

Valéria Oliveira Silva

**Purificação e caracterização de Vesículas
Extracelulares de taquizoítos de *Toxoplasma gondii***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração:

Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientadora:

Profa. Dra. Vera Lucia Pereira-Chioccola

SÃO PAULO

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Silva, Valéria Oliveira

Purificação e caracterização de vesículas extracelulares de taquizoítos de *toxoplasma gondii* / Valéria Oliveira Silva. – 2018.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2018.

Área de concentração: Pesquisa Laboratorial em Saúde Pública
Orientação: Profª. Dra. Vera Lucia Pereira-Chioccola

1. Toxoplasma 2. Toxoplasmose. 3. Cromatografia. 4. Vesículas extracelulares 5. Microscopia eletrônica 6. Nanopartículas

SES/CCD/CD-373/2018

DEDICATÓRIA

A todas as mulheres cientistas do Brasil, que apesar de comporem metade do total de pesquisadores, ainda sofrem com estereótipos no meio acadêmico em subáreas pela premissa de mulheres não terem aptidões por uma questão de gênero. Estar inserido nas áreas de ciências no nosso país significa prestígio, nosso sistema é elitista e é desigual. Prezo para um futuro com maior posicionamento feminino, sororidade, igualdade, melhores condições de trabalho e investimentos para nossas pequenas cientistas.

"A vida encontra um jeito"
Michael Crichton, O Parque dos Dinossauros (1990)

AGRADECIMENTOS

Á Deus, pela força constante.

Meus pais e irmã. Meus primeiros orientadores. Obrigada pela paciência durante minha formação como pessoa, profissional e fé em minha formação acadêmica. Obrigada por terem me motivado a seguir meus sonhos.

A Dra. Vera, pela oportunidade de realizar esse trabalho, ensinamentos, acolhimento e principalmente carinho. Poucos acadêmicos tiveram o privilégio de trabalhar com uma orientadora com coração de mãe. Muito obrigada.

A minha amiga **Martinha.** A primeira pessoa que me acolheu e orientou no meu primeiro dia no laboratório antes, durante e após conclusão deste trabalho. “Se eu matar alguém, ela é a pessoa que eu ligo para me ajudar a arrastar o corpo pela sala. Ela é minha pessoa” .Ainda temos muito trabalho juntas pela frente.

A querida amiga **Daise.** Conselheira, confidente e sem muita frescura e papas na língua conquistou minha amizade e coração. Te amamos muito e sentimos sua falta.

A **Dra. Cristina da Silva Meira,** nossa irmã mais velha a quem nos inspiramos tanto e que está sempre disposta a nos socorrer. Que Deus permita que nós tenhamos metade da sua força, sabedoria, amor e empatia por todos.

Lilian, Luiz, Cida, Margarete, Ricardo, Dra. Gabriela e Marilena. Companheiros de laboratório com quem compartilhei conhecimentos,

experiências e muitas risadas. Muito obrigada por fazer da minha estadia no laboratório muito gostosa. Somos uma grande família.

As aprimorandas, **Alle e Ingrid**, recém integradas ao programa da pós graduação. Obrigada pela amizade e por terem me dado a oportunidade de passar o pouco conhecimento que tenho. Tenho muita fé em vocês.

Aos integrantes de minha banca de qualificação, **Dra Adriana Pardini Vicentini, Dra Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman** e especialmente **Dra Thaís Alves da Costa Silva**, grande conselheira. Te admiro muito pela sua experiência e conhecimentos compartilhados.

Colegas dos laboratórios de **Novos Fármacos, Maiara Romanelli, Maiara Amaral, Viviane, Samanta e Paola**, e aos colegas dos laboratórios de Enteroparasitologia, Parasitoses Sistêmicas, e Micologia do centro de parasitologia e da pós. Com certeza a convivência com vocês, mesmo que por um instante durante o dia, ajudaram a rotina de trabalho a ficar mais prazerosa. Me dá gosto ter profissionais tão gente fina por perto. Obrigada meninas.

À Profa. **Dra. Kátia Cristina Pereira Oliveira Santos** do Departamento de microbiologia, imunologia e parasitologia da Escola Paulista de Medicina da UNIFESP. Muito obrigada pelo acolhimento em seu laboratório, discussões, e auxílio constante.

À Profa. **Dra. Ana Cláudia Trocoli Torrecilhas** e Profa. **Dra. Patricia Xander Batista** do Laboratório de Imunologia Celular e Bioquímica de Fungos e Protozoários da UNIFESP e seus alunos e meus colegas **Kleber, André, João, Maite e Alisson**. Obrigada por terem compartilhado de tanto conhecimento e amizade. Grande parceria.

Á **Dr. Thiago Barcellos e Dra Renata**, pelo suporte psicológico durante a confecção desse trabalho e de minha sustentação emocional.

Ao Programa de Investigação Científica do **Instituto Adolfo Lutz** por ter subsidiado meu primeiro ano no laboratório de Biologia Molecular de Centro de Parasitologia e também a **CAPES e FAPESP** por terem financiado esse trabalho.

Aos fundadores da plataforma **Sci-Hub** por permitirem a disseminação do conhecimento científico universal e gratuito.

Este trabalho teve o apoio financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do
Estado de São Paulo (FAPESP – 2014/09496-1)

Valéria Oliveira Silva teve apoio financeiro da Coordenação de
Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

RESUMO

Toxoplasma gondii, protozoário causador da toxoplasmose, é transmitido dos animais para os seres humanos pela ingestão de carne contaminada ou por oocistos liberados nas fezes de felinos no ambiente. Nos seres humanos, a infecção é normalmente assintomática, mas em casos em que a infecção primária ocorre durante a gravidez ou a reativação da infecção latente ocorre em pacientes imunosuprimidos pode ser grave. Nas últimas décadas tem se estudado pequenas estruturas secretadas pelas células procarióticas e eucarióticas denominadas de vesículas extracelulares (EVs). As EVs podem transportar biomarcadores de doenças, macromoléculas biorreativas contribuindo para a patogênese e sendo uma forma de diagnóstico não invasivo. Estas pequenas estruturas podem ser isoladas por ultracentrifugação, cromatografia e observadas por microscopia eletrônica. Elas participam na comunicação entre as células, na transferência de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo estabelecer um protocolo para isolar e caracterizar vesículas extracelulares produzidas e excretadas por taquizoítos da cepa RH de *T. gondii*. Taquizoítos provenientes de culturas de células VERO foram isolados dos sobrenadantes das culturas e centrifugados em cinco séries de lavagens. A seguir, foram incubados em meio de cultura por 24 horas para secreção das EVs. Em seguida, investigou-se o tamanho e concentração das EVs isoladas por análise de varredura de partículas (NTA) no equipamento NanoSight. Paralelamente, a morfologia e a liberação das EVs também foram investigadas por microscopia eletrônica de transmissão e de varredura. Então, as EVs foram purificadas por cromatografia em gel-exclusão em alíquotas de 1 mL (24-32 frações) e imuno-selecionadas por ELISA utilizando um “pool” de soros reagente para toxoplasmose. A seguir foi investigado a presença de miRNA nas EVs; e finalmente, foi avaliado o perfil proteico das EVs de *T. gondii* para verificar por testes sorológicos se estas partículas poderiam ser reconhecidas pelo sistema imune hospedeiro.

As análises realizadas por NTA permitiram determinar que cerca de 1×10^6 taquizoítos secretaram de 4 a 8×10^8 EVs/mL num período de 24 horas de incubação em meio de cultura celular. Adicionalmente, estas vesículas apresentaram morfologia e tamanho de 165-175 nm de diâmetro, tamanho correspondente às microvesículas. Estes resultados também foram confirmados pela avaliação das imagens fornecidas pelas microscopias eletrônicas de transmissão e varredura. Também foi possível determinar a presença de small RNAs e micro RNAs através de uma corrida eletroforética micro fluídica. As análises por SDS-PAGE mostram que as proteínas que compõem as EVs apresentaram um perfil eletroforético com espectro de 15 a 70 kDa. Soros de camundongos cronicamente infectados (com 2 diferentes cepas de *T. gondii*) e soros humanos reconheceram distintos padrões eletroforéticos no *immunoblotting*. As vesículas liberadas por *T. gondii* podem ser um mecanismo importante pelo qual os parasitas apresentam seus antígenos ao hospedeiro e, portanto, podem ter um papel importante na patogênese da toxoplasmose.

Palavras-chave: 1. *Toxoplasma gondii* 2. Toxoplasmose. 3. Cromatografia. 4. Vesículas extracelulares 5. Microscopia eletrônica 6. Nanopartículas

ABSTRACT

Toxoplasma gondii, a protozoan that causes toxoplasmosis, is transmitted from animals to humans through ingestion of infected meat or oocysts released by felines into the environment. In humans, infection is usually asymptomatic, but in cases where primary infection occurs during pregnancy or the reactivation of latent infection occurs in immunosuppressed patients it can be serious. In the last decades, small structures secreted by prokaryotic and eukaryotic cells called extracellular vesicles (EVs) were studied. These small structures can be isolated by ultracentrifugation, chromatography and examined by electron microscopy. EVs participate in the communication between cells, transfer of proteins, lipids and nucleic acids. In addition, they can carry disease biomarkers, bioreactive macromolecules contributing to the pathogenesis of diseases. In view of the above, the present study aimed to establish a protocol to isolate and characterize extracellular vesicles produced and excreted by tachyzoites of *T. gondii* RH strain. To achieve this goal, tachyzoites from VERO cell cultures were isolated from the culture supernatants and centrifuged in five sets of washes. Next, they were incubated in culture medium for 24 hours for secretion of the EVs. The size and concentration of the isolated EVs by particle scan analysis (NTA) were investigated on the NanoSight (NTA) equipment. In parallel, the morphology and the release of the EVs were also investigated by transmission and scanning electron microscopy. Then, EVs were purified by gel-exclusion chromatography in 1 mL aliquots (24-32 fractions) and immuno-selected by ELISA using a *pool* of reagent sera for toxoplasmosis. Next, the presence of miRNA in the EVs was investigated; and finally, the protein profile of *T. gondii* EVs was evaluated and verified by serological tests if these particles could be recognized by the host immune system. The results showed that the protocol for recovery of *T. gondii* EVs was established from 1 to 10^{10} tachyzoites obtained from cultured cells. Analyzes performed by NTA allowed us to determine that about 1×10^6 tachyzoites secreted 4 to 8×10^8 EVs / mL within 24 hours of incubation in

culture medium. Additionally, these vesicles presented morphology and size of 165-175 nm of diameter, corresponding microvesicles size. These results were also confirmed by the evaluation of images provided by transmission and scanning electron microscopy. The miRNA purifications from the EVs and subsequent microfluidic electrophoretic run confirmed the presence of smallRNA and miRNA in the vesicles. SDS-PAGE analyzes show that the proteins carried by the EVs showed an electrophoretic profile with a spectrum of 15 to 70 kDa. Sera from chronically infected mice (with 2 different strains of *T. gondii*) and human serum recognized distinct electrophoretic patterns in immunoblotting.

Key words: 1. *Toxoplasma gondii* 2. Toxoplasmosis. 3. Chromatography. 4. Extracellular Vesicles 5. Electron Microscopy 6. Nanoparticles

ABREVIATURAS

µg - Microgramas

µl - Microlitros

µm - Micrômetros

ALT - Antígeno Lisado de Taquizoítos

apud - do latim, em

ATL - Antígeno lisado de taquizoítos

BCA - do inglês, Acid Bicinchoninic (Ácido Bicinconínico)

C - Celsius

CD - do inglês, Cluster of Differentiation (Aglomerado de Diferenciação)

cm - Centímetros

CO₂ - Dióxido de Carbono

D.O. - Densidade Óptica

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

ELISA - do inglês, Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Ensaio Imunoenzimático)

ESA - do inglês, Excretory-Secretory Antigen (Antígeno Excretado-Secretado)

EVs - do inglês, Extracellular Vesicles (Vesículas Extracelulares)

g - Aceleração da gravidade

IgG - Imunoglobulina G

in vitro - do latim, em vidro (referência utilizada para processos biológicos que são realizadas em lugares fora dos sistemas vivos)

ISEV - International Society of Extracellular Vesicles

MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

miRNA - MicroRNA

mL - Mililitros

MP - Membrana Plasmática

mRNA - RNA mensageiro

MVs - Microvesículas

nm - Nanômetros

NTA - do inglês, Nanoparticle Tracking Analysis (Análise de Nanopartículas por Varredura)

PBS - do inglês, Phosphate buffered saline (Solução salina de fosfato tamponada)

PBS Leite - Solução salina de fosfato tamponada acrescida de 5% de Leite desnatado (Molico)

PBS T20 - Solução salina de fosfato tamponada acrescida de detergente Tween 20 (0,05%)

pH - Concentração de hidrogênio iônico

PS - do inglês, Phosphatidylserine (Fosfatidilserina)

qRT-PCR - Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real Quantitativo

RIN – do inglês, RNA integrity number (Valor de integridade do RNA)

RNA - Ácido Ribonucleico

RPMI 1640 - do inglês, Roswell Park Memorial Institute 1640

SDS-PAGE - do inglês, Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Gel de eletroforese de dodecil sulfato de sódio)

SEC - do inglês, Size Exclusion Chromatography (Cromatografia de Exclusão por Tamanho)

SFB - do inglês, Serum Fetal Bovine (Soro Fetal Bovino)

TET – Tetraspaninas

UC – Ultracentrifugação

UF- Ultrafiltração

UV - Ultravioleta

VERO - do esperanto, Verda reno (células de rim-de-macaco-verde-africano *Cercopithecus aethiops*)

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1. Esquema representativo da estrutura interna de um taquizoítos de *T. gondii* (A); Micrografia eletrônica de um taquizoítos, evidenciando as estruturas interna: Conóide (C), Róptrias (R), Grânulo denso (g), Apicoplasto (A), Complexo de Gongi (CG) e Núcleo (N). Fonte: Souza et al., 2010.....23
- Figura 2. Micrografia eletrônica de transmissão de um taquizoítos da cepa VEG de *T. gondii* em uma célula de lavado peritoneal de camundongo com estruturas internas em destaque: Conóide (Co), Róptrias (Rh), Grânulo denso (Dg), Plasmalema (Pv), Complexo de Gongi (Go) e Núcleo (Nu), Micronema (Mn), Grânulo de amilopectina (Am) e Corpo Lipídico (Lb). Fonte: Dubey et al., 1998.....24
- Figura 3. *Imprint* de microscopia de luz de um cisto tecidual do cérebro de camundongo contendo bradizoítos. Um cisto maduro mede de 50 a 70 μm de diâmetro e contém cerca de 1000 a 2000 bradizoítos. Fonte: Dubey et al., 1998.....26
- Figura 4. Micrografias de oocistos de *T. gondii*. Micrografia de luz de Oocisto não esporulado (A), micrografia de luz de oocisto esporulado com 2 esporocistos (B) micrografia eletrônica de transmissão de oocisto esporulado contendo 4 esporozoítos. Medem cerca de 10-12 μm de diâmetro. Fonte: Dubey et al., 1998.....26
- Figura 5. Esquema ilustrativo do ciclo biológico assexuado e sexuado de *T. gondii* e seus respectivos hospedeiros: intermediário (esquerda) e definitivo (direita). Fonte: Robert-Gangneux e Dardé, 2012; modificado por Valéria Oliveira Silva.....28

Figura 6. . Esquema ilustrativo das etapas da endodiogenia de *T. gondii*
Fonte: de Souza et al., 2010 modificado por Valéria Oliveira Silva.....27

Figura 7. Figura ilustrativa de um taquizoíta de *T. gondii* com microscopia de fluorescência evidenciando suas organelas secretoras. Fonte: Joiner e Roos, 2002. Modificado por Valéria Oliveira Silva.....31

Figura 8. Vias de transmissão da toxoplasmose. Fonte: Robert-Gangneux e Dardé, 2010. Modificado por Valéria Oliveira Silva.....33

Figura 9. Mapa ilustrando a situação global da soroprevalência de *T. gondii*. Em vermelho escuro a prevalência é igual ou acima de 60%, vermelha é de 40-60%, amarelo de 20-40%, azul de 10-20% e verde prevalência menor que 10%. Branco é igual a ausência de dados. Fonte: Pappas et al., 2009, modificada por Valéria Oliveira Silva.....35

Figura 10. Representação esquemática de subtipos de EVs liberadas por uma célula: exossomos (1), microvesículas (2) e os corpos apoptóticos (3). Fonte: Kalra et al., 2016. Modificado por Valéria Oliveira Silva.....36

Figura 11. Biogênese de exossomos, modificado por Valéria Oliveira Silva. Fonte: Schorey et al., 2015.....38

Figura 12. Micrografia eletrônica de transmissão de exossomos derivados de reticulócitos, marcados com um anticorpo monoclonal contra o receptor da transferrina. Fonte: Johnstone, 2005 apud Akers et al., 2013.....46

Figura 13. Delineamento dos experimentos realizados na dissertação.....51

Figura 14. Concentração e tamanho de partículas liberadas por 2×10^8 taquizoítos no sobrenadante, durante 3 horas. As análises foram feitas em triplicata contendo 400 μ l de produto liberado (as réplicas foram

representadas por círculos, quadrados e triângulos) no equipamento NanoSight NS3000.....64

Figura 15. EVs liberadas por 1×10^6 taquizoítos de *T. gondii* em diferentes períodos de incubação (1, 3, 6, 12, 20 e 24 horas). As análises do tamanho das partículas foram realizadas num volume de 400 uL de produto liberado por taquizoítos, em triplicata e no equipamento NS3000. Os valores estão expressos em média aritmética \pm EPM. Não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa no tamanho das partículas nos períodos de incubação observados (Análise estatística pelo método “Tukey-ANOVA”65

Figura 16. EVs liberadas por 1×10^6 taquizoítos de *T. gondii* em diferentes períodos de incubação (1, 3, 6, 12, 20 e 24 horas). As análises das concentrações de partículas foram realizadas no volume de 400 uL de produto liberado por taquizoítos, em triplicata, e no equipamento NanoSight NS3000. Os valores estão expressos em média aritmética \pm EPM. (Análise estatística pelo método Tukey ANOVA”).....66

Figura 17. Imagens gráficas de NTA (NanoSight) das EVs liberadas por 1×10^6 taquizoítos de *T. gondii* por 1 hora (A) e por 24 horas (B). Experimento realizado em triplicata. Cada amostra é representada por uma cor (vermelho, amarelo e laranja).....66

Figura 18. Isolamento de EVs de taquizoítos da cepa RH de *T. gondii*. Reatividade das frações eluídas por cromatografia em gel-exclusão (Sephacrose CL-4B). A metodologia utilizada foi ELISA utilizando um “pool” de soros reagente para toxoplasmose (círculos cheios) e um “pool” de soros não-reagentes para toxoplasmose (círculos vazios). Os resultados representam absorvância de cada fração na densidade óptica (D.O) de 492 nm. Os controles positivos nas reações apresentaram D.O em torno de 1,5.....68

Figura 19. Concentração de partículas/mL das frações do isolamento das EVs (frações contendo 1 mL) por NTA. Experimento realizado no equipamento NanoSight.....69

Figura 20. Dosagem das concentrações protéicas ($\mu\text{g/mL}$) das frações contendo as EVs pelo método BCA.....69

Figura 21. Fotografias capturadas por microscopia eletrônica de varredura de taquizoítos (cepa RH) de *T. gondii* liberando EVs pela superfície da membrana após incubação em meio de cultura RPMI durante 2 h (A e B) e 24 horas (C e D). Ampliação: (A) 104.767; (B) 54.619; (C) 108.169 e (D) 76.191.....71

Figura 22. Imagens capturadas por microscopia eletrônica de transmissão de considerável quantidade de EVs após purificação pela cromatografia. As frações reativas foram concentradas e preparadas para a microscopia. Amplificação: 25.000 (A) e 60.000 (B).....72

Figura 23. Imagem representativa do gel contendo miRNA celular (dos taquizoítos da cepa RH de *T. gondii*) e das EVs. As amostras foram analisadas no Agilent 2100 Bioanalyzer (usando o kit Small RNA expert). O marcador de massa molecular (em nucleotídeos) está indicado no lado esquerdo.....73

Figura 24. Concentrações *small*/RNA/miRNA nas frações contendo as EVs purificadas. Unidades de fluorescência (FU) no eixo Y e marcadores de peso molecular em número de nucleotídeos (nt) no eixo X. (A), distribuição gráfica de *small*/RNA e miRNA por padrões eletroforéticos das moléculas de RNA extraídas de taquizoítos (celular), diluídas 1:20,1:200 e das EVs (amostras 1 e 2). Em (B) são mostrados apenas os resultados do RNA extraído de taquizoítos diluído 1:200 e de EVs (amostras 1 e 2).....74

Figura 25. As proteínas das EVs (10 µg) foram separadas por SDS-PAGE a 10% e coradas (EVs) e transferidas para nitrocelulose. Os soros foram incubados com as tiras de nitrocelulose e são: pool de soros de camundongos cronicamente infectados com a cepa VEG (tira 1) e com a cepa ME-49 (tira 2). Soro humano reagente (tira 3) e soro humano não reagente para toxoplasmose (tira 4).....75

TABELAS

Tabela 1. Concentração (partículas/mL) e diâmetro (nm) de EVs liberadas por 2×10^8 taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* em meio RPMI durante 3 horas. A análise foi realizada em triplicata no NanoSight NS3000.....64

Tabela 2. Quantidades totais de smallRNA, miRNA e a relação de smallRNA/miRNA de taquizoítos de *T. gondii* (celular), diluído 1:20; 1: 200 e das EVs purificadas (amostras 1 e 2).....74

.

