CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA DE MICROVESÍCULAS SECRETADAS POR *TRYPANOSOMA RANGELI* E *TRYPANOSOMA CRUZI*

Maria Eduarda Carneiro Maciel (PIBIC FA), Verônica Vitória Vedam (Co-orientadora), Iriane Eger (Orientadora), e-mail: iriane.eger@gmail.com

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Biologia Geral

Parasitologia, Protozoologia de Parasitos

Palavras-chave: *Trypanosoma*, vesículas extracelulares, reatividade cruzada.

Resumo

Trypanosoma cruzi secreta vesículas extracelulares (VEs) que participam da interação parasito-hospedeiro. *Trypanosoma rangeli*, protozoário não patogênico, desencadeia uma imunidade protetora contra *T. cruzi* em animais previamente sensibilizados. Entretanto, os mecanismos imunes e componentes antigênicos envolvidos nesta resposta ainda não foram totalmente elucidados. Dados prévios mostram que VEs de *T. rangeli* são imunogênicas e apresentam reatividade cruzada no soro de animais previamente infectados com *T. cruzi*. Assim, o objetivo deste trabalho é caracterizar o perfil antigênico de VEs de *T. rangeli* e *T. cruzi* no soro de camundongos experimentalmente infectados com os tripanosomatídeos por meio de *western blot*, utilizando extrato de formas epimastigotas como controle. As VEs foram isoladas pelo kit Total Exosome Isolation Reagent (Invitrogen) e a extração de proteínas totais feita em PBS 1% NP40. O SDS-PAGE mostrou um perfil distinto do conteúdo vesicular das três amostras. Embora as VEs de tripanosomatídeos tenham sido reagentes no ELISA, as condições do *western blot* só revelaram proteínas dos extratos totais, não permitindo definir o perfil imunogênico das VEs. As condições experimentais para o *western blot* ainda estão sendo padronizadas.

Introdução

A doença de Chagas é uma zoonose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909). Segundo dados do Ministério da Saúde, no período de 2000 a 2011, houve o registro de 1.252 casos da doença no Brasil, considerada um grave problema de saúde pública com elevada morbidade e mortalidade.

O protozoário *Trypanosoma rangeli* (TEJERA, 1920), compartilha vetores, hospedeiros e áreas endêmicas com *T. cruzi*, sendo frequentes infecções mistas (STEVENS et al., 1999). A infecção pelo *T. rangeli* não é patogênica para humanos e induz uma resposta imune humoral com reatividade cruzada com o *T. cruzi*, pois ambos compartilham cerca de 60% da sua superfície antigênica em formas epimastigotas (SALDANA; SOUSA, 1996). Entretanto, os mecanismos imunes e os componentes antigênicos envolvidos nessas respostas ainda não foram totalmente elucidados.

VEs são secretadas por diversos tipos celulares eucariontes, sendo que apresentam importante função na interação parasito-hospedeiro e na imuno modulação (BARTENEVA *et al.*, 2013).

Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo caracterizar o perfil antigênico de vesículas extracelulares de *T. rangeli* e *T. cruzi* através do

ISSN 1676-0093

reconhecimento de anticorpos presentes no soro de camundongos experimentalmente infectados isoladamente com ambos os parasitos.

Material e Métodos

Obtenção dos soros e das vesículas extracelulares (VEs)

Os soros foram cedidos por parceiros do projeto (CEUA/Fiocruz: LW-61/12, CEUA/UEL: 262/12) e são provenientes de 3 a 5 camundongos Swiss após 28 dias de infecção por *T. cruzi* ou *T. rangeli*, e também de camundongos não infectados para controle.

Formas epimastigotas de *T. rangeli* (cepa Choachi) e de *T. cruzi* (cepa Y) foram mantidas em meio LIT a 27°C. O sobrenadante destas culturas foi utilizado para o isolamento das VEs conforme descrito por Aggio (2017) e pelo manual do fabricante do kit *Total Exosome Isolation* (Invitrogen). Também foram obtidas VEs não relacionadas com as de tripanosomatídeos como antígeno controle. O isolamento de VEs para as células Vero E6 (ATCC) seguiu o mesmo protocolo dos protozoários com modificações de Théry *et al*. (2006) para células aderentes.

