cepas de *T. cruzi* são bastante heterogêneas e complexas

As cepas existentes de *T. cruzi* são divididas em seis grupos, TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV e TcVI, sendo diferenciadas por critérios biológicos, bioquímicos, clínicos, virulência, patogenicidade, conteúdo de DNA e susceptibilidade às drogas. (ZINGALES, 2011; ZINGALES, 2012).

Dentre todas as cepas, o presente trabalho abordará as cepas G e CL (FIGURA 3), por serem as cepas de estudo do laboratório. A cepa G pertence ao grupo TcI, predomina em infecções silvestres e domésticas nas Américas do Sul, central e do Norte. Já a cepa CL pertence ao grupo TcVI e predomina na região do cone sul e Chaco. (FIGURA 3)

Figura 3 – Distribuição geográfica das cepas de *T. cruzi* nos ciclos de transmissão doméstico e silvestre.



Fonte: (Zingales et al., 2012)

A cepa G, isolada de gambá, não é capaz atingir níveis elevados de parasitemia em camundongos e sua baixa infectividade também é constatada em células epiteliais humanas, fibroblastos de macacos e macrófagos (YOSHIDA, 2006).

A cepa CL, por sua vez, foi isolada de um triatomíneo e, diferentemente da cepa G, é capaz de produzir altas taxas de parasitemia em camundongos e apresenta alta infectividade em diferentes células.

A infecção do *Trypanosoma cruzi* ocorre por meio da interação de glicoproteínas com as células da mucosa

A alta eficiência na infecção oral está relacionada com a participação de glicoproteínas expressas pelo próprio *Trypanosoma cruzi*. A glicoproteína gp82 promove a adesão do parasita às mucinas gástricas e células epiteliais, levando a uma cascata intracelular nas células hospedeiras com mobilização de Ca^{2+} intracelular, o que facilita a invasão. Contudo, o parasita também expressa uma glicoproteína, gp90, que tem efeito inibitório na invasão celular e não sofre degradação por pepsina. (YOSHIDA, 2008).

A liberação espontânea de antígenos de superfície do *Trypanosoma cruzi* em vesículas membranosas foi descrita há mais de duas décadas em um estudo com tripomastigotas de cultura de tecido (TCT) (GONÇALVES et al, 1991), formas cultivadas *in vitro* correspondentes aos parasitas circulantes no sangue. Vesículas liberadas por *T. cruzi* seriam carreadores de fatores de virulência (TORRECILHAS et al, 2012). A injeção em camundongos de vesículas de TCT, enriquecidas em glicoproteínas de superfície da superfamília gp85/trans-sialidase, antes da infecção por *T. cruzi* resultou em aumento do parasitismo cardíaco, em intensa resposta

inflamatória, severa patologia cardíaca e morte precoce (TORRECILHAS et al, 2009).

Mais recentemente, foi reportado que vesículas de diferentes cepas do parasita desencadeiam respostas imunes crônicas diferenciadas (NOGUEIRA et al, 2015). No que se refere aos tripomastigotas metacíclicos, formas que iniciam a infecção do hospedeiro mamífero, a principal influência das moléculas de superfície liberadas seria no processo de invasão celular, visto que a permanência das formas metacíclicas no hospedeiro mamífero é transitória, abrangendo a etapa de internalização até o escape do vacúolo parasitóforo, em um período inferior a 24 horas.

Um estudo em que vesículas e proteínas solúveis liberadas por epimastigotas e metacíclicos do clone Dm28 de *T. cruzi* foram analisadas, revelou populações enriquecidas em vesículas maiores, presumivelmente derivadas em sua maioria da membrana plasmática, e populações enriquecidas em vesículas menores, supostamente resultantes da fusão de corpos multivesiculares com a membrana da bolsa flagelar (BAYER-SANTOS et al, 2013). Foi mostrado que glicoproteínas do tipo mucina e gp82 são liberadas no interior de vesículas ou na forma solúvel (Bayer-Santos et al, 2013). A liberação de gp90, molécula de superfície de tripomastigotas metacíclicos que atua como regulador negativo da invasão celular (MÁLAGA; YOSHIDA, 2001), não foi determinada.

Estudos em curso indicam que metacíclicos de cepas com capacidade diferenciada de invadir a célula hospedeira liberam diferencialmente as referidas moléculas de superfície. Tripomastigotas metacíclicos da cepa G, pouco invasivos, liberam gp90, gp82 em grande quantidade, enquanto a liberação dessas moléculas pelas formas metacíclicas da cepa CL é muito baixa. Essas observações são intrigantes, considerando-se que vesículas de diversos tamanhos são igualmente liberadas por ambas as cepas (**FIGURA 4**). Os níveis de liberação de gp82 e gp90 pela cepa G são dependentes do meio. Após 15 minutos de incubação em meio nutricionalmente completo, como DMEM contendo 10% de soro, grande quantidade de gp90 e gp82 pode ser encontrada no meio. Mas, em meio nutricionalmente pobre, como o PBS⁺⁺, sem macromoléculas ou aminoácidos, a liberação é muito menor. (CLEMENTE et al, 2016)

Figura 4 – Liberação espontânea de vesículas por formas metacíclicas do *T. cruzi*.