ÍNDICE

1. Introdução.....	20
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i>	23
1.1.1. Organelas secretórias e antígenos de <i>T. gondii</i>	24
1.1.2. Ciclo de vida e biologia.....	24
1.1.3. Epidemiologia.....	32
1.2. Vesículas Extracelulares.....	32
1.2.1. Nomenclatura.....	34
1.2.2. Biogênese e classificação das EVs.....	34
1.2.2.1. Exossomos.....	34
1.2.2.2. Microvesículas.....	36
1.2.2.3. A composição das EVs.....	37
1.3. EVs e os parasitas.....	38
1.4. Métodos de isolamento e caracterização das EVs.....	39
1.4.1. Isolamento.....	40
1.4.2. Caracterização.....	41
1.5. Eletroforese vertical de proteínas e Immunoblotting.....	42
1.6. Microscopia Eletrônica.....	42
1.7. Justificativa.....	44
2. Objetivos.....	46
2.1. Objetivo geral.....	46
2.2. Objetivos específicos.....	46
3. Material e Métodos.....	47
3.1. Considerações éticas.....	47
3.2. Delineamento Experimental.....	48
3.3. Culturas celulares.....	49
3.3.1. Cultura de células VERO.....	49
3.3.2. Manutenção in vitro da cepa RH de <i>T. gondii</i>	49
3.4. Antígeno lisado de taquizoítos (ALT).....	49
3.5. Soros utilizados nos ensaios.....	50
3.6. Obtenção das EVs.....	51

3.6.1. Isolamento das EVs.....	51
3.6.2. Triagem das frações contendo EVs de <i>T. gondii</i> por ELISA.....	52
3.6.3. Dosagem das proteínas de EVs.....	53
3.7. Caracterização das EVs por NanoSight: concentração e diâmetro.....	53
3.8. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM).....	54
3.9. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	55
3.10. Análise de miRNA do conteúdo das EVs.....	55
3.10.1. Extração e dosagem de RNA e miRNA.....	55
3.11. Análise protéica do conteúdo das EVs.....	57
3.11.1. Eletroforese vertical das proteínas.....	57
3.11.2. Imunoblotting.....	58
3.12. Análise de dados.....	59
4. Resultados.....	60
4.1. Padronizações: tempo de incubação.....	60
4.2. Purificação das EVs liberadas por taquizoítos de <i>T. gondii</i>	64
4.2.1. Purificação por cromatografia e seleção por ELISA.....	64
4.2.2. Análise protéica por BCA e da concentração de partículas por NTA.....	65
4.3. Caracterização das EVs liberadas por taquizoítos de <i>T. gondii</i>	67
4.3.1. Estrutura e liberação das EVs pela superfície da membrana de taquizoítos analisadas por microscopia eletrônica.....	67
4.3.2. Dosagem de miRNA das EVs de <i>T. gondii</i>	69
4.3.3. Análise do perfil proteico das EVs e o reconhecimento da resposta imune hospedeira.....	72
5. Discussão.....	73
6. Conclusão.....	79
7. Referências Bibliográficas.....	80
8. Anexos.....	101
8.1. Anexo 1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz.....	101

1. Introdução

1.1. *Toxoplasma gondii*

O protozoário *Toxoplasma gondii* (Figura 1) foi encontrado pela primeira vez parasitando coelhos de um laboratório em São Paulo, Brasil, por Alfonso Splendore no ano de 1908. Em paralelo a descoberta por Splendore, o protozoário também foi descrito no Instituto Pasteur da Tunísia pelos pesquisadores Niccole e Manceaux, que trabalhavam com *Leishmania* quando eles observaram um microrganismo dentro de células mononucleares do baço e fígado de *Ctenodactylus gundi*, um roedor norte-africano utilizado na pesquisa (Dubey, 2008; Ferguson, 2009; Ajioka e Morrissette, 2009).

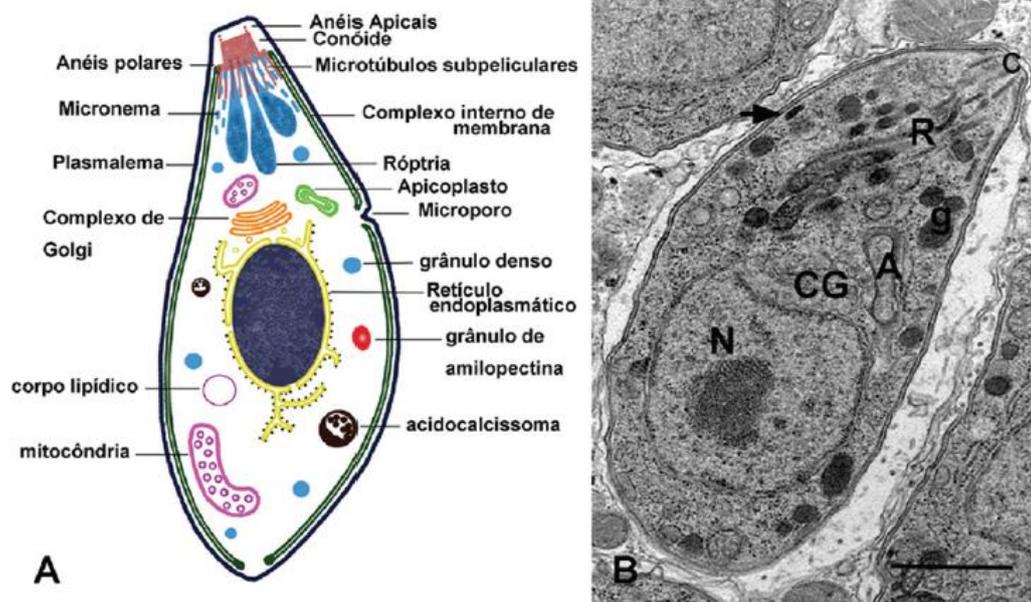


Figura 1. Esquema representativo da estrutura interna de um taquizoíta de *T. gondii* (A); Micrografia eletrônica de um taquizoíta, evidenciando as estruturas interna: Conóide (C), Róptrias (R), Grânulo denso (g), Apicoplasto (A), Complexo de Golgi (CG) e Núcleo (N). Fonte: Souza et al., 2010.

O parasita pertence ao filo Apicomplexa (motilidade planar; organismos unificados por um complexo apical constituído por um centro de organização de microtúbulos único chamado conóide e um sistema de organelas de secreção envolvidos na invasão celular) (Souza et al., 2010). É um protozoário da classe Sporozoa, da Subclasse Coccídea (organismos formadores de cisto) e ordem Eimeriorida (Morrissette e Sibley, 2002; Hill et al., 2005).

Por ser um parasita intracelular obrigatório, infecta animais de sangue quente, invadindo, estabelecendo e replicando-se dentro de todos os tipos de células nucleadas (Levine et al., 1980; Tenter et al., 2000; Carruthers, 2002; Montoya e Liesenfeld, 2004).

Exibe três formas evolutivas: os taquizoítos (formas livres), bradizoítos (cistos teciduais) e os esporozoítos (em oocistos) (Dubey et al., 2008).

Taquizoíto (Figura 2) de *T. gondii*, nome que significa "arco" e vem de *tachos*, que significa "velocidade", é de origem grega (Frenkel, 1973 *apud* de Souza et al., 2010).

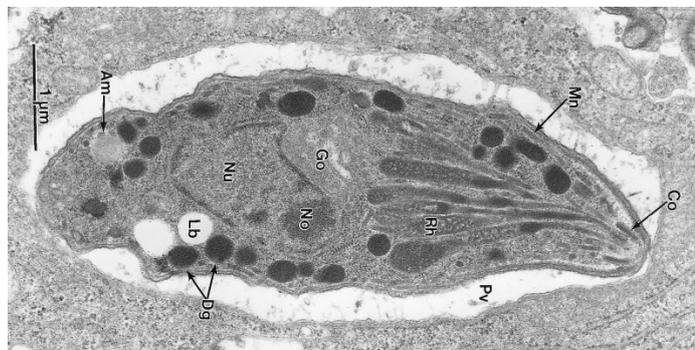


Figura 2. Micrografia eletrônica de transmissão de um taquizoíto da cepa VEG de *T. gondii* em uma célula de lavado peritoneal de camundongo com estruturas internas em destaque: Conóide (Co), Róptrias (Rh), Grânulo denso (Dg), Plasmalema (Pv), Complexo de Gongí (Go) e Núcleo (Nu), Micronema (Mn), Grânulo de amilopectina (Am) e Corpo Lipídico (Lb). Fonte: Dubey et al., 1998.

Os taquizoítos contam com organelas secretoras de antígenos presentes na porção anterior ou região do complexo apical do parasita. Não

existem diferenças estruturais ou morfológicas entre os tipos de cepas de *T. gondii* (Howe e Sibley, 1995; Dubey et al., 1998). São responsáveis pela fase aguda da infecção, causando intensa inflamação, destruição tecidual e manifestações clínicas (Frenkel, 1974). Devido à sua eficiente capacidade de multiplicação podem causar infecção generalizada, normalmente fatal, se não forem controlados pelo sistema imunológico do hospedeiro (Blader et al., 2009).

As estruturas que compõem o complexo apical são: conóide, as róprias e o citoplasma. As outras estruturas do parasita que estão presentes na membrana plasmática (MP) são o núcleo, complexo de Golgi e apicoplasto. A mitocôndria é única e ramificada. Os grânulos densos e acidocalcissomas são elementos do retículo endoplasmático. Os grânulos de amilopectina são elementos do Complexo de Golgi (Souza et al., 2010). O conjunto de organelas que compõem *T. gondii* é envolvido por uma película que parte do anel polar posterior, percorre o corpo celular do parasita na longitudinal até o anel polar anterior (Souza et al., 2010). A película está associada à elementos do citoesqueleto que permitem que o parasita se locomova, infectando as células ativamente (Souza et al., 2010).

Bradizoítos (brady = lento, em grego) é o estágio do parasita de reprodução intracelular lenta (Frenkel, 1973 *apud* Dubey, 1998). Não são necessariamente estáticos. A formação do cisto tecidual (Figura 3) ocorre com a ação do sistema imune do hospedeiro e varia de tamanho, pois este depende da idade do cisto, o tipo de célula hospedeira e a cepa de *T. gondii* (Lyons et al., 2002). O desenvolvimento dos cistos nos tecidos do hospedeiro, indiferente da localização, define o estágio crônico da infecção. A resposta imune do hospedeiro, quando eficaz, normalmente evita a reativação ou recrudescimento dos cistos (Gross e Pohl, 1996).

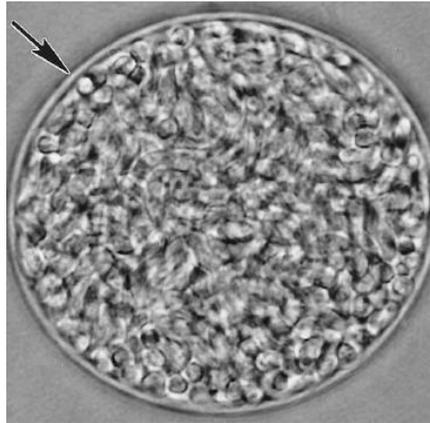


Figura 3. *Imprint* de microscopia de luz de um cisto tecidual do cérebro de camundongo contendo bradizoítos. Um cisto maduro mede de 50 a 70 μm de diâmetro e contém cerca de 1000 a 2000 bradizoítos. Fonte: Dubey et al., 1998.

Os oocistos são resultantes do ciclo sexuado de *T. gondii* no trato gastrointestinal dos felídeos na *primo*-infecção e liberados nas fezes, ainda não esporulados (Dubey, 1970) (Figura 4). Entre 2 e 20 milhões de oocistos são liberados nas fezes dos felídeos durante a infecção aguda (Dubey, 1995).

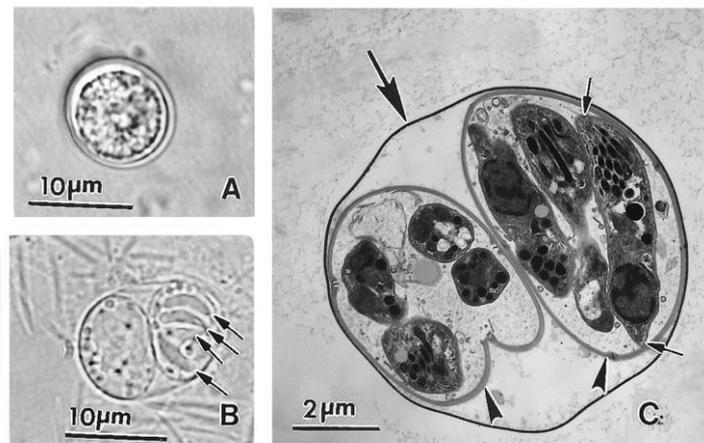


Figura 4. Micrografias de oocistos de *T. gondii*. Micrografia de luz de Oocisto não esporulado (A), micrografia de luz de oocisto esporulado com 2 esporocistos (B) micrografia eletrônica de transmissão de oocisto esporulado contendo 4 esporozoítos. Medem cerca de 10-12 μm de diâmetro. Fonte: Dubey et al., 1998.

1.1.1. Ciclo de vida e biologia

As formas sexuais dos parasitas são encontradas no epitélio intestinal dos hospedeiros definitivos, os felinos, como os gatos domésticos. O homem, outros mamíferos e as aves, hospedam as formas assexuadas do parasita (Tenter et al., 2000).

O ciclo sexual de *T. gondii* é restrito aos felinos (Dubey, 1970). Os cistos ou oocistos são ingeridos e no estômago, através da digestão ácida que contém enzimas proteolíticas, os bradizoítos contidos nos cistos ou os esporocistos que contém os esporozoítos (nos oocistos), são liberados. Invadem o epitélio intestinal onde diferenciam-se em cinco estágios (Dubey, 1970; Tenter, 2000; Moura et al., 2009; Pittman e Knoll, 2015). Os esquizontes do último estágio dão origem a merozoítos, que posteriormente se diferenciam em gametas feminino e masculino. O gameta masculino (microgameta) fertiliza o gameta feminino (macrogameta) formando o oocisto diploide, que é eliminado nas fezes dos felinos (15 dias após a exposição). No ambiente, os oocistos se tornam esporulados (infectantes), contendo 2 esporocistos, cada um com 4 esporozoítos haploides. Em torno de 2-10 milhões de oocistos são eliminados diariamente nas fezes dos felinos durante a infecção aguda (Dubey et al., 1970; Yilmaz e Hopkins, 1972; Dubey e Frenkel, 1972; Tenter et al., 2000; Black e Boothroyd, 2000; Weiss e Kim, 2000; Tenter et al., 2000; Kasper et al e Buzoni-Gatel, 2001; Speer e Dubey, 2005; Moura et al., 2009; Souza et al., 2010; Pittman e Knoll, 2015; Hill e Dubey, 2016).

O ciclo assexual ocorre nos hospedeiros intermediários, de sangue quente, como o homem (Dubey, 1994). Os cistos contendo bradizoítos persistem durante toda a vida do hospedeiro. Estes se infectam ingerindo tecidos contaminados com cistos, ou alimentos e/ou água contaminados com oocistos. Após 12 horas os esporozoítos liberados na luz do intestino delgado, invadem os enterócitos e se diferenciam em taquizoítos no epitélio intestinal (iniciando a indução da resposta imune) (Cleary et al., 2002; Dubey et al., 1998; Pittman e Knoll, 2015). Esses replicam-se por 48 horas e podem

ser detectados nos gânglios linfáticos. Quando dentro de células dendríticas e macrófagos, podem disseminar-se rapidamente por todos os sistemas do hospedeiro. Por pressão do sistema imunológico, os taquizoítos se convertem em bradizoítos (estágio associado a infecção crônica). O ciclo biológico de *T. gondii* está representado no esquema ilustrativo da Figura 5.

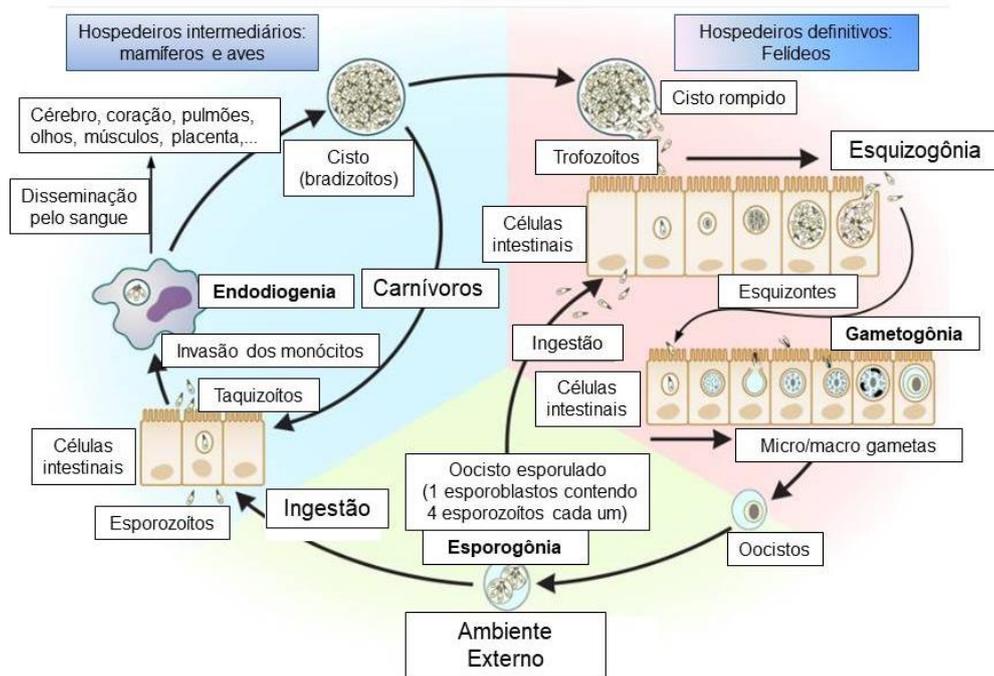


Figura 5. Esquema ilustrativo do ciclo biológico assexuado e sexuado de *T. gondii* e seus respectivos hospedeiros: intermediário (esquerda) e definitivo (direita). Fonte: Robert-Gangneux e Dardé, 2012; modificado por Valéria Oliveira Silva.

Após penetrarem na célula hospedeira ativamente ou por fagocitose, os taquizoítos tornam-se ovóides e são cercados pelo vacúolo parasitóforo (VP). Uma rede tubulovesicular membranosa se desenvolve dentro desse, onde os parasitas se multiplicam assexuadamente por endodiogênese (Figura 6) (Dubey et al., 1998).