As VEs foram avaliadas pelo NanoSight e os extratos proteicos de VEs (PBS Lonza; 1% NP40; 1 mm EDTA; 1mm PMSF) e de parasitos ou células totais (50 mM TrisHCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,3% Desoxycolato de Sódio; 1% NP40; 1mM ETDA; 1mM PMSF) quantificados pelo ensaio de Bradford. A dosagem das VEs ainda foi confirmada com o auxílio do equipamento Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen), no Instituto Carlos Chagas (Fiocruz/ PR).

Padronização da técnica de Western Blot

Dez ou 60 µg de proteínas foram submetidas à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%) em uma corrente constante de 15 mA, seguida da coloração com nitrato de prata ou Coomassie Brilliant Blue. Após essa etapa, a eletroforese foi repetida seguida da transferência para uma membrana de PVDF a 25 V por 1 h 30. A eficiência da transferência foi avaliada pelo padrão de peso molecular (Biorad).

Em seguida, a membrana foi bloqueada por 16 horas a 4ºC (TBS-T/ 5% leite em pó desnatado). Após a incubação com os soros murinos (titulação 1:200) por 2 horas a temperatura ambiente em TBS-T + 2% leite, a membrana foi lavada 4 x por 5 minutos com TBST-T e incubada com anticorpo secundário anti-IgG murino conjugado à peroxidase (titulação 1:4000) por 1 hora a temperatura ambiente, e então, novamente lavada 4 x por 5 minutos com 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).

Resultados e Discussão

A partir de 90 ou 45 ml de cultura foram obtidos 11 x 10^8 parasitos de *T. rangeli* e 17 x 10^8 parasitos de *T. cruzi*, dos quais foram obtidos cerca de 250 e 400 µl de VEs, respectivamente. O rendimento de VEs das células Vero foi maior, a partir de 3 garrafas confluentes de 75 cm^3 (0,5 x 10^8 células) foram obtidos 450 µl de VEs.

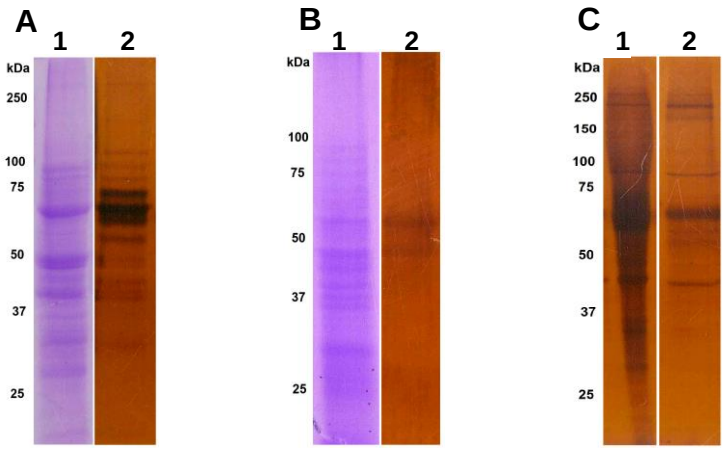
O diâmetro médio, determinado pelo NanoSight, das VEs de *T. cruzi* foi de 278,9±26,3 nm, para *T. rangeli* foi 188,8±20,4 nm e células Vero 296,3±19,1 nm. Em relação a concentração de VEs (partículas/ml) em cada amostra, pode-se observar que a proveniente de *T. cruzi* apresentou um valor significativamente menor quando comparado com as de *T. rangeli* (cerca de 7 vezes) ou Vero (13 vezes) – dados não mostrados. As populações de VEs permaneceram dentro da faixa de 50 e 500 nm, e

os valores de tamanho mais frequentes (moda) foram 237,1±47,4 nm para *T. cruzi*; 153,0±9,2 nm para *T. rangeli* e 190,9±55,1 nm para Vero. Tamanhos compatíveis com o descrito para VEs de vários tipos celulares e parasitos (AGGIO, 2017; GYÖRGY *et al*., 2011).

O rendimento proteico das VEs determinado pelo ensaio de Bradford foi de 0,50 µg/µl para *T. cruzi,* 0,85 µg/µl para *T. rangeli e* 0,80 µg/µl para Vero. Enquanto que, para os parasitos/células totais obteve-se 2,40 µg/µl para *T. cruzi,* 5,50 µg/µl para *T. rangeli* e 5,70 µg/µl para Vero. Pelo Qubit o rendimento das VEs foi mais parecido, aproximadamente 0,90 µg/µl para todas as amostras analisadas.