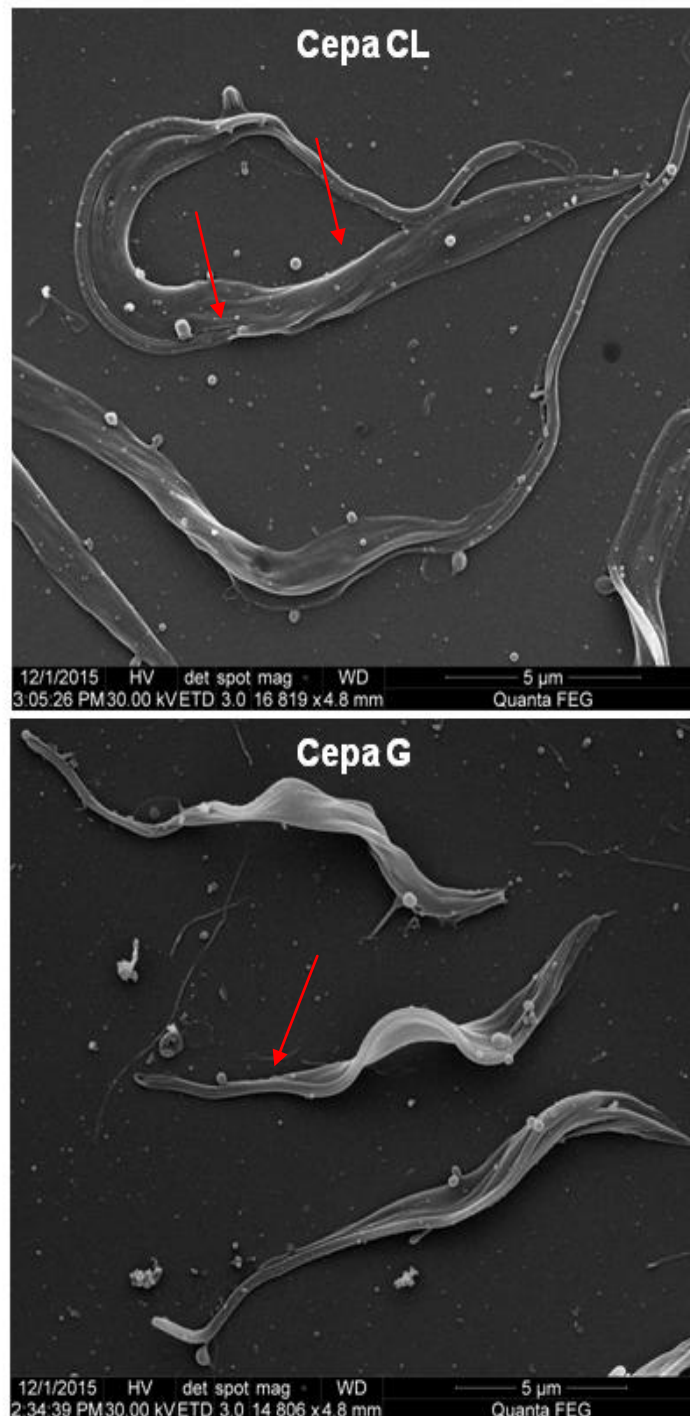


Figura 4 - Visualização dos parasitas e vesículas liberadas pelas cepas indicadas, após processamento por microscopia eletrônica de varredura. As setas em vermelho indicam as vesículas liberadas pelo parasita.

Para tentar determinar as bases da liberação diferenciada de gp82 e gp90, foi examinado o efeito de diferentes meios e drogas que interferem nas vias de sinalização dos parasitas. Como distintas cascatas de sinalização são induzidas durante a invasão celular das formas metacíclicas das cepas G e CL (YOSHIDA, 2006), existe a possibilidade de que essas cepas respondam de maneira diferenciada aos fatores do meio, o que poderia resultar na liberação diferenciada de moléculas de superfície. Utilizando drogas que se mostraram efetivas em inibir os diversos componentes da cascata de sinalização das formas metacíclicas implicados no processo de invasão celular, várias delas com ação diferenciada sobre as cepas G e CL (NEIRA et al., 2002), foi determinado se as mesmas têm efeito sobre a atividade de liberação de moléculas de superfície. Entre as drogas, foram incluídas aquelas que interferem com a liberação Ca^{2+} de reservatórios como o retículo endoplasmático e acidocalciosomos. (CLEMENTE et al, 2016)

2 Objetivos

O objetivo geral deste projeto foi identificar os fatores que induzem a liberação de moléculas de superfície por tripomastigotas metacíclicos de diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* em meios de cultura distintos.

2.1 Objetivos específicos

Utilizando tripomastigotas metacíclicos das cepas G e CL de *T. cruzi*, pretendeu-se:

- Analisar por “Western blot” as moléculas gp82 e gp90 liberadas em diferentes meios pelos parasitas tratados ou não com diferentes drogas.
- Examinar a cinética de liberação de gp82 e gp90 em diferentes meios pelos parasitas tratados ou não com diferentes drogas.
- Determinar a capacidade de invasão celular das cepas G e CL na ausência e na presença de meio condicionado dos parasitas obtido em diferentes condições.

3 Material e métodos

Liberção de moléculas de superfície de tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi* em meio DMEM e PBS na presença ou ausência de EGTA

Tripomastigotas metacíclicos (5×10^7) em 200 μ L das cepas G e CL foram incubados em meio DMEM completo com 10% de soro fetal bovino (D10) e em PBS por uma hora, na presença ou ausência de EGTA a 5 mM. Os parasitas foram incubados em meio D10 a 37°C, temperatura do hospedeiro mamífero, ou em PBS a 27°C, temperatura do inseto vetor, e em seguida, centrifugados por 5 minutos a 4500 rpm em centrífuga Eppendorf. O sobrenadante foi coletado por meio de pipetas e posteriormente analisado por “Western blotting”.

Liberção de moléculas de superfície de tripomastigotas metacíclicos do *T. cruzi* da cepa G na presença ou ausência tapsigargina, genisteína e nigericina+ionomicina

Formas metacíclicas da cepa G (5×10^7) em 200 μ L foram tratadas ou não por 30 minutos com tapsigargina que depleta o estoque de cálcio intracelular inibindo cálcio ATPase do retículo endoplasmático (THASTRUP et al, 1990), genisteína que inibe a proteína tirosina quinase e a mobilização de cálcio nas formas metacíclicas do *T. cruzi* (YOSHIDA et al, 2000) ou com a combinação nigericina+ionomicina que aumenta o pH do acidocalcisomo do parasita contribuindo para a liberação de cálcio dessa organela. Após tratamento, os parasitas foram incubados por 1 hora em PBS e centrifugados por 5 minutos a 4500 rpm em centrífuga Eppendorf. O sobrenadante foi coletado por meio de pipetas e posteriormente analisado por “Western blotting”.