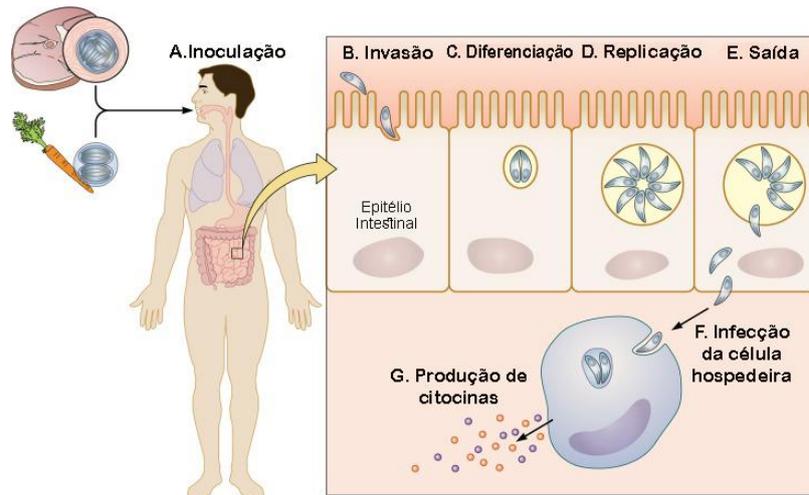


Figura 6. . Esquema ilustrativo das etapas da endodiogenia de *T. gondii* Fonte: de Souza et al., 2010 modificado por Valéria Oliveira Silva

1.1.2. Organelas secretórias e antígenos de *T. gondii*

A classificação das proteínas de *T. gondii* é baseada na localização ou função dos produtos de genes. Por exemplo: SAG para antígenos de superfície, GRA para proteínas de grânulos densos, ROP para proteínas das rôprias, MIC para proteínas nos micronemas, BAG para proteínas específicas de bradizoítos e CST para proteínas da parede de cistos (Jones et al., 2017). À medida que as proteínas/genes em cada classe foram identificadas, foram atribuídos números. Portanto, o primeiro antígeno de superfície descrito é conhecido como SAG1 (anteriormente chamado p30). O gene é indicado por itálico, ou seja, *SAG1* e a proteína por letras maiúsculas, ou seja, SAG1 (Velge-Roussel et al., 1994 *apud* Wang e Yin, 2014).

Os componentes imunogênicos de *T. gondii* estão predominantemente distribuídos na MP do parasita, compreendendo os antígenos de superfície (SAG) e compartimentalisados nas organelas secretórias liberados no momento da invasão celular (Velge-Roussel et al., 1994 *apud* Wang e Yin, 2014).

A superfície celular externa dos taquizoítos é recoberta com proteínas de peso molecular variando de 22 a 43 kDa. Todas ancoradas na

membrana por pontes de glicosilfosfatidilinositol (GPIs) (Tomavo et al., 1993). Essas proteínas são estruturalmente relacionadas ao antígeno de superfície altamente imunogênico SAG1, que representa até 5% do total de proteínas de taquizoítos, porém não expresso em bradizoítos ou esporozoítos (Bulow et al., 1991).

Coletivamente estes antígenos são conhecidos como superfamília de proteínas SRS (sequências relacionadas à SAG1) (Jung et al., 2004). Este grupo de antígenos promove a interação entre a membrana do parasita e a célula hospedeira através de moléculas ligantes ou receptores celulares que auxiliam o parasita na entrada da célula (Kasper e Mineo, 1994; Grimwood e Smith, 1995). A expressão dessas proteínas é regulada de acordo com a fase do desenvolvimento biológico do parasita. As proteínas SAG1 e SAG3 (P43) são exclusivamente produzidas por taquizoítos (Gross et al., 1996), bem como a SAG2A (Lekutis et al., 2000; Cleary et al., 2002). Já a SAG2C/D, BSR4 e SRS9 são encontradas apenas em bradizoítos (Lekutis et al., 2000; Cleary et al., 2002). As proteínas SAG4 e BSR4/p36 são proteínas de superfície ligadas à proteína do citosol BAG1, expressa especificamente em bradizoítos (Bohne et al., 1995; Odberg-Ferragut, 1996).

De maneira geral, *T. gondii* excreta/secretora uma grande variedade de proteínas. Várias já foram descritas e exercem importantes funções na invasão (Lycke et al., 1975), replicação e manutenção dos parasitas na célula hospedeira (Cesbron-Delauw, 1993; Carruthers, 1999). A estas proteínas ou antígenos são chamados de Antígenos Secretados ou Excretados (do inglês “*excreted secreted antigens*” ESA). A Figura 7 mostra as organelas secretórias, suas expressões e consequente estimulação do sistema imune hospedeiro. Estas organelas constituem em um importante objeto de estudo na toxoplasmose (Capron e Dessaint, 1988; Prigionne et al., 2000).

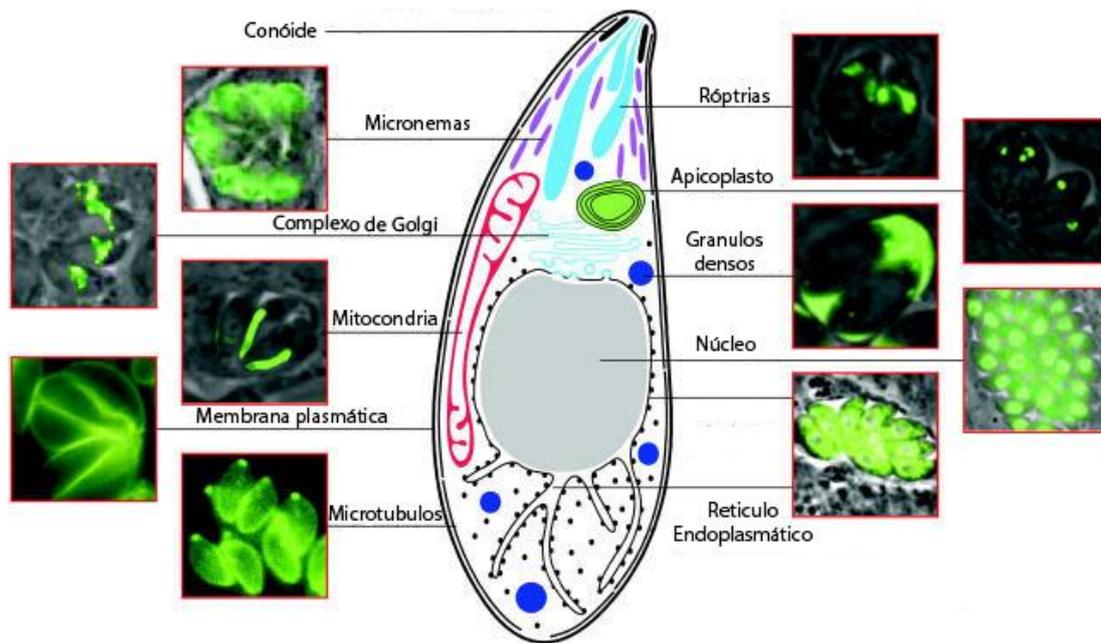


Figura 7. Figura ilustrativa de um taquizoíta de *T. gondii* com microscopia de fluorescência evidenciando suas organelas secretoras. Fonte: Joiner e Roos, 2002. Modificado por Valéria Oliveira Silva.

Os micronemas são estruturas cilíndricas localizadas no terço anterior do corpo do parasita (Carruthers, 1999). Promovem motilidade, ligação e interação parasita-hospedeiro pela produção de antígenos de excreção/secreção. A produção destes antígenos é regulada por estas interações parasita-hospedeiro e por níveis de cálcio intracelular do parasita (Wan et al., 1997; Carruthers e Sibley, 1999; Reiss et al., 2001).

As róptrias são organelas secretórias eletro densas, delimitadas por membranas, que assumem a forma de largas claves (Perkins, 1992). Suas proteínas participam do processo de ataque e invasão das células hospedeiras por taquizoítos, assim como do processo de biogênese de um vacúolo parasitóforo funcional ao parasita (Carruthers, 1999; Reiss et al., 2001). A secreção destas proteínas ocorre no momento da união apical, antes da penetração na célula hospedeira (Carruthers e Sibley, 1997).

Os grânulos densos são organelas esféricas distribuídas pelo citoplasma do parasita com uma média de diâmetro de 0.2 μm (Carruthers, 1999; Prigione et al., 2000). Sua matriz é uniformemente eletro densa devido à alta concentração de proteínas (Souza, 2006). Carruthers e Sibley (1997)

mostraram que a secreção de proteínas dos grânulos densos ocorre após a invasão do parasita e sua internalização dentro do vacúolo parasitóforo, principalmente nos primeiros 10-20 minutos da formação do vacúolo. Diferente da secreção dos micronemas e róptrias que ocorre na região apical, a secreção de grânulos densos ocorre nas regiões laterais do protozoário (Souza, 2006). As proteínas secretadas pelos grânulos densos associam-se com a membrana do vacúolo parasitóforo e com a rede membranosa vacuolar derivada do parasita (Adjogble et al., 2004; Souza, 2006).

1.1.3. Epidemiologia

T. gondii é um dos parasitas mais bem-sucedido em todo o mundo, com mais de 30% da população humana infectada (Pittman e Knoll, 2015). É capaz de infectar uma grande variedade de hospedeiros vertebrados, como aves, animais terrestres e mamíferos marinhos (Tenter et al., 2000; Dubey, 2002; Conrad et al., 2005). A prevalência do parasita pode variar dependendo da exposição, ultrapassando 50% em cães, galinhas domésticas, animais de corte para consumo (ruminantes, suínos e coelhos) e também lontras marinhas (Conrad et al., 2005; Tenter, 2009). Em ratos e aves selvagens, a prevalência chega a 60% e em felinos e humanos é superior a 70% (Webster, 2007). A importância da doença é tanto médica quanto veterinária por causar aborto ou doença congênita em seus hospedeiros intermediários (Tenter et al., 2000).

A transmissão de *T. gondii* para os hospedeiros ocorre pela ingestão de frutas e vegetais crus e/ou não lavados; contato com o solo e ingestão de água contendo oocistos esporulados; ingestão de carne crua ou pouco cozida contendo cistos de tecido (Hill e Dubey, 2002; Dubey, 2004; Hill et al., 2005; Dubey e Jones, 2008).

A forma congênita da infecção é a forma vertical. É a infecção primária adquirida por uma gestante, em que os taquizoítos podem colonizar o tecido placentário e ter acesso ao compartimento fetal (30% dos casos) (McAuley, 2014). A passagem transplacentária dos taquizoítos no início da gravidez gera consequências severas para o feto (Stegmann e Carey, 2002; Coyne e Lazer, 2016).

Como os taquizoítos de *T. gondii* podem invadir todas as células nucleadas, os cistos podem ser encontrados em praticamente todos os órgãos. Portanto, no transplante de órgãos sólidos, a infecção por *T. gondii* pode ser transmitida através de um órgão contendo cisto de um doador para um receptor não imunizado (Ryning et al., 1979 *apud* Robert-Gangneux e Dardé, 2010). A Figura 8 mostra o esquema de transmissão de *T. gondii*.

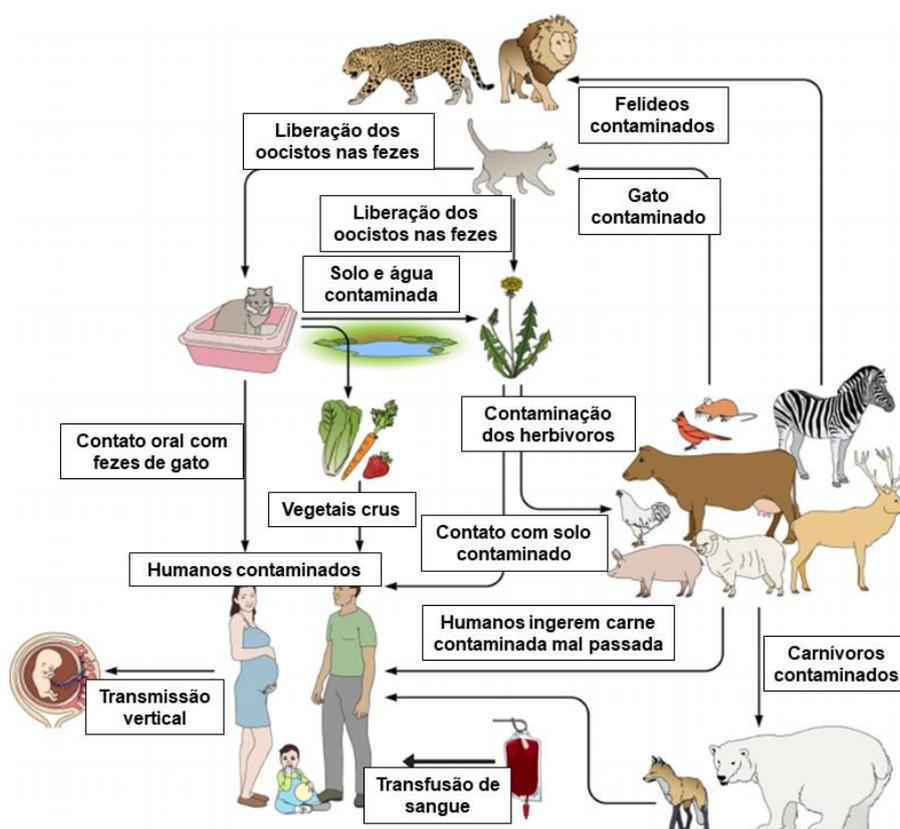


Figura 8. Vias de transmissão da toxoplasmose. Fonte: Robert-Gangneux e Dardé, 2012. Modificado por Valéria Oliveira Silva.

O diagnóstico da toxoplasmose é muitas vezes negligenciado e os casos confirmatórios são subnotificados no Brasil e em outros países (Vaz et al., 2011; Jones et al., 2014). Ainda assim foi citada como a terceira doença parasitária transmitida por alimentos que mais motiva internações nos Estados Unidos (Mead et al., 1999; Hill e Dubey, 2002; Montoya e Liesenfeld, 2004).

A epidemiologia em populações humanas pode mudar de acordo com hábitos alimentares, como o consumo de carne malcozida (Tender et al., 2000). Higiene e susceptibilidade do hospedeiro também são fatores que podem contribuir para a distinta prevalência global (Pappas, 2009). Essa variação depende da localidade, *status* econômico e de saúde da população, que colaboram para variação epidemiológica mundial de 10% a 80%, como ilustrado na Figura 9 (Tenter et al., 2000; Dubey, 2009).

Verões mais secos e invernos mais úmidos são exemplos de mudanças climáticas que influenciam na sobrevivência dos oocistos (Yan et al., 2016). Hábitos econômicos, sociais, dietéticos e culturais são fatores antropogênicos. Quando esses fatores são associados a países de clima úmido e quente e a qualidade das vias hídricas dispostas para consumo, contribuem para a prevalência da toxoplasmose (Meerburg e Kijlstra, 2009).

O estágio de esporulação dos oocistos (1 a 5 dias para se tornarem infecciosos) influencia na resistência ambiental. Em ambientes úmidos, os oocistos esporulados permanecem infecciosos por anos, resistindo ao frio e o calor (Dubey, 1988). Provas laboratoriais demonstraram que os oocistos esporulados sobreviveram a 4°C por pouco menos de 5 anos (54 meses) e por 106 dias quando congelados a - 10° C. Sobrevivem por 32 dias a 35° C e 9 dias a temperatura de 40° C (Dubey et al., 1970).

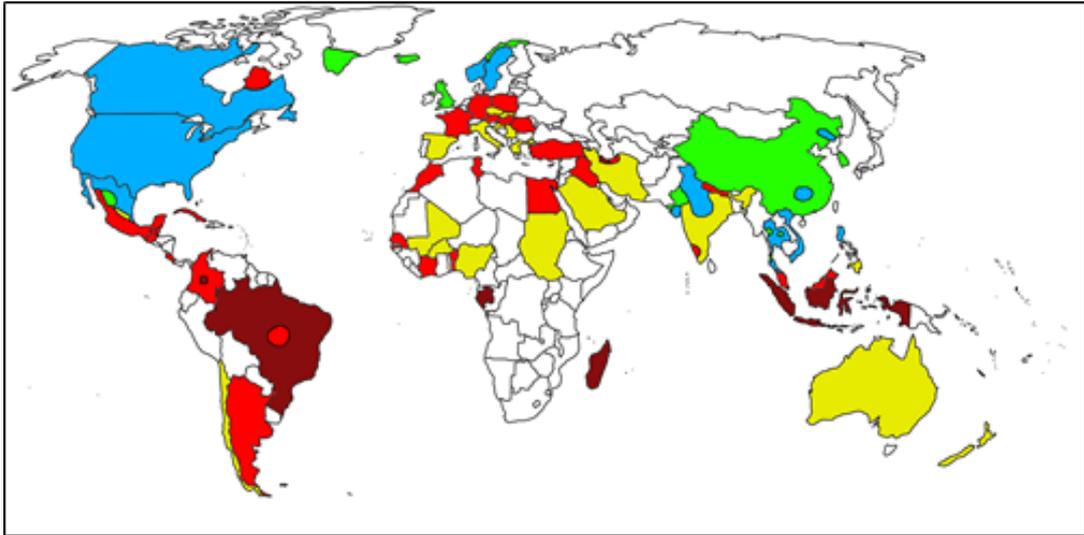


Figura 9. Mapa ilustrando a situação global da soroprevalência de *T. gondii*. Em vermelho escuro a prevalência é igual ou acima de 60%, vermelha é de 40-60%, amarelo de 20-40%, azul de 10-20% e verde prevalência menor que 10%. Branco é igual a ausência de dados. Fonte: Pappas et al., 2009, modificada por Valéria Oliveira Silva.

O Brasil é considerado endêmico, pois 50% e 80% da população já foi exposta à infecção por *T. gondii*. Justificativas para a soroprevalência, assim como alta prevalência da toxoplasmose ocular no continente e no Brasil são o clima das florestas tropicais, que podem permitir a prolongada sobrevivência ambiental de oocistos no solo ou em água. Em adição, esta região apresenta maior variedade de genótipos do que na América do Norte e Europa (Khan et al., 2006; Khan et al., 2007; Dubey, 2012), o que sugere que a replicação sexual do parasita seja maior nos países de alta soroprevalência.

1.2. Vesículas Extracelulares

As Vesículas Extracelulares (EVs) participam da comunicação celular que não implica na aderência ou contato entre células. As células liberam para o meio extracelular diversos tipos de EVs de origem endossomal ou produzidas na membrana, tanto de forma fisiológica quanto por ativação celular ou apoptose (Zwaal e Schroit, 1997; Hristov et al., 2004).

É um processo que parece ter sido preservado ao longo da evolução (Colombo et al., 2014).

As EVs são classificadas em três subclasses, com base em sua origem ou tamanho (Koojimans et al., 2012; Gould e Raposo, 2013; Raposo e Stoorvogel, 2013; Colombo et al., 2014). Os exossomos (30-100 nm), as microvesículas (MVs) (100-1000 nm) e corpos apoptóticos (1000-5000 nm), que representam os maiores EVs e são liberadas como bolhas em células com morte programada (Figura 10) (Raposo, 2013). Alguns autores sugerem nomes específicos como os próstasomos, que são EVs de 40-500 nm originadas na próstata (Mizutani et al., 2014), e oncosossomos quando são secretadas por tumores (Minciacchi et al., 2015).

As EVs circulam por muitos fluídos corporais como sangue, sêmen, leite, fluídos pulmonares, urina, dentre outros (Arraud et al., 2014; Choi, 2015; Kaminska et al., 2016; Nomura, 2017; Kuo et al., 2017; Panteleev et al., 2017; Barreiro e Holthofer, 2017; Merchant et al., 2017).

Devido à semelhança da composição destas vesículas com as células parentais, as EVs circulantes são alvos de interesse considerável como fonte de biomarcadores (Momen-Heravi et al., 2012; Gardiner et al., 2016; Xu et al., 2016; Menck et al., 2017; Kang et al., 2017).

