AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE SOROLÓGICA CRUZADA DE MICROVESÍCULAS DE PROTOZOÁRIOS NÃO PATOGÊNICOS E *Trypanosoma cruzi*

Verônica Vitória Vedam (PIBIC/CNPq/UEPG), Rosiane Valeriano da Silva, Pryscilla Fanini Wowk, Iriane Eger (Orientadora), e-mail: iriane.eger@gmail.br

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Biologia Geral

Ciências Biológicas: Parasitologia

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

Resumo

Trypanosoma rangeli, protozoário não patogênico para humanos, pode desencadear uma imunidade protetora a *T. cruzi* em animais previamente sensibilizados, resposta associada a antígenos de membrana compartilhados entre os parasitos. Uma vez que microvesículas (MVs) carregam moléculas imunogênicas em sua membrana, acredita-se que MVs derivadas de *T. rangeli* possam induzir uma resposta protetora contra *T. cruzi*. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a imunogenicidade cruzada de MVs secretadas por *T. cruzi* e *T. rangeli* no soro de camundongos experimentalmente infectados e no soro de pacientes chagásicos crônicos. As MVs foram extraídas com o *kit Total Exosome Isolation Reagent* (Invitrogen, EUA) e a avaliação sorológica foi realizada através de ELISA, utilizando extrato proteico total de formas epimastigotas como controle. O soro murino foi reagente até 1:100, tanto frente a MVs de *T. cruzi* ou *T. rangeli*. O soro de indivíduos chagásicos crônicos indeterminados e cardíacos também reagiu com MVs de ambos os parasitos até 1:1000. Esses resultados mostram a imunogenicidade de MVs, bem como a reação cruzada com MVs de *T. rangeli*, sugerindo um possível potencial vacinal.

Introdução

A doença de Chagas (DC) é uma antropozoonose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. A OMS estima em 6 a 7 milhões de pessoas infectadas, sendo considerado um grave problema de saúde pública na América Latina.[1] A falta de opções terapêuticas, as frequentes notificações de casos agudos decorrentes de surtos por contaminação oral e a elevada morbidade e mortalidade justificam a pesquisa de vacinação para a DC. Entretanto, a imunização de camundongos com *T. cruzi* inativado por calor induziu o desenvolvimento de autoimunidade via mimetismo antigênico e cardiomiopatia potencialmente fatal.[2] Dessa forma, o estímulo vacinal com um protozoário não patogênico para humanos, como o *Trypanosoma rangeli*, pode ser uma estratégia relevante e mais segura.

A infecção pelo *T. rangeli* induz uma resposta imune humoral com reatividade cruzada com o *T. cruzi*, pois ambos compartilham cerca de 60% da sua superfície antigênica. Além disso, estudos mostraram que camundongos imunizados com *T. rangeli* apresentaram menor parasitemia, lesões cardíacas brandas ou até ausentes e maior sobrevida após o desafio com *T. cruzi*.[3]

Nesse contexto, o presente trabalho faz parte de um projeto maior e multicêntrico que pretende avaliar o papel das microvesículas secretadas por *T. rangeli* sobre a infecção pelo *T. cruzi* e a resposta imune, identificando quais são os componentes imunogênicos e qual o efeito deles (Edital CNPQ/MS/SCTIE/DECIT Nº 31/2014). Microvesículas são secretadas por diversos tipos celulares eucariontes e apresentam importante função na interação parasito-hospedeiro e na imunomodulação.[4] Assim, o objetivo desse trabalho foi verificar a imunogenicidade cruzada de microvesículas de *T. rangeli* através do reconhecimento de anticorpos presentes no soro de camundongos experimentalmente infectados com *T. cruzi* e no soro de pacientes chagásicos crônicos.

Materiais e Métodos

Obtenção dos soros e das microvesículas

Os soros murinos foram cedidos pela Dra. Alessandra Guarneri do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR-Fiocruz/MG) e pelo Prof. Dr. Phileno Pinge-Filho da UEL e os soros de pacientes chagásicos foram cedido pelo Hospital das Clínicas-UFPR de Curitiba. As instituições parceiras do projeto multicêntrico têm a aprovação dos respectivos comitês de ética (CEUA/Fiocruz: LW-61/12, CEUA/UEL: 262/12, CEP/HC-UFPR: 1457.122/2007-06).

Formas epimastigotas de *T. rangeli* (cepa Choachi) e de *T. cruzi* (cepa Y) foram mantidas a 27ºC em meio LIT no Laboratório de Biologia Celular e Protozoologia da UEPG. A extração e purificação das microvesículas (MVs) foi realizada conforme descrito por Aggio e manual do fabricante kit *Total Exosome Isolation* (Invitrogen). [5] A concentração de proteínas foi determinada pelo sistema *Qubit Fluorometer* (Invitrogen) no Instituto Carlos Chagas (Fiocruz/PR), bem como a avaliação das MVs por *Nano Sight*.