Liberção de moléculas de superfície de tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi* da cepa G na presença ou ausência de anticorpos monoclonais 1G7, 3F6 ou 3C9

Tripomastigotas metacíclicos da cepa G (5×10^7) em 200 μ L foram tratados por 30 minutos a 37°C com os anticorpos monoclonais 1G7, 3F6 ou 3C9. Em seguida, incubados em PBS por 1 hora a 27°C e centrifugados por 5 minutos a 4500 rpm em centrífuga Eppendorf. O sobrenadante foi coletado por meio de pipetas e posteriormente analisado por “Western blotting”.

Liberação de moléculas de superfície de tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi* da cepa G na presença ou ausência de inibidores da fosfolipase C

Tripomastigotas metacíclicos da cepa G (5×10^7) em 200 μ L foram incubados por 1 hora em PBS contendo ZnCl₂ 10 mM ou 1 μ M de U73122 (inibidor da PLC) e centrifugados por 5 minutos a 4500 rpm em centrífuga Eppendorf. O sobrenadante foi coletado por meio de pipetas e posteriormente analisado por “Western blotting”.

Liberação de moléculas de superfície de tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi* da cepa G em DMEM contendo soro a 10%, 5%, 2%, 1% ou sem soro

Os parasitas da cepa G (5×10^7) em 200 μ L foram incubados por 1 hora em meio DMEM contendo soro a 10%, 5%, 2%, 1% ou sem soro. Após a liberação foram centrifugados por 5 minutos a 4500 rpm em centrífuga Eppendorf. O sobrenadante foi coletado e posteriormente analisado por “Western blotting”.

“Western Blotting”

Ao sobrenadante coletado, como descrito acima, foi adicionado tampão de amostra de SDS-PAGE (Tris 62 mM, pH 6,8, glicerol 10%, SDS 2%, β -mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol 0,01%). A amostra foi aplicada em gel de poliacrilamida 10%, sendo a quantidade correspondente a 10^7 parasitas (40 μ L) por poço, e submetida à eletroforese SDS-PAGE. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose em tampão de transferência (Tris 35 mM, glicina 192 mM e metanol 20%) por no mínimo 60 minutos a 250 mA, em gelo.

Após a transferência, a membrana foi bloqueada em leite em pó desnatado a 5% em TBS-T (NaCl 40 g/L, Tris base 15 g/L, 5 ml de Tween 20 preparados para 1L de H₂O destilada) por 60 minutos e, em seguida incubada com anticorpo contra gp90 ou gp82, à diluição 1:1000, por 60 minutos. A incubação por 1 hora com anticorpo secundário (contra IgG de camundongo) conjugado à peroxidase foi feita após 3 lavagens de 5 minutos em TBS-T, seguindo-se a revelação por quimioluminescência com reagente de detecção (ECL “Western blotting”), expondo-se a membrana em filme de raio-X.

Ensaio de invasão celular de *T. cruzi*

Os ensaios de invasão foram conduzidos semeando-se tripomastigotas metacíclicas da cepa G sobre as células na proporção de 20:1 em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro circulares de 13 mm com células de HeLa ($1,5 \times 10^5$) aderidas. Após incubação a 37°C por 1 hora em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino ou em PBS++ (CaCl 0,14 g/L, KCl 0,40 g/L, MgCl₂.6H₂O 0,1 g/L, MgSO₄.7H₂O 0,1 g/L, NaHCO₃ 0,35 g/L), lamínulas em duplicata ou triplicata foram lavadas em PBS, fixadas em solução de Bouin, coradas com Giemsa e desidratadas sequencialmente em acetona: xilol (9:1, 7:3, 3:7) e xilol. As lamínulas foram montadas usando Entellan (Merck) sobre lâminas de vidro, o nível de infecção foi avaliado contando-se o número de parasitas intracelulares em 250 células.

Anticorpo 1G7: anticorpo monoclonal contra gp90, utilizado na proporção de 1:1000

Anticorpo 5E7: anticorpo monoclonal contra gp90, utilizado na proporção de 1:1000

Anticorpo 3F6: anticorpo monoclonal contra gp82, utilizado na proporção de 1:1000

4 Resultados e Discussão

A liberação de moléculas de superfície dos tripomastigotas metacíclicos de diferentes cepas de *T. cruzi* depende de cálcio

Células eucarióticas, mais especificamente células THP-1, liberam vesículas quando incubadas com *T. cruzi*, porém, quando tratadas com quelante de cálcio EGTA, essa liberação é diminuída. (CESTARI et al, 2012). Além disso, segundo os mesmos autores, drogas como tapsigargina e genisteína inibem a liberação de vesículas pelas células THP-1. Tomando como base os achados do trabalho citado, foi procurado examinar a participação do cálcio na liberação de moléculas de superfície dos tripomastigotas metacíclicos, particularmente a gp82, mediador da invasão celular (RAMIREZ et al, 1993; RUIZ et al, 1998) e a gp90, modulador negativo da invasão celular (MÁLAGA; YOSHIDA, 2001).

Em meio D10, que mimetiza o ambiente do hospedeiro, não foi observada diferença na liberação de gp90 pelas formas metacíclicas da cepa G tratadas ou não com EGTA (**FIGURA 5A**), o que possivelmente ocorreu devido à alta concentração de cálcio no meio. Em PBS, que mimetiza o ambiente do barbeiro, houve uma expressiva diminuição na liberação de gp90 pelos parasitas tratados com EGTA (**FIGURA 5A**). No caso da cepa CL, o experimento foi realizado com parasitas incubados em PBS, na ausência ou presença de EGTA. Foi constatada também uma redução no nível de gp90 liberada pelos parasitas tratados com EGTA (**FIGURA 5B**). O anticorpo monoclonal 5E7 foi utilizado para revelar gp90 da cepa CL, que não reage com anticorpo 1G7.

Figura 5- Efeito do EGTA na liberação da molécula de superfície gp90 expressa nas formas metacíclicas de *T. cruzi* em diferentes condições e meios.