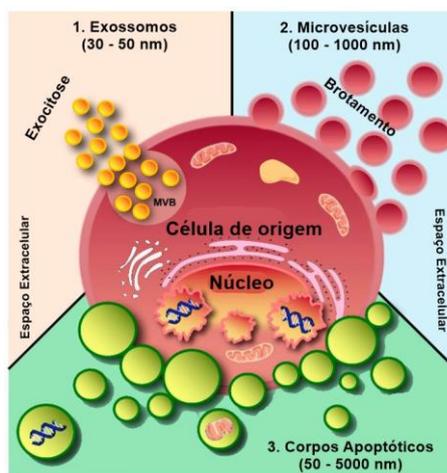


Figura 10. Representação esquemática de subtipos de EVs liberadas por uma célula: exossomos (1), microvesículas (2) e os corpos apoptóticos (3). Fonte: Kalra et al., 2016. Modificado por Valéria Oliveira Silva.

1.2.1. Nomenclatura

Os membros da Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV, do inglês *International Society of Extracellular Vesicles*) organizaram a primeira reunião anual em 2012, em Gotemburgo na Suécia. Dentre diversos tópicos abordados, entraram em um consenso quanto à nomenclatura de EVs, devido às muitas designações usadas. O termo "vesículas extracelulares" foi definido como um termo geral para descrever todos os tipos de vesículas liberadas por diferentes tipos de células sob diferentes condições (Araldi et al., 2012).

1.2.2. Biogênese e classificação das EVs

1.2.2.1. Exossomos

Exossomos são vesículas menores e as mais estudadas. São observadas após fixação, adesão, coloração negativa e visualização pela microscopia eletrônica de transmissão (MET) (Van der pol et al., 2012). São compostos de proteínas bioativas, mRNA, miRNA e outras pequenas espécies de RNA não codificantes. O diâmetro dos exossomos é de 30-100 nm, a densidade varia entre 1,13 e 1,19 g/mL e são geralmente isolados por ultracentrifugação (Théry et al., 2006). Bioquimicamente, sua membrana é formada de fosfolípidios contendo altos níveis de colesterol, esfingomielina e ceramida (Wubbolts et al., 2003; Simons e Raposo, 2009; Théry et al., 2009; Mathivanan et al., 2010). Na sua membrana incluem-se as tetraspaninas (TETs), incluindo CD9, CD63, CD81 e CD82 (CD, do inglês *cluster differentiation*), que desempenham um papel na classificação dos exossomos (Buschow et al., 2009; Cocucci et al., 2009; Simons e Raposo, 2009; Théry et al., 2009; Beyer e Pisetsky, 2010; Mathivanan et al., 2010; Chaput e Théry, 2011; Record et al., 2011; Bobrie et al., 2012). É importante ressaltar que nenhuma dessas propriedades são únicas de exossomos (Van der pol et al., 2012).

Os exossomos não se originam da membrana plasmática, mas são derivados do brotamento interno de vesículas no lúmen dos endossomos. São gerados pela invaginação das membranas dos endossomos celular, formando vesículas intraluminais dentro de corpos multivesiculares (MVB, do inglês *multivesicular bodies*). A liberação dos exossomos ocorre pela fusão da membrana de corpos multivesiculares com a MP com posterior exocitose das vesículas intraluminais (Harding, Heuser e Stahl, 1983; Pan e Johnstone, 1983). A biogênese de exossomos é ilustrada na Figura 11.

Os MVBs se originam a partir de brotamentos formados pelo endossomos tardios, que contêm vesículas intraluminais (ILVs) acumuladas em seu interior. Quando formados, os MVBs podem seguir diferentes rotas: 1) fundem-se com os lisossomos, na degradação de proteínas e lipídios das vesículas; 2) servem como sítios de armazenamento; ou 3) fundem-se com a MP liberando as ILVs no meio extracelular, e então liberar os exossomos (Stoorvogel et al., 2002; Keller et al., 2006; Colombo et al., 2014). A liberação de exossomos pode ser também induzida em condições de estresse (Yu et al., 2006).

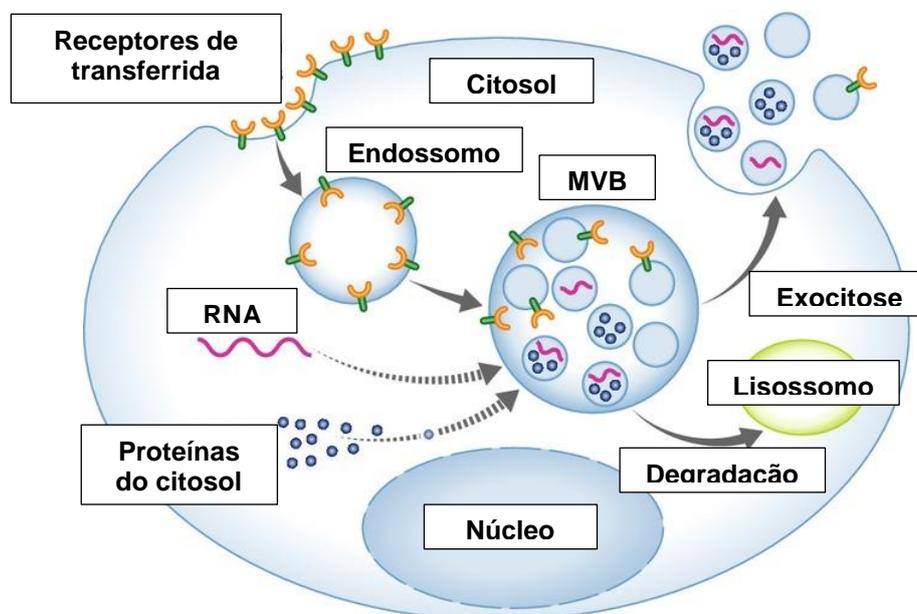


Figura 11. Biogênese de exossomos, modificado por Valéria Oliveira Silva. Fonte: Schorey et al., 2015.

1.2.2.2. Microvesículas

As microvesículas (MVs) variam em tamanho de 100 a 1.000 nm e são produzidas por brotamento externo da MP (Thery et al., 2009). A fosfatidilserina é um marcador frequentemente utilizado em ensaios laboratoriais por ser eficiente na indicação de MVs (Thery et al., 2009; Beyer e Pisetsky, 2010).

As MVs, assim como os exossomos são capazes de encapsular e transferir proteínas, RNA e miRNAs. Elas agem como mensageiros entre as células. O aumento da produção de MVs por células humanas foi observado em uma variedade de condições, incluindo doença cardiovascular, artrite, talassemia, e células tumorais. O desenvolvimento de um câncer, por exemplo, interfere na regulação das MVs das células, levando a uma liberação mais exacerbada do que os exossomos (D'Souza-Schorey e Clancy, 2012).

As MVs não são geradas na via endocítica, mas por um processo que ocorre na MP. Brotamento da vesícula, seguido de fissão da membrana, com a consequente liberação da estrutura no meio extracelular (Coccuci et al., 2009).

Estudos em células de mamíferos indicam que durante o processo de brotamento e liberação de MVs acontece um aumento da concentração de Ca^{2+} citoplasmático e a perda da assimetria de fosfolípidios da MP (Bucki et al., 1998; Crawford et al., 2011). A taxa de liberação de MVs aumenta após estimulação e os íons Ca^{2+} . Assim, esta estimulação tem sido utilizada como indutora no processo de obtenção das MVs (Cocucci et al., 2009).

Independentemente do tipo de estímulo aplicado às células, a geração de MVs ocorre a partir de um pequeno intervalo de tempo, e não de forma concomitante ao estímulo. Este tempo de liberação pode ser estimado entre umas poucas dezenas de segundos até 1-2 minutos (Savina et al., 2003).

1.2.2.3. A composição das EVs

As EVs possuem no seu interior proteínas, DNA, RNA, peptídeos, derivados lipídicos, envolvidos por uma membrana de bicamada lipídica, que serve como veículo de transporte (Kalra et al., 2016). O conteúdo de proteínas e ácidos nucleicos das EVs foi explorado nos últimos anos e várias vesículas foram candidatas como biomarcadores (ou popularmente associado a uma biópsia não-invasiva) para uma variedade de doenças (El Andaloussi et al., 2013; Fais et al., 2016). No entanto, devido à falta de propriedades físicas exclusivas ou de marcadores moleculares únicos de cada tipo de EVs, a classificação baseada de acordo com o seu conteúdo ainda é questionada (Van der pol et al., 2012).

As EVs contêm uma bicamada lipídica na qual são expostas proteínas e receptores. Um deles é um componente fosfolipídico, a fosfatidilserina (PS, do inglês *Phosphatidylserine*), presente no folheto interno das membranas celulares e na superfície de EVs. É um marcador de presença das vesículas de células tumorais, e, conseqüentemente, um biomarcador para câncer (Laulagnier et al., 2004; Lea et al., 2017; Sharma et al., 2017).

As EVs são altamente enriquecidas em tetraspaninas (TET), uma superfamília de proteínas transmembranas que possuem 4 domínios conservados: 2 intracelulares e 2 extracelulares (HemLer, 2005). As duas últimas são enriquecidas com glicolipídios, ligadas a internalização. Esta característica explica sua importância nas EVs, especialmente nos exossomos (Andreu e Yanez-Mo, 2014). As TET envolvidas no transporte vesículas e as mais conhecidas como marcadores de EVs de células humanas são as: CD9, CD37, CD63, CD81, CD82 e CD151 (Rana e Zoller, 2012).

O conteúdo luminal das EVs também inclui a presença de RNA, miRNA e mRNA (que pode ser traduzido em proteínas *in vitro*) (Valadi et al., 2007). Além de RNA, as EVs possuem DNA de cadeia simples (ssDNA),

sequências de oncogenes amplificadas, elementos transponíveis e DNA mitocondrial (Guescini et al., 2010 apud Kalra et al. 2016).

O conteúdo luminal dos exossomos contém predominantemente proteínas citosólicas derivadas da célula doadora (Théry e Ostrowski, 2009). No entanto, curiosamente, a composição da bicamada lipídica em exossomos difere da composição lipídica do MP da célula de origem (Kalra et al, 2016).

O desenvolvimento de compêndios da comunidade que pesquisam as EVs, como Exocarta (disponível online: <http://www.exocarta.org>) e Vesiclepedia (disponível online: <http://www.microvesicles.org>) dispõem de plataformas de compartilhamento de anotações e bases de dados com curadoria manual da lista de proteínas, RNA e lipídios identificados em EVs (Mathinavan e Simpson et al, 2009; Kalra et al., 2012; Kalra et al., 2016; Mathinavan et al., 2012). Isso permite que pesquisadores depositem constituintes das EVs, fornecendo uma visão geral da composição molecular das vesículas.

1.3. EVs e os parasitas

Durante as infecções parasitárias, tanto o parasita como as células hospedeiras liberam as três subclasses EVs, que podem ser formadas pela via endocítica ou diretamente da MP.

Já foram descritas EVs em *Leishmania* spp (Silverman e Reiner, 2011; Schnitzer et al., 2010; Cronemberger-Andrade et al., 2013), *Trypanosoma cruzi* (Gonçalves et al., 1991; Troccoli Torrecilhas et al., 2009; Bayer-Santos et al., 2013;), *Trypanosoma brucei* (Eliaz et al., 2017), *Plasmodium* spp (Campos et al., 2015; Mantel et al., 2014) e *Trichomonas vaginalis* (Twu et al., 2013) e helmintos (Hoy et al., 2014; Coakley et al., 2017).

As EVs liberadas por esses parasitas, como destacado anteriormente, contêm uma grande variedade de moléculas, incluindo proteínas, lipídios e miRNAs e potenciais ferramentas para diagnósticos e

terapêutica. Desempenham diferentes funções nos parasitas, como comunicação célula a célula, interação parasita-hospedeiro, modulação do sistema imune do hospedeiro e resposta inflamatória, fatores de virulência (Schorey e Bhatnagar, 2008; Twu e Johnson, 2014; Marcilla et al. 2014). EVs de *T. cruzi* induziram a patologia cardíaca grave, com reação inflamatória intensa e observação de amastigotas no coração (Trocoli-Torrecilhas et al., 2009).

Em estudo anteriores, foi demonstrado que exossomos excretados por nematoides descobriu suprimiram resposta inata em camundongos, identificando as partículas como uma ferramenta imunomoduladora usada pelos parasitas. Ao mesmo tempo, os exossomos carregam miRNAs para silenciar genes específicos (Buck et al., 2014).

O efeito e a importância dos EVs de *T. gondii* na infecção e subsequente resposta imune não estão totalmente estabelecidos. Estudos recentes demonstraram que exossomos excretados por células hospedeiras infectadas com *T. gondii* têm a capacidade de agir como uma vacina efetiva e de propriedades adjuvantes. Em adição, a infecção por *T. gondii* altera os mecanismos de proliferação celular das células infectadas e os exossomos secretados pelas células infectadas por *T. gondii* podem mediar essas alterações nas células vizinhas (Aline et al., 2004; Beauvillain et al., 2007; Pope et al., 2013; Kim et al., 2016). Recentemente, Li et al. (2018) mostraram que os exossomos de *T. gondii* podem modular a resposta imune do hospedeiro e Wowk et al. (2017) demonstraram o primeiro perfil proteômico de exossomos de *T. gondii*, contendo uma ampla gama de proteínas.

1.4. Métodos de isolamento e caracterização das EVs

Os projetos de pesquisa que tem como objetivo estudos das EVs iniciam-se com os processos de isolamento. Normalmente esses projetos são divididos em 3 categorias: Pesquisa para identificação e caracterização

de EVs; Diagnóstico de patologias utilizando EVs como marcadores; e administração de EVs em pacientes (Witwer et al., 2013).

As EVs já foram purificadas de diferentes fluídos biológicos e empregando diferentes técnicas de isolamento. Sangue, humor aquoso, derrames pleurais, leite materno, saliva, sêmen, secreções nasais, lavagem bronco alveolar, urina, líquido amniótico, bile, líquido cefalorraquidiano, culturas de células, bactérias, parasitas são alguns exemplos (Mathinavan e Simpson, 2009; Witwer et al., 2013).

Muitos estudos extraem EVs de células cultivadas *in vitro*. Normalmente os ensaios são preparados para as células secretarem as EVs durante 24-48 horas. Tempos mais curtos de incubação já foram descritos, principalmente quando foram utilizados estímulos, como por exemplo, o tratamento do meio de cultura com ionóforo de cálcio por 5-60 minutos (Hess et al., 1999). A utilização de Soro Fetal Bovino (SFB) em alguns tipos de cultura celular interfere na caracterização das EVs das células, e devem passar por processos de exclusão das vesículas do SFB (Théry et al.; 2006).

Quaisquer que sejam as condições da cultura é importante quantificar a porcentagem de células mortas presentes na cultura no final do tempo de incubação. As células mortas liberam vesículas de vários tamanhos e, eventualmente, esses fragmentos ficam submersos no meio de cultura e podem ser isoladas como vesículas menores após ultracentrifugação ou filtração (Théry et al., 2006).

1.4.1. Isolamento

Os métodos de isolamento das EVs incluem ultracentrifugação (UC), filtração por coluna de exclusão de tamanho (SEC - do inglês "*Size Exclusion Chromatography*"), isolamento por imunoafinidade, e técnicas micro fluídicas (Lane et al., 2017).

A centrifugação diferencial acompanhada da ultracentrifugação (UC) é considerada a forma clássica de isolamento de EVs (Lozano-Ramos et al.,

2015). Porém, contaminações, como por exemplo, vírus podem influenciar nos resultados (Webber e Clayton, 2013).

Para purificar EVs utilizando a SEC é necessário primeiramente eliminar as células, plaquetas ou grandes corpos apoptóticos por uma ou mais etapas de centrifugação de baixa velocidade ou utilizar filtros de até 800 nm (Benedikter et al., 2017; Corso et al., 2017).

1.4.2. Caracterização

Várias técnicas permitem a detecção e caracterização de EVs. São elas: análise de rastreamento de nanopartículas (NTA), sensor de pulso resistivo ajustável (tRPS) e citometria de fluxo de alta resolução (HFC) (Maas et al., 2014).

A mais usual é a análise por NTA, que é usada para contar e dimensionar partículas na escala de nanômetros de diâmetro. O NanoSight é um instrumento óptico com um microscópio de luz acoplado a uma câmera DCC-Dispositivo de carga acoplada. Ele é baseado em um laser que detecta o movimento browniano, que é o movimento aleatório de partículas microscópicas imersas em fluido de partículas individuais imersas em alguma solução (Filipe et al., 2010; Gardiner et al., 2013; Maas et al., 2015).

A desvantagem desta metodologia é que quando se usa o NTA no modo de dispersão de luz, podem ser encontrados grandes agregados de proteína que não serão distinguidos das EVs pelo movimento browniano e, portanto, mesmo após a purificação parcial, as concentrações de partículas calculadas por esta técnica incluem uma mistura de EVs e estruturas não vesiculares (Witwer et al., 2013).

1.5. Eletroforese vertical de proteínas e *Immunoblotting*

As amostras podem ser tratadas com soluções tamponadas contendo reagentes de lise, desnaturantes e inibidores de protease (Mathinavan e Simpson et al., 2009; Lobb et al., 2015). As proteínas, então, são separadas por SDS-PAGE.

O *immunoblotting* é empregado para demonstrar a presença de proteínas contidas no interior das EVs (Kowal et al., 2016). Algumas TETs podem ser usadas como marcadores como CD9, CD63, CD81 e CD82. Também se utilizam moléculas de MHC (Complexo Histocompatibilidade, como indicador de células hospedeiras) que codificam glicoproteínas de superfície celular (Andreu e Yáñez-Mó, 2014) e proteínas citosólicas tais como certas proteínas de estresse, Tsg101 (Gene de susceptibilidade tumoral 101, que funciona na biogênese do MVB (Katzmann et al., 2001). A proteína Alix, proteína essencial na classificação dos conteúdos de vesículas ou proteínas do citoesqueleto (actina, tubulina), e a Flotilina, que é um gene da membrana celular interna e utilizado na identificação de exossomos, pois codifica proteínas do tráfico vesicular e transdução de sinal (Yoshioka et al., 2013)

Esta metodologia por si só não pode identificar se as proteínas detectadas são de EVs. A presença de um marcador de EV não significa que os contaminantes estejam ausentes. No entanto, o *Immunoblotting* é uma ferramenta útil para detectar proteínas presentes em preparações de EVs purificadas (Witwer et al., 2013).

1.6. Microscopia Eletrônica

As técnicas de microscopia eletrônica (ME) estão bem estabelecidas e provaram ser muito úteis na pesquisa de EVs, fornecendo evidências diretas para a presença de estruturas vesiculares, já que partículas menores

de 300 nm não são visualizadas em microscópio óptico (Van Der Pol et al., 2010; Linares et al., 2017). Existem duas técnicas de ME para visualização das EVs: ME de transmissão (MET) (Figura 12) e ME de varredura (MEV).

Na MET, considerada uma ferramenta padrão em estudo com EVs, o uso de metais pesados, como o tetróxido de ósmio e o acetato de uranila na microscopia eletrônica de transmissão permite o reconhecimento de vesículas por contraste, reforçado pela incorporação em metilcelulose (Linares et al., 2017).

Na maioria dos casos, as suspensões de EVs concentradas são colocadas em grades e fixadas, por exemplo com paraformaldeído. Os resultados da MET indicam a aparência em forma de copo (*cup-shape*) de 20-100 nanômetros de diâmetro dos exossomos (György et al., 2011).

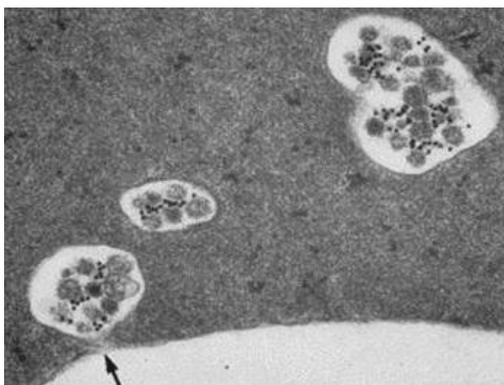


Figura 12. Micrografia eletrônica de transmissão de exossomos derivados de reticulócitos, marcados com um anticorpo monoclonal contra o receptor da transferrina. Fonte: Johnstone, 1987 apud Akers et al., 2013

A MEV é uma abordagem alternativa que surgiu recentemente. Estes métodos fornecem apenas informações semi-quantitativas sobre as EVs. O tamanho das EVs não pode ser determinado de forma segura devido à polidispersidade (Wu et al., 2015; Jung e Mun, 2018). Além disso, os procedimentos de desidratação e vácuo da amostra necessários na ME podem afetar suas características. O tempo de medição é na ordem de horas (Momen-Heravi et al., 2012).