Avaliação da reatividade sorológica por meio de ELISA

As condições descritas a seguir foram previamente padronizadas utilizando extrato total de formas epimastigotas e MVs. A sensibilização das microplacas (96 poços, estéreis e de fundo chato) com antígeno foi realizada com 120 ng/poço de proteína das amostras de MVs em tampão carbonato-bicarbonato (0,05 M, pH 9,6), 100 µl/poço e incubação a 4ºC em câmara úmida. Após 16 horas, foi adicionado 300 µl/poço da solução de bloqueio (PBS 1x/Tween 0,05%/leite 5%).

Após o bloqueio, foi adicionado 50 µl/poço do anticorpo primário: soros murinos (anti-*T.cruzi* ou anti-*T.rangeli*) nos títulos 1:50 e 1:100 ou soro de indivíduos chagásicos crônicos nos títulos 1:50 a 1:1000. Em seguida, foram adicionados 50 µl/poço do anticorpo secundário anti-Ig conjugado a peroxidase (Invitrogen, EUA) de camundongo a 1:200 ou de humano a 1:5000. Todas as diluições foram feitas em tampão de bloqueio, tempo de incubação de 1 hora a 37ºC e entre cada etapa as placas foram lavadas cinco vezes com PBS 1x/Tween 0,05% 300 µl/poço.

As reações foram reveladas pela adição de 60 µl/poço de substrato-cromógeno (TMB/H_2O_2) por 10 minutos ao abrigo da luz; e interrompidas com a adição de 30 µl/poço de ácido sulfúrico (H_2SO_4 36N, diluído 1:9). A leitura foi feita a 450 nm e os resultados expressos como densidade óptica (DO). Em todas as reações foi utilizado como controle negativo (antígeno + soro negativo), controle positivo (extrato total de epimastigotas + soro teste) assim como um branco (ausência de antígeno e soro = apenas tampão de bloqueio).

Resultados e Discussão

A partir de 50 ml de cultura foram obtidos $9x10^8$ parasitos de *T. rangeli* e $18x10^8$ parasitos de *T. cruzi*, dos quais foram obtidos aproximadamente 600 e 1000 µl de MVs, respectivamente. O rendimento proteico dos dois parasitos foi semelhante, tanto para o extrato total de formas epimastigotas, variando de 10 a 13 µg/ml, quanto para as proteínas de superfície das MVs (0,5 µg/ml).

O diâmetro médio, determinado pelo *Nano Sight,* das MVs de *T. cruzi e T. rangeli* foi semelhante: 201,6±28,1 e 290,2±48 nm, respectivamente. Esse tamanho é compatível com o tamanho descrito para MVs de vários tipos celulares e parasitos.[5] Os resultados mostraram que a população de MVs dos tripanosomatídeos é heterogênea em tamanho, mas permanece dentro da faixa de tamanho entre 50 e 200 nm. Também foi observado que as MVs secretadas por *T. rangeli* apresentaram concentração cerca de 10 vezes menor de partículas/ml do que as MVs de *T.cruzi* na mesma diluição (dados não mostrados).

Através do teste de ELISA, os soros murinos se mostraram reativos às MVs próprias (dados não mostrados) e estas, portanto, foram consideradas imunogênicas. Os soros também apresentaram reatividade cruzada (figura 1), sendo que a densidade óptica (DO) mais elevada foi observada nas reações com MVs de *T. rangeli* contra soro anti-*T.cruzi* (figura 1A), com diferença estatística em relação ao controle negativo (p<0,05).