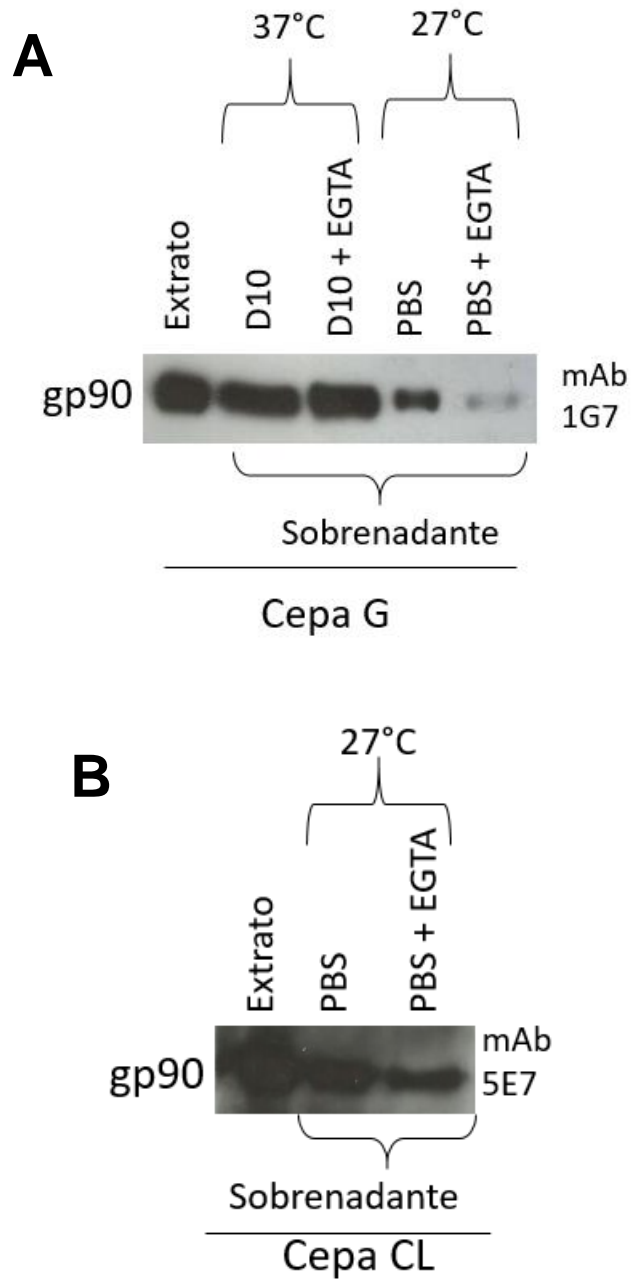


Figura 5 - Material liberado pelos parasitas das cepas G (A) e CL (B), incubado por 1 hora em meio D10 ou PBS, na presença ou ausência de EGTA (5 mM), analisado por “Western blotting” utilizando anticorpo monoclonal (mAb) 1G7 ou 5E7 contra gp90.

No que se refere à gp82, não foi observada em meio D10 diferença na liberação pelas formas metacíclicas da cepa G tratadas ou não com EGTA (**FIGURA 6A**), devido possivelmente à alta concentração de cálcio no meio. Em PBS, o tratamento dos parasitas com EGTA inibiu a liberação de gp82 pelas cepas G e CL (**FIGURAS 6A e 6B**).

Os resultados obtidos indicam que a liberação de moléculas de superfície gp90 e gp82 pelas formas metacíclicas é dependente de cálcio, que poderia ser proveniente do retículo endoplasmático e/ou do acidocalciossomo.

Fig. 6 – Efeito do EGTA na liberação da molécula de superfície gp82 expressa nas formas metacíclicas do *T. cruzi* em diferentes condições e meios.

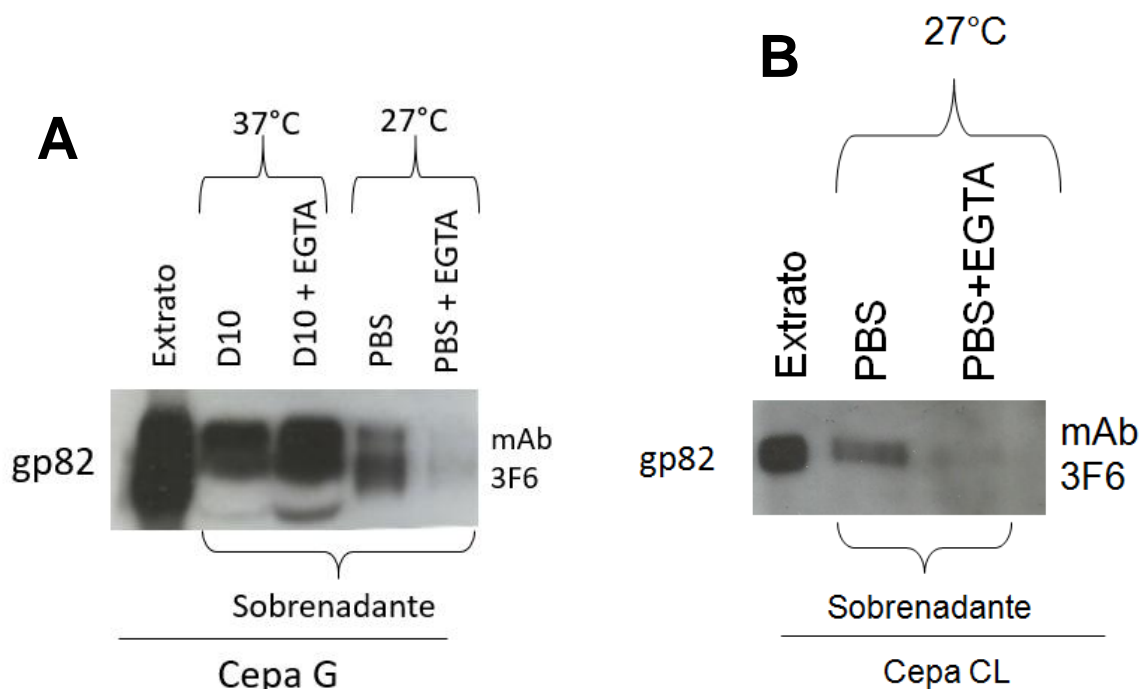


Figura 6 – Material liberado pelos parasitas das cepas G (**A**) e CL (**B**), incubado por 1 hora em D10 ou PBS, na presença ou ausência de EGTA (5 mM), analisado por “Western blotting” utilizando anticorpo monoclonal (mAb) 3F6 contra gp82.