1.7. Justificativa

A toxoplasmose torna-se uma doença de importância em Saúde Pública quando a infecção primária ocorre em gestantes e em pacientes com deficiências do sistema imune por causas naturais, pela Aids e por transplantes. Portanto o diagnóstico é de extrema importância para diferenciar indivíduos assintomaticamente infectados daqueles que desenvolvem as formas graves da infecção.

Estudos prévios de nosso grupo demonstraram que taquizoítos penetram na célula hospedeira com auxílio da liberação antígenos secretados/excretados (ESA). Portanto, as ESAs têm papel primordial para a sobrevivência dos parasitas. Por outro lado, hospedeiros infectados desencadeiam resposta imune celular e humoral contra as ESAs. Estes anticorpos já se mostraram eficientes para diferenciar a infecção assintomática da sintomática em pacientes com Aids (Meira et al., 2008; Meira et al., 2011; Meira et al., 2014).

Nas últimas décadas diferentes estudos têm evidenciado a importância das pequenas estruturas secretadas pelas células procarióticas e eucarióticas, as EVs, que podem ser encontradas em diferentes fluídos, inclusive em meio de cultura de células *in vitro*, como as ESAs. Elas têm funções especializadas que participam na comunicação entre as células, na transferência de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Participam da coagulação, sinalização intercelular, gestão de resíduos, e manipulam o sistema imune dos hospedeiros. As EVs, ainda, podem transportar bi marcadores de doenças, macromoléculas biorreativas contribuindo para a patogênese das doenças (Keller et al., 2006).

A importância de estudar vesículas extracelulares é a descoberta de novos mediadores de comunicação celular, envolvidas na transmissão de sinais entre parasita em questão e o hospedeiro, podendo regular processos biológicos. Além disso, os papéis fisiopatológicos das vesículas extracelulares são reconhecidos em doenças como câncer e distúrbios

neurodegenerativos, destacando potenciais novos alvos para intervenção terapêutica também em doenças infecciosas (Andaloussi et al., 2013). A idéia desse trabalho surgiu da necessidade de inovação em pesquisas envolvendo os mecanismos de ação do *Toxoplasma gondii* através das EVs, nunca antes descritas, e incentivada por outros grupos parceiros que também estudam o mecanismo de ação das EVs isoladas de outros protozoários.

Evidências indicam que as ESAs possam ser carregadas pelas EVs. Os resultados da proteômica de exossomos de *T. gondii* evidenciou diferentes proteínas que fazem parte do complexo ESA (Wowk et al., 2017).

Os dados abordados nesta introdução revelam que apesar dos avanços em diferentes segmentos das EVs em parasitas, algumas questões ainda não estão totalmente esclarecidas. Assim, justifica-se a procura de metodologias que possam isolar e caracterizar as EVs produzidas por *T. gondii*. Tais investigações poderão auxiliar estudos futuros para avaliar a presença das EVs de *T. gondii* no soro de pacientes infectados, dentre outros.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Isolar e caracterizar vesículas extracelulares produzidas e excretadas por taquizoítos da cepa RH de *T. gondii*.

2.2. Objetivos específicos

- a. Estabelecer um protocolo de recuperação de vesículas extracelulares de taquizoítos coletados do sobrenadante de culturas celulares infectadas por taquizoítos da cepa RH de *T. gondii*;
- b. Investigar o tamanho e concentração das vesículas extracelulares isoladas pelas análises de varredura de partículas;
- c. Identificar a morfologia e a liberação de vesículas extracelulares por microscopia eletrônica de transmissão e de varredura;
- d. Determinar a presença de miRNA em vesículas extracelulares;
- e. Avaliar o perfil proteico das vesículas extracelulares isoladas dos taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* e verificar por teste sorológico se são reconhecidas pelo sistema imune hospedeiro.

3. Material e Métodos

3.1. Considerações éticas

Este trabalho foi aprovado no Comitê de Ética Humana do Instituto Adolfo Lutz e foi realizado conforme recomendações do CONEP-IAL/SES sob número 1845705 de título “Purificação e expressão de exossomos de *Toxoplasma gondii* e a correlação com a toxoplasmose humana” (ANEXO 1).

3.2. Delineamento Experimental

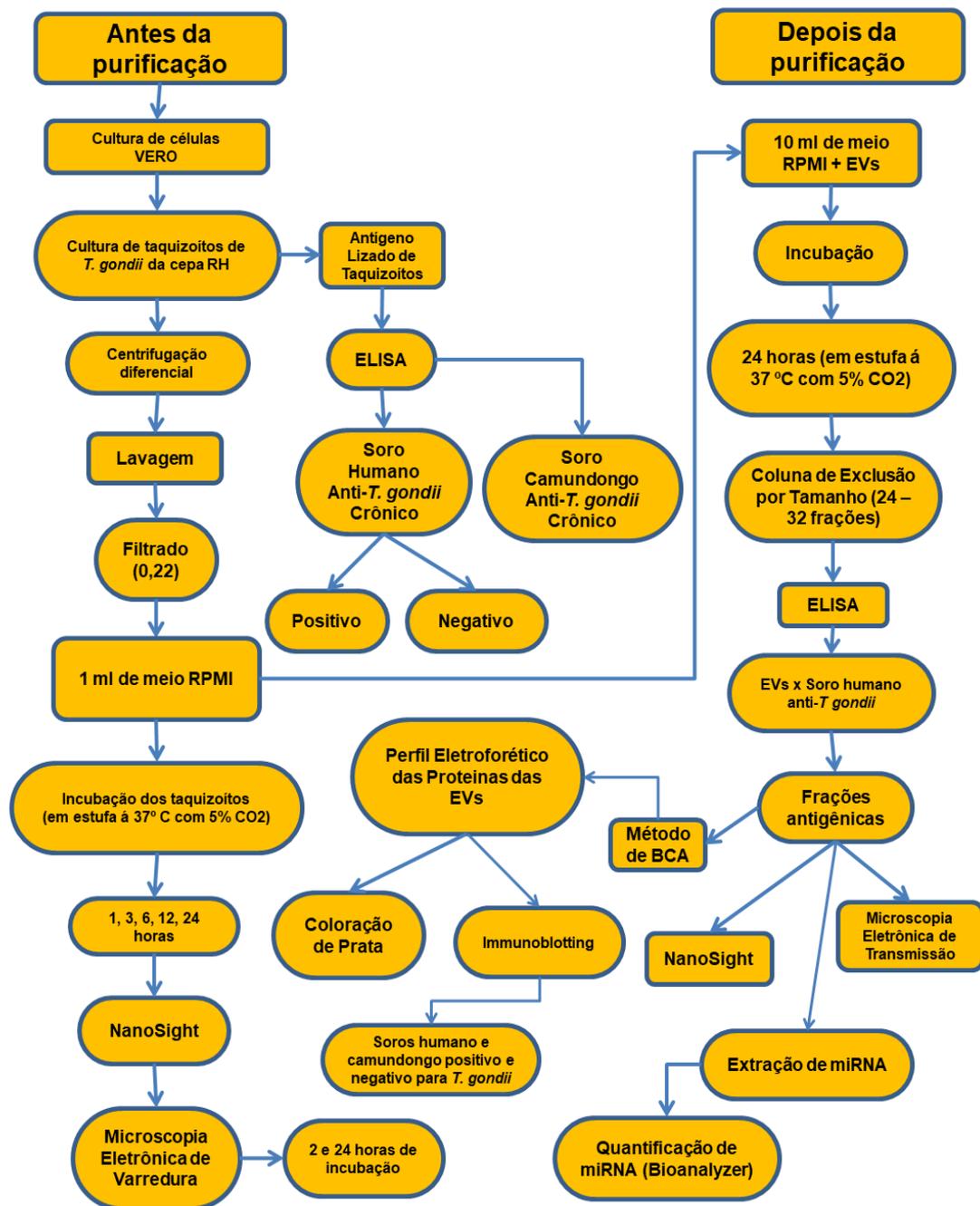


Figura 13. Delineamento dos experimentos realizados na dissertação.

3.3. Culturas celulares

3.3.1. Cultura de células VERO

Culturas de células da linhagem VERO ATCC CCL - 81 (células de rim-de-macaco-verde-africano *Cercopithecus aethiops*) foram gentilmente cedidas pela Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz. Foram mantidas a 37° C, 5% de CO₂, em garrafas de 25 cm² (Kasvi) com 5 mL de meio 199 (Gibco) contendo 10% de Soro Fetal Bovino inativado (SFB) (Vitrocell) e 5 mg/ mL de gentamicina. Após a formação da monocamada celular (72 horas), as garrafas foram lavadas com tripsina para descolamento das células. Passagens foram realizadas para novas garrafas, com a finalidade de expandir as culturas celulares.

3.3.2. Manutenção *in vitro* da cepa RH de *T. gondii*

A cepa RH de *T. gondii* (Sabin e Feldman, 1948; Dubey, 1993; Howe e Sibley, 1995) foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical da USP. Os parasitas foram mantidos nas condições descritas previamente (Suresh et al., 1991). Além da obtenção dos parasitas para secreção das EVs, taquizoítos foram utilizados para a produção do antígeno lisado de taquizoítos (ALT). Este antígeno foi utilizado na reação imuno-enzimática (ELISA) para definir o diagnóstico sorológico dos soros e como controle positivo nos experimentos de triagem das EVs.

3.4. Antígeno lisado de taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* (ALT)

A preparação do ATL foi realizada como previamente descrito (Costa-Silva et al, 2008; Meira et al, 2008, com modificações). Cerca de 1 x

10⁹ de taquizoítos/mL provenientes de culturas de células VERO (3 - 4 dias após a infecção) foram centrifugados por 15 minutos a 1800 g. Após o descarte do sobrenadante e os taquizoítos foram lavados com 40 mL de PBS 0.01 M, pH 7.2 por 15 minutos a 1800 g. A seguir, os parasitas foram lisados utilizando o desruptor (TissueLyser LT) por 8 ciclos (1,0 A/min) por 4 minutos com intervalos de 2 minutos. Foram rompidos por ultrassom (Sonic Dismembrator) por 5 minutos. Após a certificação da lise dos parasitas por microscopia óptica, o antígeno lisado foi dissolvido em NaCl 0.3 M e as concentrações protéicas foram determinadas por método de Ácido Bicinconínico (BCA) (Thermo Scientific) e ajustado na concentração de 1.0 µg/ mL. O antígeno foi aliquotado e estocado a -70° C.

3.5. Soros utilizados nos ensaios

A triagem das frações contendo EVs, após a cromatografia foi realizada por ELISA, utilizando um “pool” de 5 soros de indivíduos com toxoplasmose crônica. Para verificar a especificidade da metodologia, na mesma reação, as frações foram incubadas com um “pool” de 5 soros de indivíduos sem toxoplasmose. Esses soros foram previamente testados por ELISA e PCR, conforme descrito (Colombo et al., 2005). Os soros humanos foram provenientes do banco de soros do Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz. Os soros de camundongos infectados com as cepas cistogênicas ME-49 e VEG de *T. gondii* foram cedidos gentilmente pela Dra. Thais Alves da Costa Silva.

3.6. Obtenção das EVs

Para separar os taquizoítos de *T. gondii* das células hospedeiras e garantir a purificação de EVs apenas dos parasitas e não das células VERO realizamos centrifugações diferenciais e 5 séries de lavagem com PBS.

Culturas de células VERO foram infectadas com 1×10^6 taquizoítos da cepa RH de *T. gondii*. Após 3 dias de infecção, os parasitas foram separados das células rompidas por centrifugação de 300 g por 15 minutos. O sobrenadante contendo os parasitas foi separado do sedimento de células e centrifugado a 3000 g por 15 minutos, para concentrá-los. Após, os parasitas foram lavados por 5 vezes com PBS estéril (3000 x g por 15 minutos), filtrado (em membrana de 0,22 μm) (Millipore) e uma alíquota foi separada para a quantificar os parasitas em câmara de Neubauer. Os parasitas, então, foram incubados em 1 mL de meio RPMI sem SFB por 24 horas a 37° C em estufa de CO₂. Após esse período, o sobrenadante contendo as EVs foi separado dos parasitas por centrifugação (3000 g por 5 minutos), filtrado (0,22 μm) e congelado -20° C.

3.6.1. Isolamento das EVs

Para cada procedimento foram utilizadas EVs secretadas de 1×10^9 taquizoítos. Os filtrados foram concentrados para 2 mL em *speedvac* (Genevac) por cerca de 1 hora á 35° C, em 2 mL. As purificações dos sobrenadantes contendo EVs foram realizadas por cromatografia de exclusão em gel, como previamente descrito (Trocoli Torrecilhas et al., 2009; Nogueira et al., 2015) e com modificações. O conteúdo liofilizado foi ressuspenso em 2 mL de tampão Acetato de Amônio 100 mM, pH 6,5 e injetado numa coluna Sepharose CL-4B (1 x 40 cm, GE Healthcare) pré-equilibrada com 100 mM de acetato de amônio, pH 6.5. As frações foram eluídas com o mesmo tampão a um fluxo de 0,2 mL/min, com auxílio de uma

bomba peristáltica (Pharmacia). Foram coletados cerca de 24 a 32 tubos contendo 1 mL de cada fração.

3.6.2. Triagem das frações contendo EVs de *T. gondii* por ELISA

As frações contendo EVs foram selecionadas por ELISA usando como anticorpo um “pool” de 5 soros humanos reagentes para toxoplasmose. Na mesma reação, um “pool” de 5 soros humanos não reagentes para toxoplasmose foi incluído com o intuito de verificar se os anticorpos anti-*T. gondii* eram específicos para as EVs.

Cada fração (50 µl) foi incubada (18 h a 4° C) em orifícios de uma placa de poliestireno com 96 orifícios *medium-binding* (Jet Biofil). Após 5 lavagens com PBS (com Tween 20 a 0,05%), as placas foram bloqueadas, por 1 hora, com 5% de leite desnatado-PBS (200 µl/orifício). A seguir, 50 µL de soros humanos (diluídos 1:50 em 5% de leite desnatado/PBS) foram incubados por 60 min a 37° C. Após cinco lavagens com PBS-Tween 20, os poços foram incubados por mais 60 min. a 37°C com IgG de cabra anti-IgG humana conjugada com peroxidase (Sigma Aldrich) (50 µL) diluída a 1:20000 em 5% de leite desnatado-PBS. Após um novo ciclo de 5 lavagens com PBS-Tween 20, a revelação ocorreu com adição de 100 µl/orifício do substrato enzimático (ácido cítrico 0,1 M, Na₂HPO₄ 0,1 M pH 4.5, 0,05% *o*-fenilenodiamina, 0,1% H₂O₂). O desenvolvimento da cor foi interrompido pela adição de 100 µL de 4N H₂SO₄, após a incubação da placa em câmara escura, por 15 minutos a 37° C. A absorbância, foi medida com um leitor de ELISA (Multiskan) com um filtro de 492 nm. Em cada placa foi incluído dois controles (em duplicata). O positivo, que foi constituído de 50 µl de ALT (na concentração de 1 µg/mL) e o branco, sem antígeno. As frações que apresentaram densidade óptica (D.O.) maior que 0.7 foram agrupadas e concentradas por *speedvac* (velocidade média por 30 minutos à 35° C).

3.6.3. Dosagem das proteínas de EVs

As EVs liofilizadas por *speedvac* foram ressuspensas em 1 mL de PBS estéril e filtradas (0,22 μm) para quantificar as proteínas, seguindo o protocolo do kit comercial para ensaio proteico BCA (Thermo Scientific). Para a construção da curva padrão foi utilizada a albumina sérica bovina (BSA) em concentrações que variaram de 50-2000 $\mu\text{g/mL}$. As amostras e os padrões foram diluídos (1:8) em uma placa de poliestireno no reagente do kit. A seguir, a placa foi incubada por 30 minutos a 37° C. As leituras em D.O. foram realizadas em espectrofotômetro (Multiskan), no comprimento de onda 562 nm. Os resultados foram plotados para comparação com uma curva padrão. Os valores de concentração foram gerados a partir dessa curva, usando a Equação polinomial de 3° grau, com $r^2 > 0.98$ para ensaio, como descritas por Webber e Clayton (2013).

3.7. Caracterização das EVs por NanoSight: concentração e diâmetro

A concentração (partículas/mL) e o diâmetro (nm) das partículas (EVs) foram determinadas por “*Nanoparticle Tracking Analysis*” (NTA) usando o NanoSight NS3000 (Malvern) do Laboratório de Imunologia Clínica e Experimental da Disciplina de Nefrologia da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal do Estado de São Paulo, e como descrito anteriormente (Nogueira et al., 2015). O NanoSight calcula o tamanho e o número de partículas com base no movimento browniano. As medições foram realizadas em 2 experimentos (antes e após a purificação das EVs por cromatografia). O primeiro experimento foi realizado para determinar o tempo ideal de incubação dos taquizoítos em meio de cultura para liberar as EVs. Taquizoítos (1×10^6) foram incubados em meio RPMI (1 mL), a 37° C, 5% de CO₂ durante 1, 3, 6, 12, 20 e 24 horas. Após a incubação, os parasitas foram separados dos sobrenadantes, que continham as EVs. Cada período analisado foi realizado em triplicata.

No segundo experimento, as análises foram realizadas nas 32 frações (1 mL) coletadas da coluna Sepharose CL-4B. Em todas as análises, as medidas foram realizadas em um volume de 400 µl, em triplicata. O mesmo volume de meio RPMI (ultra-centrifugado a 45 min para 45.000 g) foi utilizado como controle.

3.8. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

As frações selecionadas por ELISA foram analisadas por TEM para detecção da presença de EVs. Esse experimento foi realizado em colaboração com as pesquisadoras do Núcleo de Microscopia Eletrônica do Centro de Procedimento Interdisciplinares do Instituto Adolfo Lutz, M.s. Gislene Mitsue Namiyama e Prof. Dra. Noemi Nosomi Taniwaki. Um volume de 3 µL da suspensão contendo as frações com as EVs foi fixado com 100 µL de paraformaldeído 2% por 1 hora e grades de cobre de 300 malhas revestidas com carbono foram tratadas com 30 µl de solução de Alcian Blue a 2% e ácido acético 1% durante 10 minutos. Em seguida, as grades foram lavadas com 3 gotas de água destilada estéril. Após a remoção, com papel filtro, as grades foram colocadas em 30 µL de suspensão fixa de EVs por 10 min. A coloração foi realizada transferindo sucessivamente as grades para três gotas de fosfotungstato de potássio a 2%, pH 6,8, secas com papel de filtro e permanecendo pelo menos 24 horas à temperatura ambiente antes da análise por microscopia eletrônica. As grades foram observadas sob um microscópio eletrônico de transmissão JEOL (modelo JEM1011) (JEOL / Massachusetts / USA) operando a 80 kV. As imagens foram gravadas com uma câmera de dispositivo de casal carregado (modelo 785 ES1000W, Gatan, EUA) e o programa Gatan versão 1.6.

3.9. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Esse experimento foi realizado em colaboração com a pesquisadora Prof. Dra. Ana Claudia Trocoli Torrecilhas, do Laboratório de Imunologia Celular e Bioquímica de Fungos e Protozoários da Universidade Federal de São Paulo. As imagens adquiridas pela MEV tiveram como objetivo observar a liberação das EVs pelos taquizoítos (1×10^6), durante 2 e 24 horas de incubação em meio RPMI sem SFB (1 mL) a 37°C. Esse período de tempo foi determinado a partir dos resultados das análises de NTA. Em seguida, os parasitas foram lavados duas vezes em PBS, pH 7.2 e fixados em lamínulas previamente revestidas com poli-L-lisina 0,1% (Sigma) durante 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, os parasitas foram fixados em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, contendo sacarose a 0,146 M e CaCl_2 5 mM durante 1 hora à temperatura ambiente. O preparo da amostra para análise foi feito conforme descrito anteriormente Soares et al., (2005). As imagens foram analisadas e fotografadas utilizando um Microscópio Eletrônico de Varredura (Quanta-FEG) do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de São Paulo.