Os extratos de VEs obtidos em PBS (Lonza) com 1% de NP40, tornou as amostras concentradas, o que permitiu a visualização de cada perfil eletroforético (figura 1). Então, conclui-se que a extração de proteínas totais foi satisfatória, devido a visualização no gel. Além disso, é preciso salientar que cada amostra tem o seu perfil específico de bandas, caracterizado pelo tamanho das proteínas (representado em kilodaltons - kDa).

Figura 1 – SDS-PAGE 10%. À esquerda de cada gel encontra-se o perfil eletroforético dos epimastigotas/células de cada amostra (1), e à direita, as respectivas VEs (2). Em A) *T. rangeli* e B) *T. cruzi*, a coloração azul se deve ao corante Comassie Blue; foram aplicados 60 µg de proteína por poço. O restante da imagem encontra-se corada com Prata, 10 µg por poço. C) Células Vero.



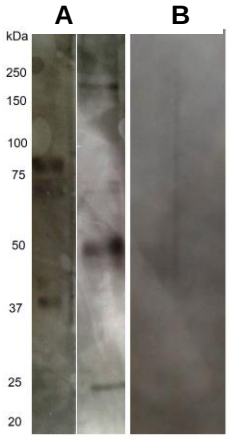
O perfil de bandas das VEs se mostrou definido e com semelhanças aos extratos das células de origem (figura 1), permitindo aferir que não houve alteração na integridade das proteínas a partir do método de extração utilizado. De forma interessante, o perfil de bandas provenientes de células Vero se mostrou diferente dos perfis dos protozoários, sugerindo um bom antígeno controle.

Pode-se observar uma menor proporção de proteínas reveladas de VEs de *T. cruzi* (figura 1-B2), o que pode ser relacionado ao fato de que a concentração de VEs totais nessa amostra (partículas/ml) era menor em relação às demais.

Na representação dos epimastigotas por *Western Blot*, as proteínas de cada extrato foram reconhecidas pelo respectivo soro (figura 2). Sendo assim, observou-se que os soros estão reagindo com os antígenos próprios. Entretanto, as condições experimentais ainda não permitiram definir o perfil imunogênico das VEs, portanto, os experimentos serão repetidos.

ISSN 1676-0093

Figura 2 – *Western Blot* representativo dos extratos de epimastigotas. A) *T. rangeli* e *T. cruzi* respectivamente, frente aos próprios soros. B) *T. rangeli* e *T. cruzi* respectivamente, frente ao soro negativo.



Conclusões

- A extração de proteínas das VEs com PBS 1% NP40 foi uma estratégia eficiente para otimizar o rendimento e permitir a visualização do perfil e da representatividade de proteínas dessas amostras;
- As condições experimentais para o *Western Blot* com o conteúdo vesicular ainda necessitam de mais experimentos para serem padronizadas.

Agradecimentos

Agradeço à agência de fomento, Fundação Araucária/ UEPG pela bolsa cedida. E ao Instituto Carlos Chagas (Fiocruz/ PR) pela colaboração dos equipamentos.

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.

BARTENEVA, M. S. *et al*. Microvesicles and intercellular communication in the context of parasitism. **Front Cell Infec Mi**, v. 3, n. 49, 2013.

CHAGAS, C. Nova tripanozomiase humana: Estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp.*, ajente etiolojico de nova entidade morbida do homem. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 1**,** n. 2, p. 159–218, 1909.

GYÖRGY, B. et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracelular vesicles. **Cell Mol Life Sci**, v. 68, p. 2667-2688, 2011.

SALDANA A., SOUSA O. E. *Trypanosoma rangeli*: epimastigote immunogenicity and cross-reaction with *Trypanosoma cruzi*. **J Parasitol**, v. 82, n. 2, p. 363-366, 1996.

STEVENS, J. R. *et al*. The taxonomic position and evolutionary relationships of *Trypanosoma rangeli*. **Int J Parasitol**. v. 29, n. 5, p. 749-757, 1999.

TEJERA, E. Un nouveau flagellé de *Rhodnius Prolixus*, *Trypanosoma* (ou *Crithidia*) *Rangeli* n. sp. **Bull Soc Path Exot**, Paris, v. 13, p. 527-530, 1920.

THÉRY, C. *et al*. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. **Curr Protoc Cell Biol**, v.30, n. 1, p. 3.22.1-3.22.29, 2006.