Cálcio do retículo endoplasmático está envolvido na liberação de gp90 e gp82 pelos tripomastigotas metacíclicos do *T. cruzi*

Para determinar qual reservatório de cálcio contribui para a liberação de gp90 e gp82 pelas formas metacíclicas, os parasitas foram tratados ou não com tapsigargina, genisteína ou com a combinação nigericina+ionomicina. A tapsigargina depleta o estoque de cálcio intracelular inibindo cálcio ATPase do retículo endoplasmático (THASTRUP et al, 1990). A genisteína inibe a proteína tirosina quinase e a mobilização de cálcio nas formas metacíclicas do *T. cruzi* (YOSHIDA et al, 2000). O tratamento com nigericina + ionomicina aumenta o pH do acidocalcissomo do parasita contribuindo para a liberação de cálcio dessa organela (NEIRA et al, 2002). Após tratamento, os parasitas foram analisados por “western blotting”. Como mostrado na **FIGURA 7**, houve uma redução marcante na liberação de gp90 e gp82 quando os parasitas foram tratados com tapsigargina ou genisteína, enquanto o tratamento com nigericina + ionomicina não mostrou efeito inibitório. Esse resultado indica que o cálcio necessário para liberação de gp90 e gp82 provém predominantemente do retículo endoplasmático. Como a liberação de moléculas de superfície pelas formas metacíclicas da cepa CL é muito menor em comparação à cepa G, o experimento descrito e aqueles que serão referidos em seguida foram realizados com a cepa G.

Figura 7- Efeito de drogas que afetam a mobilização de cálcio sobre a liberação de gp90 e gp82 pelos tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi*.

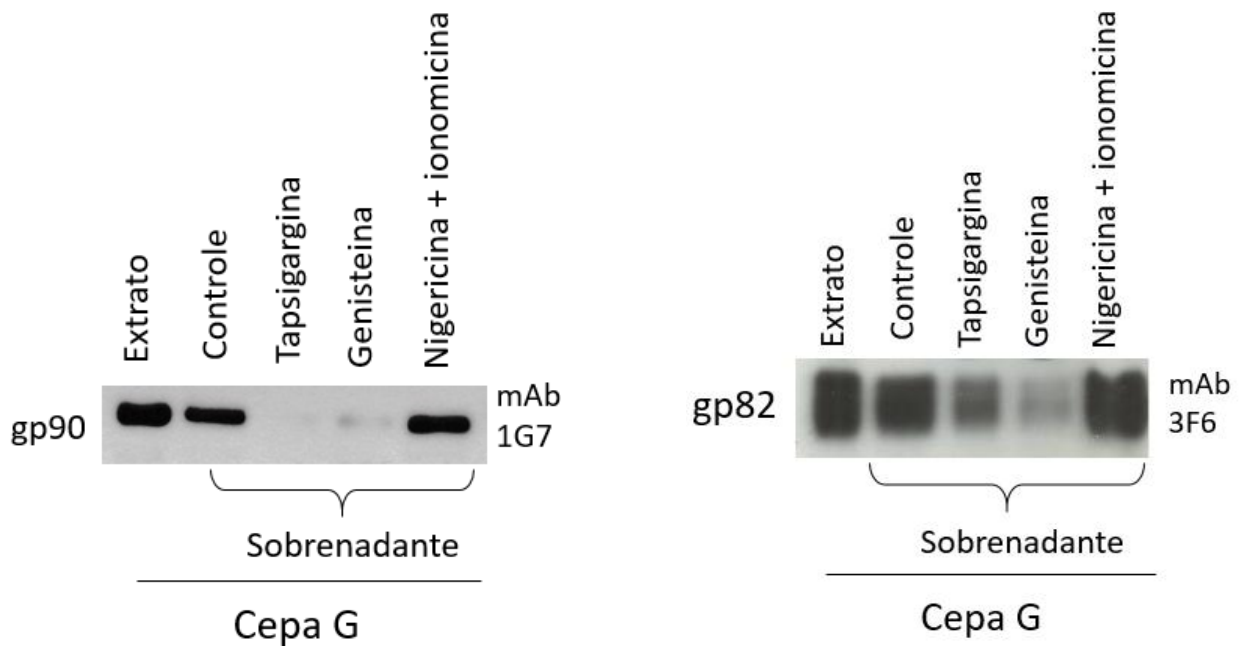


Figura 7 - Parasitas pré-tratados por 30 minutos na presença ou ausência de tapsigargina (1 μ M), genisteina (200 μ M) ou nigericina (1 μ M) + ionomicina (1 μ M) foram incubados por 1 hora em PBS. O sobrenadante foi analisado por “Western blotting” utilizando anticorpos monoclonais 1G7 e 3F6 contra gp90 e gp82, respectivamente.

Anticorpo monoclonal 3F6 induz aumento na liberação da molécula de superfície gp82 pelos tripomastigotas metacíclicos

Tripomastigotas metacíclicos da cepa G foram tratados com os anticorpos monoclonais 1G7, 3F6 ou 3C9, que reconhecem gp90, gp82 ou moléculas do tipo mucina, respectivamente e, em seguida, analisados por “western blotting”. Foi detectado um aumento na liberação de gp82 pelas formas metacíclicas tratadas com anticorpo 3F6, enquanto o tratamento com anticorpo 1G7 ou 3C9 não teve efeito sobre a liberação de gp90 ou gp82 (**FIGURA 8**). Mais experimentos são necessários para esclarecer o efeito do anticorpo 3F6 especificamente sobre a liberação de gp82, e a ausência de efeito do anticorpo 1G7 sobre a liberação de gp90. Com pesquisas voltadas para a gp90 a indução de liberação seria uma forma interessante de inibir a invasão celular, uma vez que a gp90 possui efeito inibitório na invasão celular.