3.10. Análise de miRNA-do conteúdo das EVs

3.10.1. Extração e dosagem de RNA e miRNA

As extrações de miRNA e RNA das EVs e dos taquizoítos foram realizadas utilizando kit comercial miRneasy mini kit (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. A lise dos taquizoítos (1×10^6) e das EVs (1×10^9) ocorreu com 1 mL de Qiazol. A solução foi transferida para tubos de 1,5 mL (livres de nucleases) e incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. A seguir, o clorofórmio foi adicionado (1:5), homogeneizado sob agitação rápida por 15 segundos e os tubos incubados à temperatura ambiente por 3

minutos. As amostras foram centrifugadas a 14.000 *g* por 12 minutos, com o objetivo de separar o fenol (fase rosada e submersa) da amostra (fase aquosa). Então, as amostras foram transferidas para um novo tubo contendo 1,5 volumes de álcool absoluto (100%) e homogeneizadas. Os conteúdos foram transferidos para colunas *mini spin* acopladas em tubos de 2 mL e centrifugados a 8000 *x g* por 1 minuto. Após o tratamento com reagentes RWT e RPE, seguindo as instruções do fabricante, o miRNA foi eluído em 30 µl de água ultrapura livre de DNase/RNase a 70° C, a seguir as amostras foram acondicionadas a -70° C.

As dosagens de miRNA foram realizadas utilizando o kit Qubit microRNA Assay Kit (Life Technologies), com os reagentes intercalantes de miRNA (1:199) seguindo as orientações do fabricante. Para a dosagem de RNA foi utilizado o kit QuantiFluor RNA (Promega), com os reagentes intercalantes de RNA (1:199) e seguindo as orientações do fabricante. Ambas as leituras foram realizadas no fluorímetro Quantus™ (Promega).

As análises das quantidades de miRNA foram também realizadas por eletroforese micro fluídica (*On-Chip electrophoresis*) no aparelho Bioanalyzer 2100 Agilent (Agilent Technologies) com o chip para “*Small RNA*” (Agilent Technologies). Antes de iniciar o preparo do gel para eletroforese, todos os reagentes foram estabilizados em temperatura ambiente por 30 minutos. A limpeza dos eletrodos foi realizada com cerca de 400 µl de RNaseZAP (Life Technologies), seguido de água DEPC no cartucho de lavagem e o mesmo foi inserido no aparelho por 1 minuto. O cartucho foi retirado e a tampa aberta para secagem dos eletrodos durante a preparação do chip. Decorridos 30 minutos de descongelamento dos reagentes, iniciou-se o preparo do gel. Foram adicionados 40 µl do *Small RNA* gel (Agilent Technologies), previamente filtrado, com 2 µl de *Small RNA* Dye (Agilent Technologies). Após a agitação em vórtex por 10 segundos, o conteúdo foi centrifugado a 13000 *g* por 10 minutos em temperatura ambiente. Após, iniciou-se o preparo do “*Small RNA*” chip, que foi acoplado na “*priming station*” (Agilent Technologies) para confecção e aplicação dos reagentes, segundo as recomendações do fabricante. As amostras de

miRNA foram desnaturadas, assim como o “*ladder*” para pequenos RNAs (Agilent Technologies) a 70 °C por 2 minutos. Adicionou-se 1 µl da amostra no poço destinado e o chip foi colocado no equipamento. Com auxílio do Agilent 2100 Expert Software (Agilent Technologies) obteve-se o resultado em tempo real pela análise do eletroferograma e densitometria dos géis virtuais.

3.11. Análise protéica do conteúdo das EVs

3.11.1. Eletroforese vertical das proteínas

A eletroforese vertical foi realizada em gel de acrilamida, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) como descrita previamente (Laemmli, 1970), em equipamento Mini-Protean II (Bio-Rad, USA). Em todos os ensaios, os géis foram confeccionados com espessuras de 1,5 mm, com gel de separação (Tris-HCl 0,75 M; SDS 0,2%, pH 8,8) na concentração de 10% de acrilamida e gel de empilhamento (Tris-HCl 0,25 M; SDS 0,2%, pH 6,8). As amostras analisadas na concentração de 10 µg/mL foram diluídas em 15 µL de tampão de amostra (SDS 2%; glicerol 10%; 2-mercaptoetanol 5%; Tris-HCl 60 mM, pH 6,8 e azul de bromofenol 0,002%). Posteriormente foram aquecidos por 5 minutos a 100° C e aplicados 20 µL nas canaletas do gel de empilhamento. Em todos os experimentos foram colocados na primeira canaleta do gel 10 µL do padrão de peso molecular para proteínas (170, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15, 10 kDa) (Thermo Scientific). Os eletrodos foram mergulhados no tampão contendo Tris-HCl 0,025 M; glicina 0,192 M; SDS 0,1% e aplicados numa voltagem constante de 200 V. Os géis foram corados pela coloração Prata. Inicialmente, as proteínas foram fixadas no gel com solução contendo 50% de metanol, 0,15% de formaldeído e 12% de ácido acético e em seguida lavado com etanol 35%. Após a imersão em solução de tiosulfato de sódio 0,2%, o gel foi lavado com H₂O ultrapura (2

vezes) e então corado com AgNO_3 0,2%. Para a revelação foi aplicado uma solução contendo carbonato de sódio, 0,1% de formaldeído e 0,14% de tiosulfato de sódio. Para interromper a reação foi utilizada uma solução contendo 50% de metanol e 12% de ácido acético. Todas as etapas ocorreram sob agitação e 5 minutos e sob aquecimento em forno micro-ondas na potência média-máxima por 30 segundos cada.

3.11.2. *Imunoblotting*

Os géis contendo as EVs foram transferidos para membranas de nitrocelulose com poros de 0,45 μm de diâmetro (BioRad) no equipamento Trans-Blot System (BioRad), conforme descrito previamente (Towbin et al.;1979). Após o posicionamento e montagem dos géis, a transferência foi efetuada em voltagem constante de 15 V por 60 minutos em tampão de transferência (Tris-HCl 25 mM; glicina 0,192 M; metanol 20%, pH 8.2). Ao final da transferência, as membranas foram coradas por 0,2% de Ponceau-S [ácido 3-hidroxil-4-(2-sulfo-fenilazo) -2,7-naftalenodisulfônico] (Sigma) em ácido tricloroacético 3% (Merck) por 5 minutos para confirmação da transferência efetiva das proteínas. As membranas foram cortadas em tiras de 3-4 mm e estas incubadas com PBS-leite desnatado 5% por 1 hora, a temperatura ambiente, sob agitação, seguidos de 3 lavagens com PBS (5 minutos).

As seguintes amostras de soros foram testadas: 1. “*Pool*” de soros de camundongos cronicamente infectados com a cepa VEG; 2. “*Pool*” de soros de camundongos cronicamente infectados com a ME-49; 3. Soro humano crônico para toxoplasmose; e 4. Soro humano não reagente para toxoplasmose. Todas amostras foram diluídas em PBS-leite desnatado 5% (1:100) e incubados por 4 horas a temperatura ambiente, sob agitação. Após mais três lavagens com PBS (5 minutos), as membranas foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação com os anticorpos

secundários (Sigma) de IgG de cabra anti-IgG humana conjugada a peroxidase (1:8000) e IgG de cabra anti-IgG murina conjugada a peroxidase (1:8000) em PBS-leite desnatado 5%, seguindo-se, então, um novo ciclo de lavagens. A revelação das bandas foi efetuada cobrindo-se as membranas com substrato comercial *Pierce ECL* para *immunoblotting* (Thermo Scientific) e registradas em gel documentador com filtro para quimiluminescência UVITEC (Cleaver Scientific).

3.12. Análise de dados

Os resultados gerados no NanoSight foram realizados em triplicata. Os resultados das concentrações das EVs em diferentes períodos de incubação foram calculados descontando os valores de controle (meio RPMI) e expressam as médias aritméticas \pm EPM (erro padrão da média). A comparação entre os resultados gerados no NanoSight (diferentes períodos) foi determinada por Tukey ANOVA com base em um valor crítico de $p \leq 0,05$. As análises e gráficos foram realizadas no programa de computador Graph Pad Prism versão 5.0 (San Diego, CA, EUA).

4. RESULTADOS

4.1. Padronizações: tempo de incubação

Os experimentos realizados nesta dissertação foram realizados com objetivo de caracterizar as EVs liberadas por taquizoítos.

No primeiro experimento, 2×10^8 taquizoítos foram incubados por 3 horas em meio RPMI (a 37°C com 5% CO_2) para a liberação das EVs. A seguir 400 μl do sobrenadante contendo as partículas foram analisadas no NanoSight. A Tabela 1 e Figura 14 mostram que 2×10^8 taquizoítos secretaram em média, $1,27 \times 10^8$ partículas de tamanho médio de 180 nm de diâmetro.

Tabela 1. Concentração (partículas/mL) e diâmetro (nm) de EVs liberadas por 2×10^8 taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* em meio RPMI durante 3 horas. A análise foi realizada em triplicata no NanoSight NS3000.

Concentração de	
partículas/mL	Diâmetro (nm)
$1,42 \times 10^8$	189
$1,27 \times 10^8$	138
$0,95 \times 10^8$	196

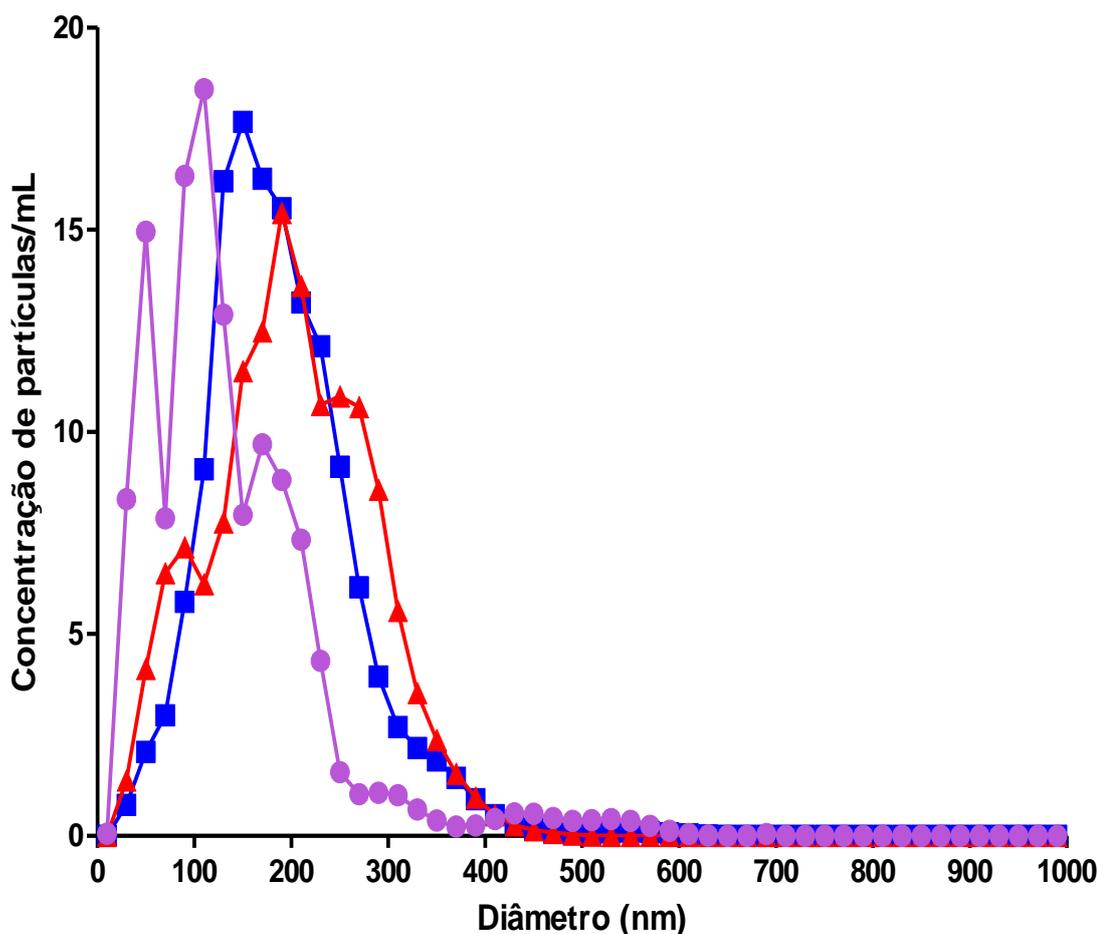


Figura 14. Concentração e tamanho de partículas liberadas por 2×10^8 taquizoítos no sobrenadante, durante 3 horas. As análises foram feitas em triplicata contendo 400 μ l de produto liberado (as réplicas foram representadas por círculos, quadrados e triângulos) no equipamento NanoSight NS3000.

A seguir, as análises foram realizadas com o objetivo de determinar o tempo ideal de incubação. Então, alíquotas de 1×10^6 taquizoítos foram incubados por diferentes períodos de tempo (1, 3, 6, 12, 20 e 24 horas) em 1 mL de meio RPMI (a 37°C com 5% CO₂) para a liberação das EVs. A seguir 400 μ l do sobrenadante contendo as partículas foram analisadas no NanoSight e os resultados foram gerados no equipamento em triplicata.

Como mostra a Figura 15, o tamanho das EVs variou entre 165,2 a 175,3 nm. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada no tamanho das partículas entre os períodos de incubação estudados.

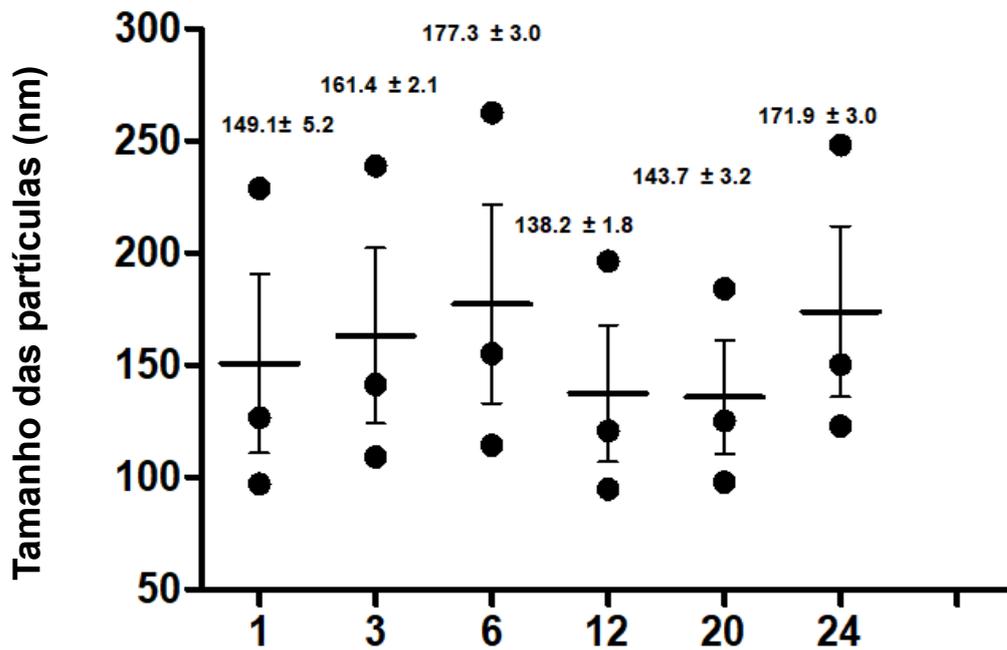


Figura 15. EVs liberadas por 1×10^6 taquizoítos em diferentes períodos de incubação (1, 3, 6, 12, 20 e 24 horas). As análises do tamanho das partículas foram realizadas num volume de 400uL de produto liberado por taquizoítos, em triplicata e no equipamento NS3000. Os valores estão expressos em média aritmética \pm EPM. Não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa no tamanho das partículas nos períodos de incubação observados. (Análise estatística pelo método Tukey ANOVA”).

A Figura 16 mostra as concentrações de partículas liberadas por taquizoítos dos diferentes períodos estudados. Os taquizoítos secretaram $4,37 \pm 0,81 \times 10^8$ EVs/mL por 1 hora. O mesmo número de parasitas liberou $8,49 \pm 0,88 \times 10^8$ EVs/mL em 24 horas.

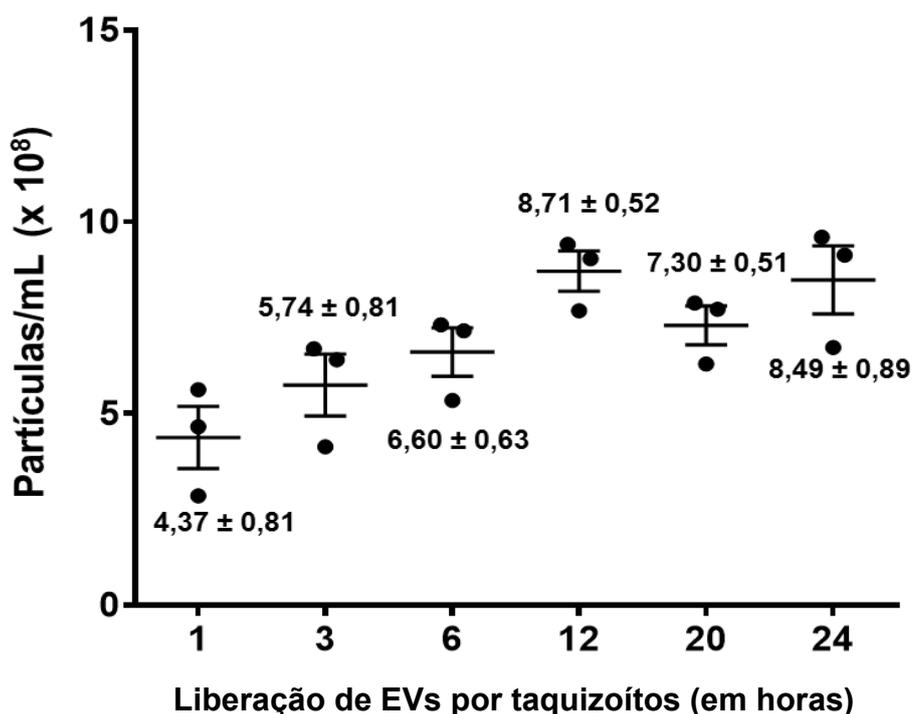


Figura 16. EVs liberadas por 1×10^6 taquizoítos em diferentes períodos de incubação (1, 3, 6, 12, 20 e 24 horas). As análises das concentrações de partículas foram realizadas no volume de 400uL de produto liberado por taquizoítos, em triplicata, e no equipamento NanoSight NS3000. Os valores estão expressos em média aritmética \pm EPM. (Análise estatística pelo método Tukey ANOVA”).

As Figuras 17A e 17B mostram a distribuição gráfica no NanoSight das concentrações/mL e tamanho das partículas liberadas por taquizoítos durante 1 hora e 24 horas respectivamente.

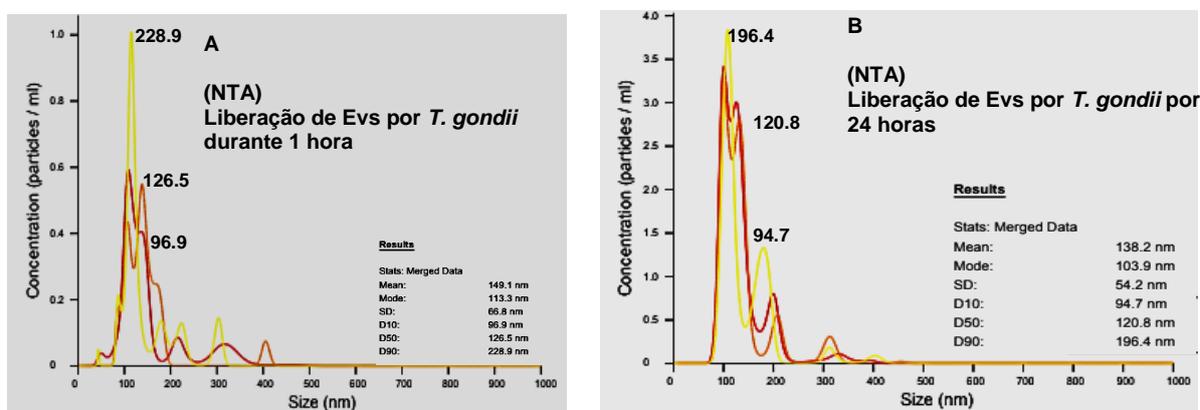


Figura 17. Imagens gráficas de NTA (NanoSight) das EVs liberadas por 1×10^6 taquizoítos por 1 hora (A) e por 24 horas (B).