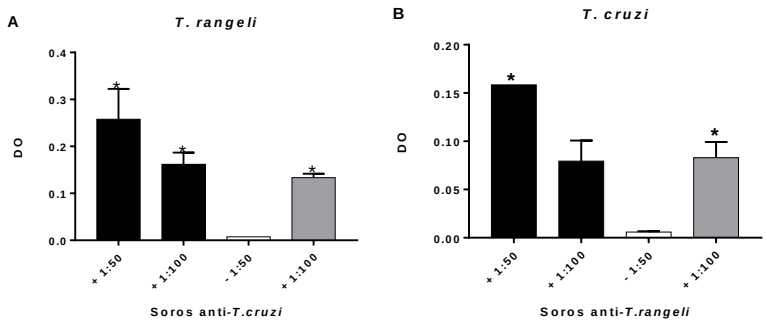


Figura 1: Reatividade sorológica cruzada de MVs de *T. cruzi* e *T. rangeli* frente a soros murinos. A – MVs de *T. rangeli* x soro anti-*T.cruzi* (barras pretas), controle negativo (barra branca) e controle positivo: extrato total de epimastigotas de *T. cruzi* (barra cinza). **B –** MVs de *T. cruzi* x soro anti-*T.rangeli* (barras pretas), controle negativo (barra branca) e controle positivo: extrato total de epimastigotas de *T. rangeli* (barra cinza). Os resultados são expressos como média e desvio padrão de duplicatas e estão com o valor de branco (0,049) subtraído. * p<0,05 ANOVA *one-way* comparado ao controle negativo.

Por outro lado, os soros de pacientes chagásicos crônicos foram reativos às MVs de ambos os parasitos, mas de forma inespecífica, visto que os valores de DO foram semelhantes entre os soros positivos e negativos para as mesmas titulações (figura 2). A falta de especificidade não é devida a qualidade dos anticorpos do soro, pois os mesmos foram muito reativos e específicos contra extrato total de epimastigotas de *T. cruzi* (figura 2C). Esses resultados podem ser devidos à reatividade cruzada entre MVs de diferentes origens ou ainda à baixa carga parasitária dos pacientes que já estão na fase crônica da doença, em contraste aos camundongos, que foram infectados experimentalmente com inóculos altos. Imunoensaios com soros de pacientes em fase aguda podem auxiliar na compreensão destes resultados.

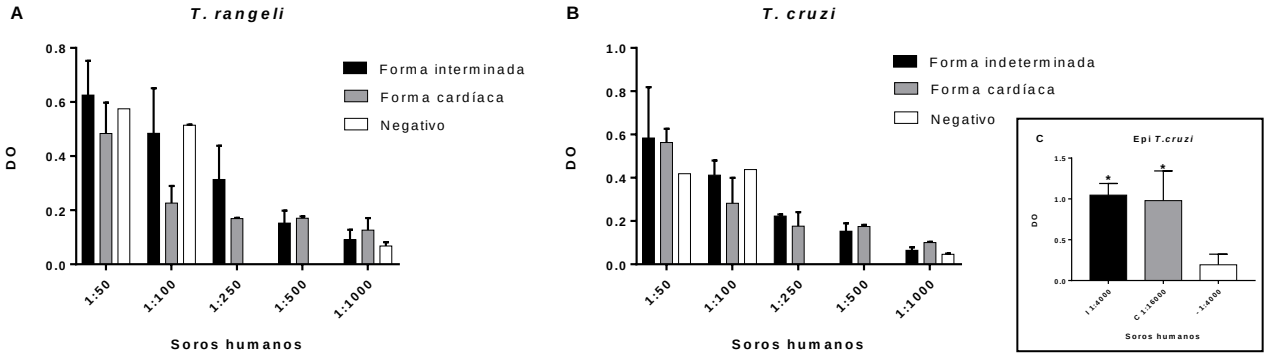


Figura 2: Reatividade sorológica cruzada de MVs de *T. cruzi* e *T. rangeli* frente a soros humanos chagásicos crônicos. A – MVs de *T. rangeli* x soros humanos. **B –** MVs de *T. cruzi* x soros humanos. **C –** Extrato total de epimastigotas de *T. cruzi* x soro humano forma indeterminada (I), cardíaca (C) e negativo (-). Os resultados são expressos como média e desvio padrão de duplicatas e estão com o valor de branco (0,067) subtraído. * p<0,001 ANOVA *one-way* comparado ao negativo.

Conclusões

Os resultados mostram que as microvesículas são imunogênicas e apresentam reatividade cruzada entre *T. cruzi* e *T. rangeli,* tanto em camundongos experimentalmente infectados quanto em pacientes chagásicos crônicos.

Agradecimentos

À UEPG, ao Instituto Carlos Chagas/Fiocruz/PR e ao CNPq pela concessão da bolsa e pelo suporte financeiro (Edital CNPQ/MS/SCTIE/DECIT Nº 31/2014).

Referências

1 COURA J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vector, blood and oral transmissions – A comprehensive review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.110, n. 3, p. 277-282, 2015.

2 BONNEY K. M. *et al*. Heat-killed *Trypanosoma cruzi* induces acute cardiac damage and polyantigenic autoimmunity. **PLoS One**, v. 6, n. 2, 2011.

3 BASSO B. *et al*. Vaccination with epimastigotes of different strains of *Trypanosoma rangeli* protects mice against *Trypanosoma cruzi* infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 4, p. 370-374, 2008.

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

5 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.