Figura 8 – Efeito de anticorpos monoclonais contra moléculas de superfície de tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi* (cepa G) sobre a liberação de gp90 e gp82.

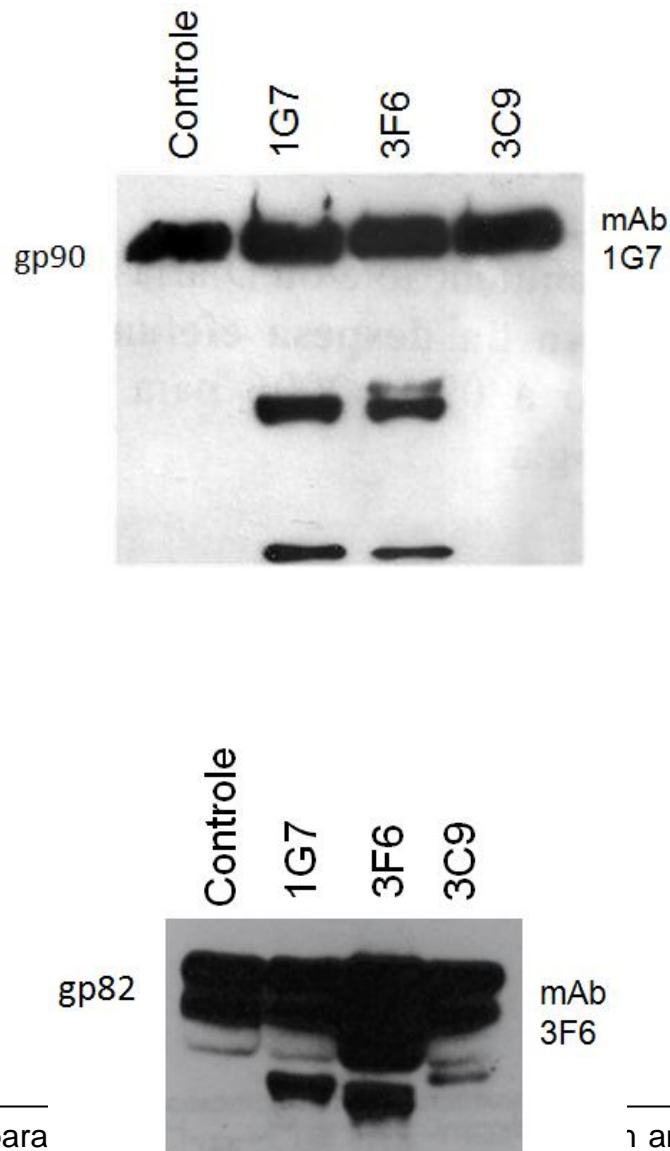


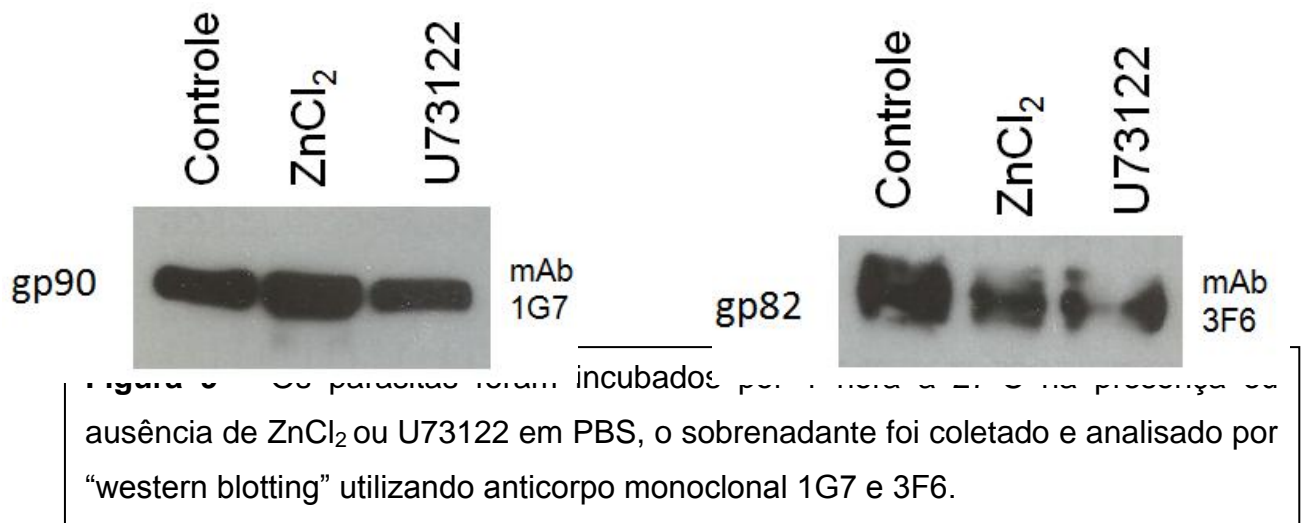
Figura 8 – Os para 1 anticorpo monoclonal
 1G7, 3F6 ou 3C9 a 37°C e em seguida incubados em PBS por 1 hora a 27°C. O sobrenadante dos parasitas foi coletado e analisado por “western blotting” utilizando anticorpo monoclonal 1G7 ou 3F6.