4.2. Purificação das EVs liberadas por taquizoítos de *T. gondii*

4.2.1. Purificação por cromatografia e seleção por ELISA

As EVs liberadas no meio RPMI (de cerca de 1×10^{10} taquizoítos) foram purificadas por cromatografia de gel-exclusão (coluna Shepharose CL-4B). Com auxílio de uma bomba peristáltica foram coletadas cerca de 24 a 32 frações contendo 1 mL, num fluxo de 0,2 mL/min. A seguir, as frações foram testadas por ELISA. Aquelas contendo EVs foram reativas a um “pool” de soros reagente (humano) para toxoplasmose.

A Figura 18 mostra as frações reativas, que corresponderam ao pico da curva. A especificidade da metodologia foi demonstrada, uma vez que nenhuma fração foi reativa com o “pool” de soros não reagente (humano) para toxoplasmose. Em todas as reações foi incluído um controle positivo (antígeno ALT), onde o “pool” de soros reagente apresentava reatividade em torno de 1.5 (em D. o.).

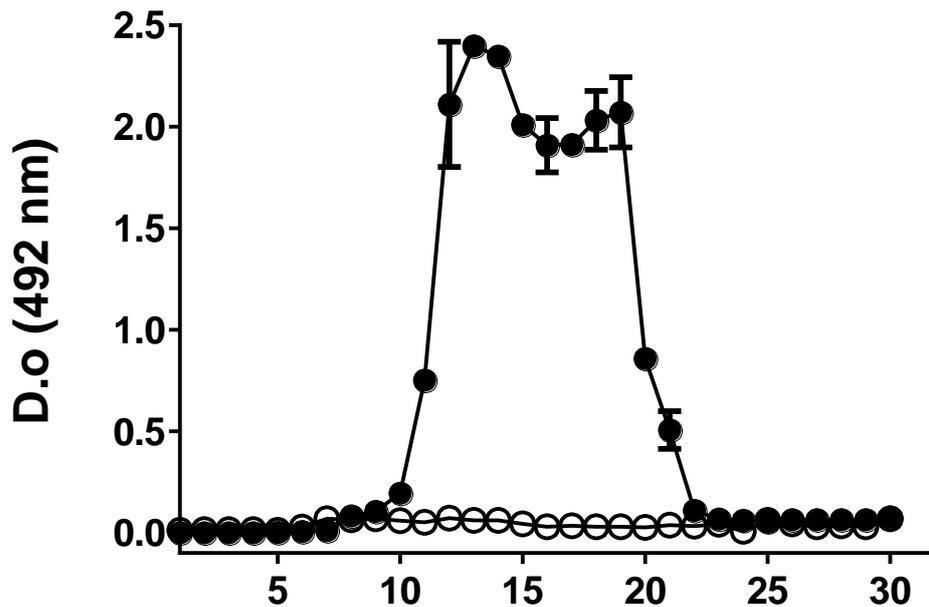


Figura 18. Isolamento de EVs de taquizóitos da cepa RH de *T. gondii*. Reatividade das frações eluídas por cromatografia em gel-exclusão (Sephacrose CL-4B). A metodologia utilizada foi ELISA utilizando um “pool” de soros reagente para toxoplasmose (círculos) e um “pool” de soros não-reagente para toxoplasmose (quadrados). Os resultados representam absorvância de cada fração na densidade óptica (D.O) de 492 nm. Os controles positivos na reações apresentaram D.O em torno de 1,5.

4.2.2. Análise da concentração de partículas por NTA e da concentração protéica por BCA

No passo seguinte, as concentrações de proteínas (Figura 19) de cada fração foram determinadas pela dosagem de proteínas pelo kit “*BCA Protein*”. As frações reativas em ELISA, contendo EVs apresentaram maior concentração de proteínas.

Juntamente com a análise de proteínas, as concentrações de partículas de cada fração foram determinadas pelo NTA (NanoSight) (Figura 20). As frações reativas em ELISA, contendo EVs apresentaram maiores concentrações de partículas do que as não reativas.

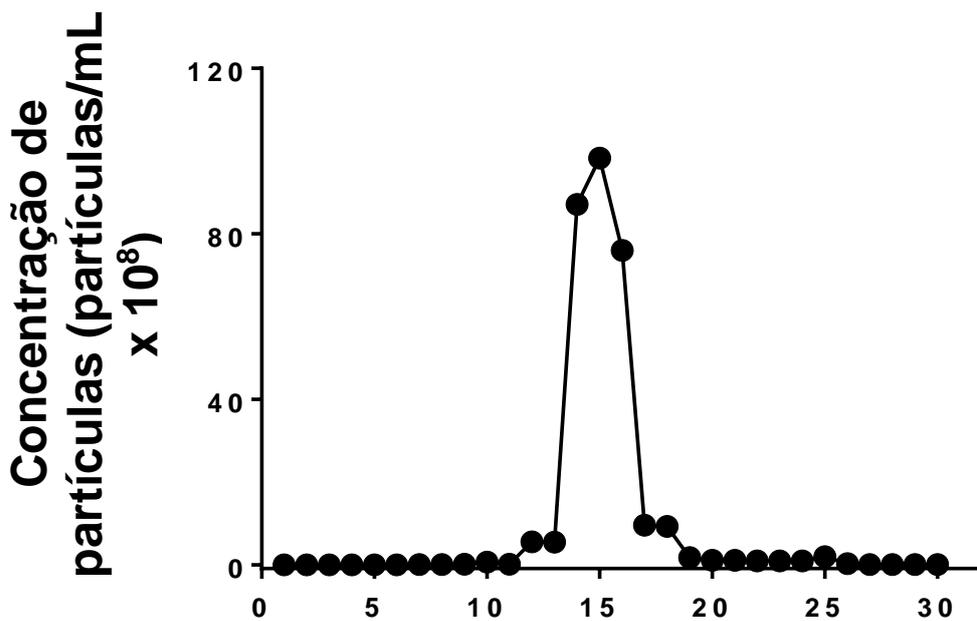


Figura 19. Concentração de partículas/mL das frações do isolamento das EVs (frações contendo 1 mL) por NTA. Experimento realizado no equipamento NanoSight.

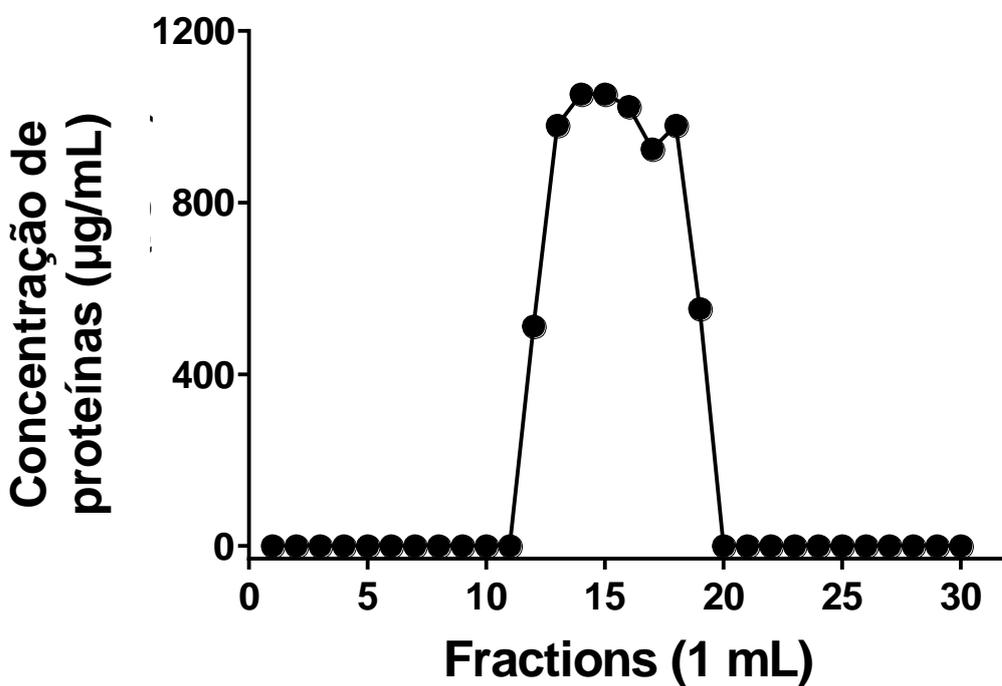


Figura 20. Dosagem das concentrações protéicas ($\mu\text{g/mL}$) das frações contendo as EVs pelo método BCA.

4.3. Caracterização das EVs liberadas por taquizoítos de *T. gondii*

4.3.1. Estrutura e liberação das EVs pela superfície da membrana de taquizoítos analisadas por microscopia eletrônica.

Para confirmar microscopicamente a presença das EVs nos produtos secretados por taquizoítos foram analisadas as imagens captadas por MEV. Os ensaios foram realizados em taquizoítos secretando EVs em meio RPMI durante 2 e 24 horas a 37° C. As diferenças nas concentrações das EVs liberadas pela membrana do parasita foram claramente observadas nas amostras coletadas após 2 horas (Figuras 21A e 21B) e 24 horas (Figuras 21C e 21D) de incubação.

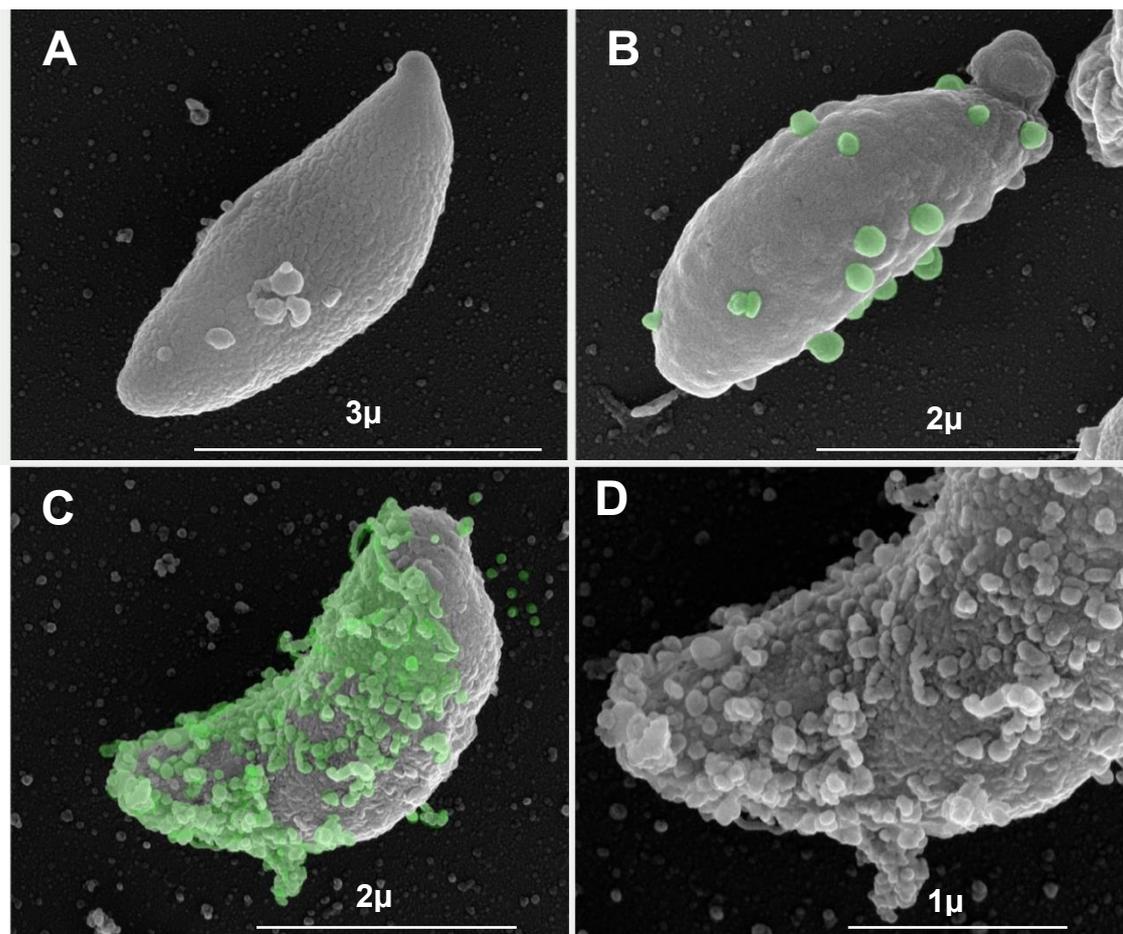


Figura 21. Fotografias capturadas por microscopia eletrônica de varredura de taquizoítos (cepa RH) de *T. gondii* liberando EVs (destaque em verde) pela superfície da membrana após incubação em meio de cultura RPMI durante 2 h (A e B) e 24 horas (C e D). Ampliação: (A) 104.767; (B) 54.619; (C) 108.169 e (D) 76.191.

As frações contendo EVs, após a purificação por cromatografia também foram analisadas microscopicamente. As imagens avaliadas pela MET revelaram numerosas vesículas, com o tamanho típico de EVs (Figura 22A). Além disso, a Figura 22B mostra as características morfológicas semelhantes às MVs produzidas por células de mamíferos e não mamíferos. Além da análise morfológica, estas imagens comprovaram a pureza de EVs após a passagem do produto liberado por taquizoítos na coluna de afinidade.

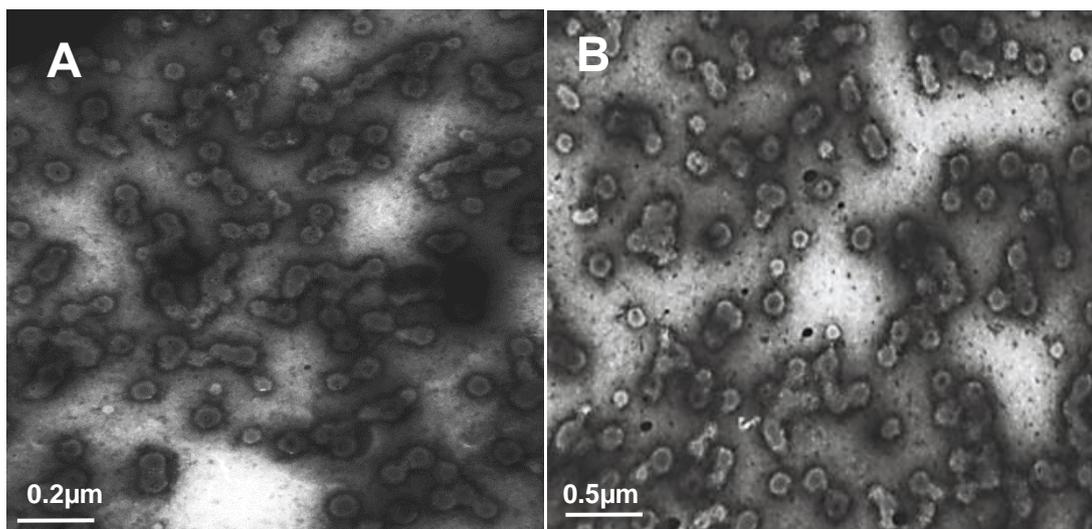


Figura 22. Imagens capturadas pela microscopia eletrônica de transmissão de considerável quantidade de EVs após purificação pela cromatografia. As frações reativas foram concentradas e preparadas para a microscopia. Amplificação: 25.000 (A) e 60.000 (B).

4.3.2. Dosagem de miRNA das EVs de *T. gondii*

A fim de investigar se as EVs de taquizoítos carregam miRNA, após a extração, as concentrações “*small RNAs/miRNA*” foram dosadas pelo método de corrida eletroforética micro fluídica com o *kit* para *small RNAs*. Posteriormente os resultados foram avaliados no equipamento Bioanalyzer. Estes procedimentos foram realizados em duas amostras de EVs purificadas e, para efeito de comparação, uma amostra contendo miRNAs extraídos de 1×10^8 taquizoítos. As concentrações de *small RNAs* das amostras 1 e 2 das EVs foram de 228,7 pg/ μ L e 1.574,4; e para miRNA, 124,0 pg/ μ L e 614,0 respectivamente. As proporções miRNA/*small RNA* foram 54% e 39%. Como as concentrações de miRNAs dos EVs foram muito baixas e próximas da detecção do limiar (Bioanalyzer-50 pg/ μ L), os valores foram comparados com os padrões eletroforéticos dos taquizoítos (1×10^8). Para este propósito, as moléculas de RNA dos taquizoítos foram diluídas 20 e 200 vezes. Os resultados foram visualizados como dados eletroforéticos (Figuras 23 e 24).

A concentração de *small* RNAs de taquizoítos que foi 19.896,00 pg/μl e de miRNA, 9.312,00 pg/μl.

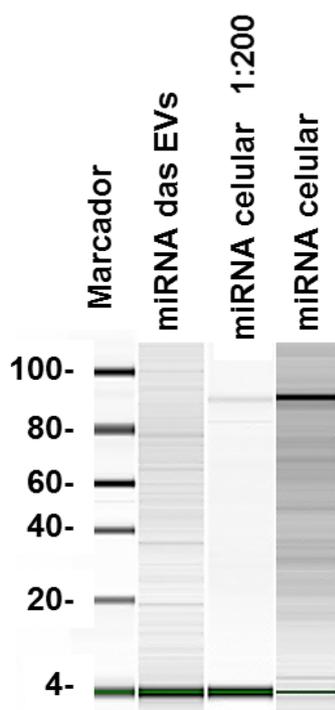


Figura 23. Imagem representativa do gel contendo miRNA celular (dos taquizoítos) e das EVs. As amostras foram analisadas no Agilent 2100 Bioanalyzer (usando o kit Small RNA expert). O marcador de massa molecular (em nucleotídeos) está indicado no lado esquerdo.

O valor da Integridade do RNA (RIN) foi de 9,5. A relação miRNA/*small*RNA foi de 47%. Quando as moléculas de RNA foram diluídas 20 vezes, a concentração de *small* RNA foi de 2.052,4 pg/μL e de miRNA foi de 1.256,6 pg/μL. A relação miRNA/*small* RNA foi de 61%. Quando as moléculas de RNA foram diluídas 200 vezes, a concentração de *small* RNA foi de 357,50 pg/μL e de miRNA, 195 pg/μL. A relação miRNA/*small* RNA foi de 55% (Tabela 2).

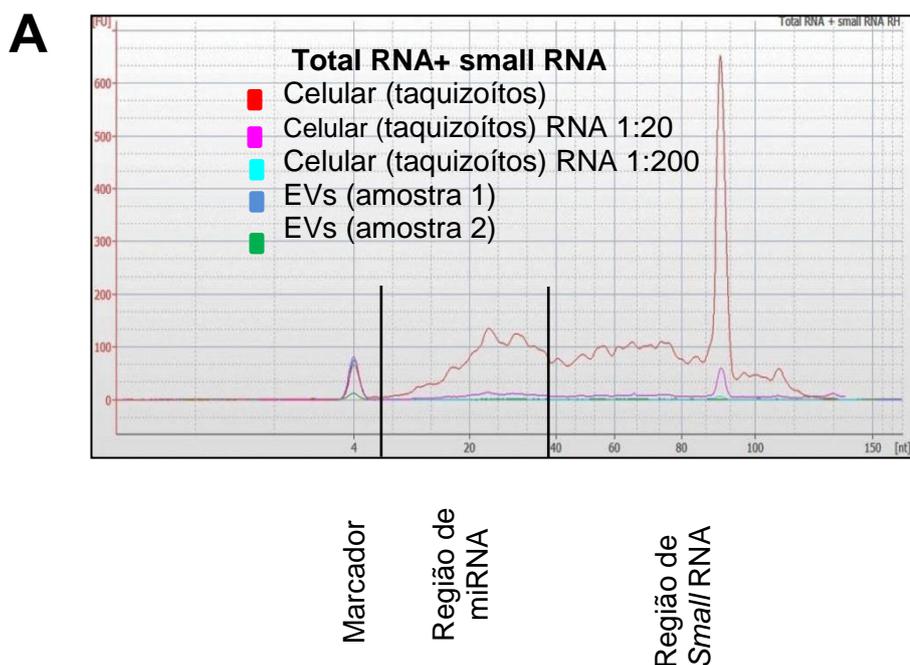


Figura 24. Concentrações smallRNA/miRNA nas frações contendo as EVs purificadas. Unidades de fluorescência (FU) no eixo Y e marcadores de peso molecular em número de nucleotídeos (nt) no eixo X. (A), distribuição gráfica de smallRNA e miRNA por padrões eletroforéticos das moléculas de RNA extraídas de taquizoítos (celular), diluídas 1:20, 1:200 e das EVs (amostras 1 e 2). Em (B) são mostrados apenas os resultados do RNA extraído de taquizoítos diluído 1:200 e de EVs (amostras 1 e 2).