O tratamento de tripomastigotas metacíclicos da cepa G com inibidores da fosfolipase C diminui a liberação de gp82

As moléculas de superfície gp90 e gp82 estão ancoradas por moléculas de glicosil fosfatidil inositol (GPI), suscetíveis à ação de fosfolipase C (YOSHIDA, 2006). Quando a fosfolipase C é ativada ocorre sinalização intracelular no parasita para a liberação de cálcio intracelular do estoque sensíveis ao IP3. Foi examinado se o tratamento das formas metacíclicas da cepa G com inibidores de fosfolipase C, $ZnCl_2$ e U73122, resultaria na inibição da liberação de gp90 e/ou gp82. Os parasitas foram incubados com os dois inibidores e o material analisado por western blotting". Como mostrado na **FIGURA 9**, a gp82 foi liberada em quantidades menores pelos parasitas tratados com $ZnCl_2$ ou U73122. Por que o tratamento dos parasitas com inibidores da fosfolipase C resulta em menor liberação de gp82, mas não de gp90, é uma questão a ser investigada.

Esse resultado abre caminho para novas linhas de pesquisa em relação a gp82 em cepas G e CL, uma vez que a mesma está relacionada com a invasão celular é possível explorar experimentos que diminuem a sua liberação com conseqüente menor invasão da célula hospedeira.

Figura 9 – Efeito de inibidores da fosfolipase sobre a liberação de gp90 e gp82 de tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi* (cepa G).



A liberação das moléculas gp90 e gp82 pelos tripomastigotas metacíclicos da cepa G é proporcional ao aumento da concentração de soro no meio

Como a incubação de tripomastigotas metacíclicos da cepa G em meio D10 resulta em liberação de quantidades maiores de gp90 e gp82 do que em PBS (**FIGURAS 5A e 6A**), foi examinado se concentrações menores de soro induziriam liberação proporcionalmente menor. Os parasitas foram incubados por 1 hora em meio DMEM contendo soro a 10%, 5%, 2%, 1% ou sem soro, e o sobrenadante dos parasitas analisado por “western blotting”. Na ausência de soro, houve pouca liberação de gp90 e gp82, havendo um aumento na quantidade liberada dessas moléculas, proporcional ao aumento da concentração de soro (**FIGURA 10**).

A alta liberação de gp90 resulta em menor invasão celular uma vez que a gp90 está relacionada ao processo de inibição da entrada do parasita na célula, mesmo com a liberação de gp82 e gp90 em grande quantidade os efeitos da gp90 se sobressaem em relação a gp82 como demonstrado no **GRÁFICO 1** a infectividade diminui.

Figura 10 – Efeito da concentração de soro sobre a liberação de moléculas de superfície pelos tripomastigotas metacíclicos do *T. cruzi* (cepa G).

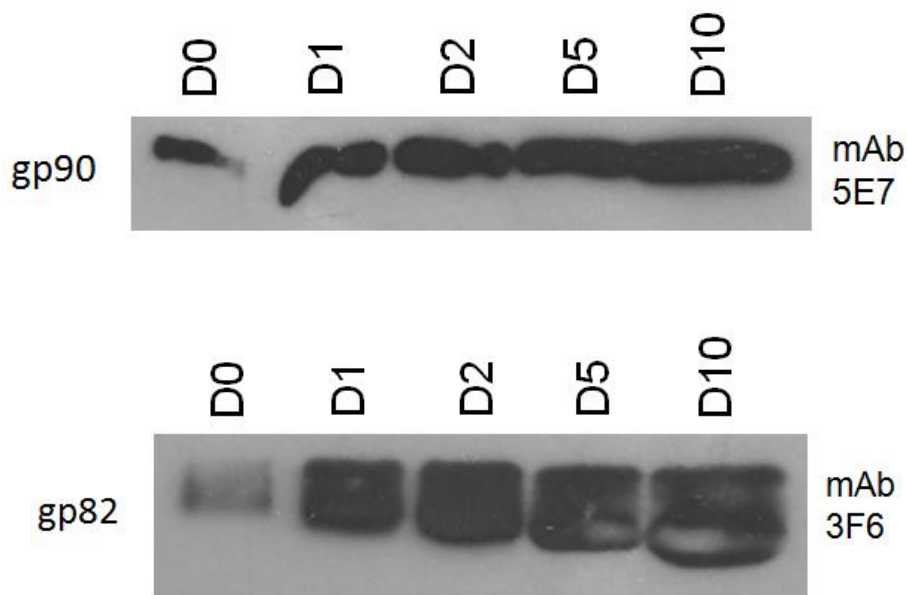


Figura 10 – Os parasitas foram incubados por 1 hora a 37°C em DMEM, na ausência ou presença de soro fetal bovino a 1%, 2%, 5% e 10%. O sobrenadante foi coletado e as amostras processadas por “western blotting”, utilizando anticorpos monoclonais (mAb) 3F6 e 1G7, contra gp82 e gp90, respectivamente.

A capacidade de invadir a célula hospedeira dos tripomastigotas metacíclicos da cepa G possui correlação com os níveis de gp90 e gp82 liberados no meio (CLEMENTE et al, 2016). Foi realizado ensaio de invasão celular utilizando células HeLa para determinar os níveis de internalização dos parasitas. Tripomastigotas metacíclicos foram incubados em meio DMEM contendo diferentes concentrações de soro, e o número de parasitas intracelulares foi contado. Independente da concentração do soro, e mesmo em DMEM sem soro, o nível de invasão foi muito baixo, em comparação ao PBS⁺⁺ (**GRÁFICO 1**), meio sem macromoléculas ou aminoácidos, cuja composição está descrita no item Material e Métodos. A incubação dos parasitas nesse meio com carência nutricional promove sua eficiente internalização, promovendo o espalhamento de lisossomos (CLEMENTE et al, 2016)

Gráfico 1 – Invasão celular de tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi* (cepa G) em meio DMEM com ou sem soro.

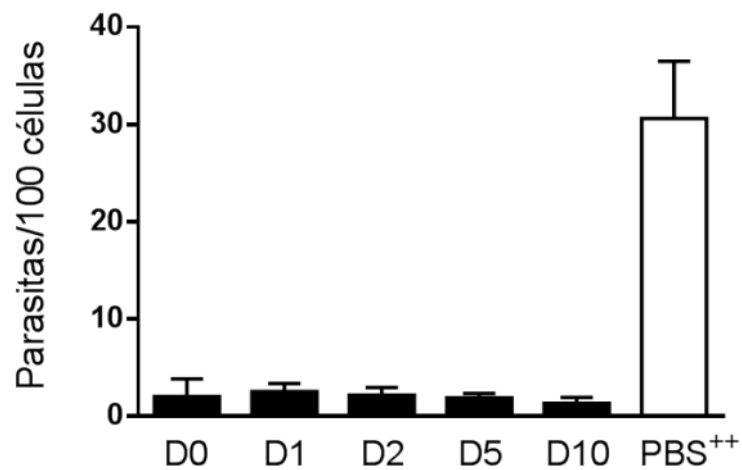


Gráfico 1 – Os parasitas foram incubados por 1 hora com células HeLa em DMEM na ausência (D0) ou presença de soro fetal bovino a 1% (D1), 2% (D2), 5% (D5) ou 10% (D10), ou em PBS⁺⁺. Células HeLa foram coradas com Giemsa como descrito em Materiais e Métodos, contando-se o número de parasitas intracelulares. Os valores representam a média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em duplicata.

5 Conclusão

Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que a liberação das moléculas de superfície gp90 e gp82 pelos tripomastigotas metacíclicos do *T. cruzi* é dependente de cálcio proveniente predominantemente do retículo endoplasmático. A liberação de gp82 pode ser induzida com o tratamento das formas metacíclicas (cepa G) com anticorpo monoclonal 3F6, direcionado contra gp82. Por outro lado, a liberação de gp82 pode ser inibida por meio do tratamento com inibidores da fosfolipase C.

Além disso foi constatado que as moléculas gp90 e gp82 são liberadas em níveis proporcionalmente maiores em meios com concentrações crescentes de soro e tripomastigotas metacíclicos da cepa G invadem pouco a célula hospedeira em meio DMEM com ou sem soro.

A realização dessa pesquisa iniciou a elucidação de fenômenos observados durante os experimentos. Os próximos passos para obtenção de respostas seriam a investigação do efeito do anticorpo 3F6 sobre a liberação de gp82 e a ausência de efeito do 1G7 sobre gp90, a relação entre inibidores de fosfolipase C com a menor liberação de gp82 e não de gp90 e a introdução de experimentos para investigar o comportamento de glicoproteínas do tipo mucina (gp35/50).

6 Referências bibliográficas

BAYER-SANTOS, Ethel et al. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* secretome. Characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins. **Journal of proteome research**, v. 12, n. 2, p. 883-897, Dez. 2013.

Biology. CDC. 2015. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>>. Acesso em: 30 jul. 2018.

CESTARI, I; ANSA-ADDO, E; DEOLINDO, P; INAL, J; RAMIREZ, M. *Trypanosoma cruzi* immune evasion mediated by host cell-derived microvesicles. **Journal of immunology**, v. 188, n. 4, p. 1942–52, Fev. 2012.

CLEMENTE, Tatiana Mordente et al. Surface molecules released by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms downregulate host cell invasion. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 8, p. e0004883, Ago. 2016.

DIAS E; LARANJA, Francisco S.; NOBREGA, Genard. Doença de Chagas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 43, n. 3, p. 495-581, 1945.

Epidemiology & Risk Factors. CDC. 2013. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/chagas/epi.html>>. Acesso em: 30 jul. 2018.

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

MÁLAGA, Sergio; YOSHIDA, Nobuko. Targeted Reduction in Expression of Trypanosoma cruzi Surface Glycoprotein gp90 Increases Parasite Infectivity. **Infection and immunity**, v. 69, n. 1, p. 353-359, Jan. 2001.

NEIRA, Ivan; FERREIRA, Alice T.; YOSHIDA, Nobuko. Activation of distinct signal transduction pathways in Trypanosoma cruzi isolates with differential capacity to invade host cells. **International journal for parasitology**, v. 32, n. 4, p. 405-414, Abr. 2002.

NEVES David Pereira. **Parasitologia humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 1991. 501p.

NOGUEIRA, Paula M. et al. Vesicles from different Trypanosoma cruzi strains trigger differential innate and chronic immune responses. **Journal of extracellular vesicles**, v. 4, n. 1, p. 28734, Nov. 2015.

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

ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Reservatórios do Trypanosoma cruzi e sua relação com os vetores. **Vetores da doença de Chagas no Brasil**. Fiocruz, Rio de Janeiro, 2010.

RUIZ, C. Rita et al. Infectivity of Trypanosoma cruzi strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signalling activity. **Biochemical Journal**, v. 330, n. 1, p. 505-511, Fev. 1998.

Sociedade brasileira de medicina tropical <http://www.sbmt.org.br/portal/noticias-119/> acesso em: 25 mar. 2017

TEIXEIRA, Marta MG; YOSHIDA, Nobuko. Stage-specific surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* identified by monoclonal antibodies. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 18, n. 3, p. 271-282, Mar. 1986.

TORRECILHAS, Ana Claudia et al. Vesicles as carriers of virulence factors in parasitic protozoan diseases. **Microbes and Infection**, v. 14, n. 15, p. 1465-1474, Dez. 2012.

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

YOSHIDA, Nobuko; TYLER, Kevin M.; LLEWELLYN, Martin S. Invasion mechanisms among emerging food-borne protozoan parasites. **Trends in parasitology**, v. 27, n. 10, p. 459-466, Out. 2011.

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

YOSHIDA, Nobuko. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. **Parasitology international**, v. 57, n. 2, p. 105-109, Jun. 2008.

YOSHIDA, Nobuko et al. Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35-and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. **Infection and immunity**, v. 57, n. 6, p. 1663-1667, Jun. 1989.

ZINGALES, Bianca. Trypanosoma cruzi: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de Chagas?. **Revista da Biologia**, Jul. 2011.

ZINGALES, Bianca et al. The revised Trypanosoma cruzi subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 240-253, Mar. 2012.