Tabela 2. Quantidades totais de *small*RNA, miRNA e a relação de *small*RNA/miRNA de taquizoítos (celular), diluído 1:20; 1: 200 e das EVs purificadas (amostras 1 e 2).

Taquizoítos	Quantidade total		
	<i>small</i> RNA (pg/ μ l)	miRNA (pg/ μ l)	Relação miRNA/ <i>small</i> RNA [%]
Celular (1×10^8)	25666,0	15883,0	62
1:20	2052,4	1256,6	61
1:200	357,5	195,5	55
EVs (amostra 1)	228,7	124,0	54
EVs (amostra 2)	1574,4	614,0	39

4.3.3. Análise do perfil proteico das EVs e o reconhecimento da resposta imune hospedeira

Após a dosagem de proteínas das frações de EVs, as mesmas foram agrupadas e analisadas em SDS-PAGE. O perfil eletroforético das proteínas apresentou um espectro de 15 a 70 kDa (Figura 25). As tiras de nitrocelulose contendo as proteínas foram incubadas com os soros de camundongos e de humanos. O perfil eletroforético mostrou uma reatividade para o *pool* de soros humanos diferente dos soros de camundongos.

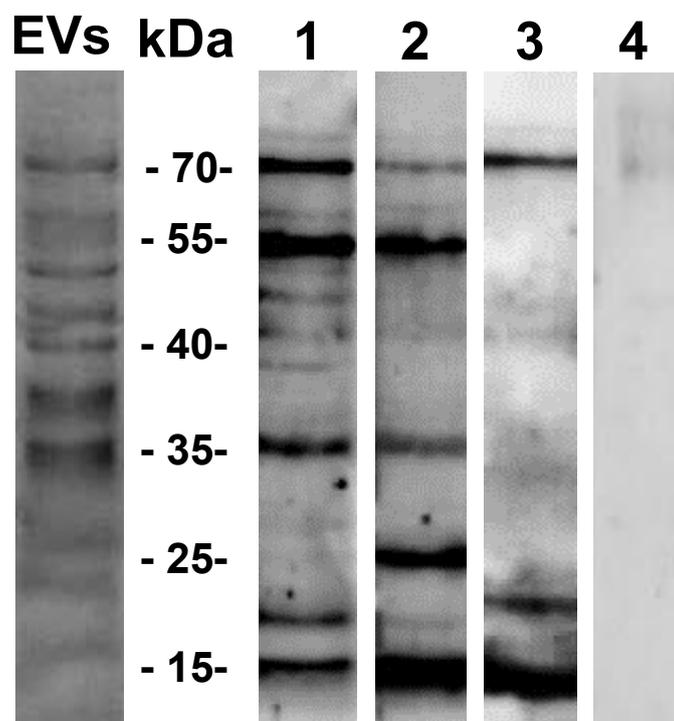


Figura 25. As proteínas das EVs (10 μ g) foram separadas por SDS-PAGE a 10% e coradas (EVs) e transferidas para nitrocelulose. Os soros foram incubados com as tiras de nitrocelulose e são: pool de soros de camundongos cronicamente infectados com a cepa VEG (tira 1) e com a cepa ME-49 (tira 2). Soro humano reagente (tira 3) e soro humano não reagente para toxoplasmose (tira 4).

5. DISCUSSÃO

A infecção causada por *T. gondii* induz alterações na resposta imune de hospedeiros infectados. Com o desequilíbrio da relação parasita-hospedeiro ocorre o aparecimento das formas clínicas da toxoplasmose (Pereira-Chioccola et al., 2009; Dubey et al., 2012).

As EVs têm papel importante em processos fisiológicos e patológicos. Assim, estão envolvidas nas infecções por protozoários, pois interagem com as células hospedeiras via membrana plasmática (Mantel e Marti, 2014).

Porem, a importância das EVs de *T. gondii*, particularmente, na resposta imune e no ambiente fisiológico não está totalmente elucidada. Estudos recentes demonstraram que exossomos excretados por células hospedeiras infectadas com *T. gondii* poderiam agir como uma vacina. A infecção por *T. gondii* alterou os mecanismos de proliferação celular das células infectadas e os exossomos liberados pelas células infectadas por *T. gondii* podem mediar essas alterações nas células vizinhas (Aline et al., 2004; Beauvillain et al., 2007; Bhatnagar et al., 2007; Pope e Lasser, 2013; Kim et al., 2016). Recentemente, Li et al. (2018) mostraram que exossomos de *T. gondii* podem modular a resposta imune do hospedeiro e Wowk et al (2017) demonstraram o primeiro perfil proteômico de exossomos de *T. gondii*, contendo uma ampla gama de proteínas. Dentre elas inclui-se as proteínas SAG, MIC, GRA, GPI, ubiquitina, ciclofilina e trombospondina (Torres et al., 2012).

Como destacado anteriormente, as EVs são classificadas em três subclasses, com base na origem e tamanho. O primeiro grupo é constituído dos corpos apoptóticos são as maiores EVs, com tamanho variando de 1.000 a 5.000 nm. O segundo grupo são as microvesículas que variam de 100 a 1.000 nm e são produzidas por brotamento externo da membrana plasmática (Delabbranch et al., 2012; Lagana et al., 2013; Akers et al., 2013). Elas podem carrear proteínas e RNA e agem como mensageiras entre as

células. O terceiro grupo são os exossomos que são as menores e mais bem caracterizadas vesículas (30–100 nm). São formadas pelo brotamento interno de vesículas no lúmen dos endossomos. Estes multivesiculares intracelulares fundem com a membrana plasmática e são liberados para o meio extracelular (Cocucci et al., 2009; Théry et al., 2009; Akers et al., 2013; Fleming et al., 2014; Coakley et al., 2015). Os exossomos podem carrear proteínas bioativas, mRNA, miRNA e outros RNAs não codificantes (Cocucci et al., 2009; Delabbranch et al., 2012; Lagana et al., 2013; Akers et al., 2013; Fleming et al., 2014; Schwab et al., 2015; Coakley et al., 2015; Tkach e Théry, 2016).

Proteínas de *T. gondii* são importantes marcadores das formas clínicas da doença, principalmente, na fase aguda (Hafid et al., 1992; Cesbron-Delauw e Capron, 1993; Meira et al., 2011). Tais proteínas são os primeiros alvos do sistema imune do hospedeiro (Zhou et al., 2005). Estudos anteriores mostraram que taquizoítos liberam este conjunto de proteínas, as ESAs, que são secretadas por taquizoítos no momento da penetração na célula hospedeira. Estas proteínas são compostas de numerosas moléculas efetoras que modulam as funções celulares do hospedeiro (Daryani et al., 2003; Meira et al., 2008; Meira et al., 2011; Długońska e Gatkowska, 2016). Das diversas funções já descritas das ESAs incluem-se a internalização de taquizoítos nas células hospedeiras e posterior desencadeamento da resposta imune do hospedeiro. Este processo já foi descrito em pacientes com a toxoplasmose sintomática (Prigione et al., 2000; Daryani et al., 2003; Meira et al., 2008; Meira et al., 2011; Długońska e Gatkowska, 2016). As ESAs inibem a expressão de MHC-II induzida por IFN- γ na superfície de células infectadas, interferindo, assim no processo de apresentação de antígeno e atenuando a resposta específica de células T CD4⁺ (Lerouxet al., 2015; Długońska e Gatkowska, 2016). Para que estes estudos fossem concluídos, os autores obtiveram as ESAs de sobrenadantes de culturas de células infectados com taquizoítos.

Neste estudo, igualmente, as EVs foram recuperadas de taquizoítos usando um protocolo semelhante ao utilizado para a recuperação das ESAs.

A diferença foi que para a obtenção das EVs, após a coleta dos parasitas das culturas, estes foram lavados por 5 vezes com PBS estéril com objetivo de retirar todos os resquícios de meio de cultura. Na segunda etapa, os parasitas foram incubados à 37° C em 5% de CO₂ em meio de cultura para que liberarem as vesículas (até 24 horas). Após a centrifugação, para separar os parasitas, o sobrenadante contendo as EVs foi filtrado em membrana de 0,22 µm para garantir a eliminação dos parasitas ou outras partículas maiores.

Como o objetivo deste estudo foi de estudar a microvesículas e exossomos secretados por taquizoítos, o método de escolha para purificação foi por cromatografia, seguindo o protocolo descrito por Troccoli-Torrecilhas et al. (2009), que purificam EVs de *T. cruzi*. Após a purificação das EVs de tripomastigotas, os autores selecionaram as frações que continham as EVs por ELISA, utilizando um anticorpo anti-α-galactosil, que reconhece epítomos de membrana de tripomastigotas (Nogueira et al., 2015).

No presente estudo, optamos pela coluna de purificação de cromatografia empacotada com a resina Sepharose CL-4B, que é composta por esferas de 40-165 µm de diâmetro (Hagel et al., 1996; Williams e Hagel, 1999 apud Boing et al., 2014). Em todas as purificações, as EVs foram encontradas nas mesmas frações, com coletas de 32 frações, contendo 1 mL cada.

A maioria dos protocolos descritos referem-se à purificação de exossomos e por ultracentrifugação (Li et al., 2018). Com base no tamanho das EVs, exossomos, por exemplo, podem ser isolados usando filtros de membrana com peso molecular definido ou limites de exclusão de tamanho (Hoy et al, 2014 apud Li et al., 2018). Segundo estes autores, a ultrafiltração é mais rápida que a ultracentrifugação e não requer equipamento especial (Zeringer et al., 2015). Embora a ultracentrifugação seja considerada o padrão-ouro no isolamento de EVs, é um procedimento demorado e laborioso. Exossomos isolados por ultracentrifugação diferencial geralmente contêm proteínas e lipoproteínas (Li et al., 2018). Da mesma forma, a cromatografia não deixa de ter suas limitações. Apesar de ser bastante

popular de isolamento de exossomos, pela sua simplicidade e rapidez, a coluna pode sofrer entupimento, reduzindo a vida útil das membranas e a baixa eficiência de isolamento (He et al., 2014 apud Li et al., 2018). A complexidade do isolamento por cromatografia é a presença de um grande número de partículas com nanômetros de diâmetro ou com o mesmo tamanho que EVs, mas que não são vesículas (Zeringer et al., 2015).

Kits comerciais foram desenvolvidos para ultrafiltração ou fracionamento rápido, baseados em uma seringa contendo uma resina e duas membranas (superior e inferior) para retenção de EVs maiores que exossomos, como corpos apoptóticos e microvesículas (Li et al., 2018). O mesmo instrumento pode ser reproduzido *in house* (Boing et al., 2014) como utilizado neste trabalho. Boing et al. (2014) purificaram EVs de soro humano. A coluna utilizada pelo grupo separou 26 frações de 0,5 mL de EVs de soro. Pelas análises por NTA verificaram que algumas frações continham as maiores concentrações das EVs derivadas de plaquetas.

Para garantir que somente EVs do organismo de escolha esteja presente nas frações coletadas na cromatografia ou ultracentrifugação, o recomendado é que se proceda métodos de reconhecimento como a microscopia eletrônica, a NTA e o reconhecimento antigênico por um método imunológico. Neste estudo, as frações contendo as EVs foram rastreadas por ELISA, utilizando soros humanos reagentes para toxoplasmose. Além de selecionar as EVs, estes dados também sugerem que as proteínas secretadas por taquizoítos podem ser transportadas por EVs, incluindo as microvesículas e exossomos. Segundo estudos recentes (Torres et al., 2012, Wowk et al., 2017), os exossomos contêm proteínas específicas de *T. gondii* como SAG, MIC, GRA, GPI, ubiquitina e ciclofilina. A especificidade da metodologia foi demonstrada pela reação negativa, quando foram utilizados soros humanos não reagentes para toxoplasmose.

A confirmação da presença das EVs nas frações reagentes foi verificada pelos ensaios realizados no NanoSight. Foram comparados o tamanho e as concentrações das partículas liberadas pelas EVs em diferentes períodos de incubação. As análises quantitativa e qualitativa das

EVs normalmente são complementadas com os dados gerados pela NTA e microscópica eletrônica respectivamente. Os dados gerados pela NTA foram feitos em produtos liberados de 1×10^6 taquizoítos incubados em meio RPMI. Em 24 horas, os parasitas liberaram cerca de $8,49 \times 10^8$ partículas com tamanho de 165 a 175 nm. Portanto, estes dados indicaram o tempo de incubação ideal para aquisição da maior concentração de EVs sem a lise dos parasitas e que o tamanho médio das partículas foi típico de microvesículas. Estes dados foram muito semelhantes aos encontrados em estudos anteriores na análise de EVs de *T. cruzi* (Nogueira et al., 2015).

Pelas análises por microscopia eletrônica, tanto em transmissão como na varredura, que os taquizoítos liberam continuamente EVs no meio de cultura e por toda a superfície da membrana plasmática. Essas vesículas se apresentaram com tamanho, características e morfologia semelhantes a outras EVs já descritas na literatura, como as de mamíferos (Akers et al., 2013; Schwab et al., 2015; Coakley et al., 2015) e protozoários (Thery et al., 2009; Silverman e Reiner, 2011; Nogueira et al., 2015).

Os experimentos analisados no Bioanalyzer demonstraram a presença de *smallRNAs* e miRNAs nas EVs de taquizoítos. Estes dados sugerem que nestas vesículas ocorre também a presença de exossomos, como recentemente já demonstrados em outros estudos (Pope e Lasser, 2013; Pope e Lasser, 2013; Kowal et al., 2014; Wowk et al. 2017; Li et al., 2018). Já foram identificados cerca de 701 miRNAs isolados de exossomos *T. gondii* cujas funções sugerem o ciclo celular e a regulação da proliferação celular, e neurotropismo (Pope e Lasser, 2013; Kim et al., 2016).

Soros de pacientes com toxoplasmose e camundongos experimentalmente infectados com as duas cepas de *T. gondii* (ME-49 ou VEG) reconheceram distintos padrões eletroforéticos das proteínas das EVs no *Immunoblotting*.

Esses dados sugerem que as proteínas carregadas pelas EVs possam ser expressadas em diferentes concentrações nas cepas de *T. gondii*, com por exemplo, em diferentes epítomos (ou mudanças estruturais nas moléculas). Além disso, pela grande diversidade de proteínas

secretadas, sugere-se que *T. gondii* dependa de numerosas moléculas efetoras para modular as funções celulares do hospedeiro (Długońska e Gatkowska, 2016; Wowk et al., 2017).

Esses achados estão correlacionados com estudos que descreveram a participação das EVs produzidas por outros patógenos (vírus, bactérias, fungos e outros parasitas) na modulação do sistema imune do hospedeiro (Torrecilhas et al., 2012; Kowal et al., 2014; Twu e Johnson, 2014; Marcilla et al., 2014; Montaner et al., 2014; Nogueira et al., 2015; Schorey et al., 2015; Li et al., 2018). Nestes patógenos, as EVs apresentam um complexo de moléculas consideradas patogênicas para o hospedeiro infectado (Nogueira et al., 2015; Schorey et al., 2015). Desta forma, os parasitas são capazes de modificar a atividade do sistema imune do hospedeiro utilizando mecanismos como a evasão imune e molecular (Długońska e Gatkowska, 2016).

Os resultados apresentados neste estudo mostram que *T. gondii* secreta EVs contendo miRNA e que são reconhecidos pela resposta imune do hospedeiro. Certamente, os parasitas podem modular sua resposta. Contudo, como os EVs de *T. gondii* interagem com células hospedeiras (especialmente na expressão gênica através de mecanismos de miRNA) é um campo ainda desconhecido.

As vesículas liberadas por *T. gondii* podem ser um mecanismo importante pelo qual os parasitas apresentam seus antígenos ao hospedeiro e, portanto, podem ter um papel importante na patogênese da toxoplasmose.

6. Conclusão

- a. O protocolo para recuperação das EVs de *T. gondii* foi estabelecido a partir de 1×10^6 taquizoítos obtidos de cultura células. As EVs foram purificadas por cromatografia em gel-exclusão em e imuno-selecionadas por ELISA;
- b. As análises por NTA permitiram determinar que cerca de 1×10^6 taquizoítos secretaram de 4 a 8×10^8 EVs/mL num período de 24 horas de incubação em meio de cultura. As análises por NTA mostraram que as EVs apresentaram morfologia e tamanho de 165-175 nm de diâmetro, que correspondem às MVs;
- c. As imagens avaliadas por MET e MEV confirmaram a liberação das EVs por taquizoítos, e que estas apresentaram características típicas de MVs;
- d. As purificações de miRNA a partir das EVs e posterior corrida eletroforética micro fluídica confirmaram a presença de smallRNA e miRNA nas vesículas;
- e. As EVs de taquizoítos apresentaram um perfil eletroforético de proteínas com espectro de 15 a 70 kDa. Este perfil proteico foi reativo para soros humanos e murinos.

7. Referências Bibliográficas

Adjogble KDZ, Mercies C, Dubremetz JF, Hucke C, Mackenzie CR, Cesbron-Delaw MF, et al. GRAB9, a new *Toxoplasma gondii* granule protein associated with the intravacuolar network of tubular membranes. *Int J Parasitol.* 2004; 34: 1255-1264.

Ajioka JW, Morrissette NS. A century of *Toxoplasma* research. *Int J Parasitol.* 2009; 39: 859-860.

Akers JC, Gonda D, Kim R, et al. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol.* 2013; 113: 1-11.

Aline F, Bout D, Amigorena S, Roingeard P, Dimier-Poisson I. *Toxoplasma gondii* antigen-pulsed dendritic cell-derived exosomes induce a protective immune response against *Toxoplasma gondii* infection. *Infection and Immunity.* 2004; 7: 4127-4137.

Andaloussi SEL, Mager I, Breakefield XO, Wood MJA. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature Reviews.* 2013; 12: 347-357.

Andreu Z, Yanez-Mo M. Tetraspanins in extracellular vesicles formation and function. *Front Immunol.* 2014; 16: 442.

Araldi E, Kramer-Albers EM, Hoen EN, Peinado H, Psonka-Antoczyk KM, Rao P, Niel GV, Mo MY, Nazarenko I. International Society for Extracellular Vesicles: first annual meeting, April 17-21, 2012: ISEV-2012. *J Extracell Vesicles.* 2012; 10: 19995.

Bayer-Santos E, Aguilar-Bonavides C, Rodrigues SP, et al. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* secretome: characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins. *Journal of Proteome Research*. 2013; 2: 883-897.

Beauvillain C, Ruiz S, Guiton R, et al. A vaccine based on exosomes secreted by a dendritic cell line confers protection against *Toxoplasma gondii* infection in syngeneic and allogeneic mice. *Microbes Infect*. 2007; 9: 1614–1622.

Benedikter BJ, Bouwman FG, Vajen T, Heinzmann ACA, Grauls G, Mariman EC, Wouters EF, Savelkoul PH, Lopez-Iglesias C, Koenen RR, Rohde GG, Stassen FRM. Ultrafiltration combined with size exclusion chromatography efficiently isolates extracellular vesicles from cell culture media for compositional and functional studies. *Sci Rep*. 2017; 10: 15297.

Beyer C, Pisetsky DS. The role of microvesicles in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2010; 1: 21-9.

Bhatnagar S, Shinagawa K, Castellino FJ, Schroey JS. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood*. 2007; 9: 3234-3244.

Black MW, Boothroyd JC. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000; 64: 607-623.

Blader IJ, Saeij JP. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. *APMIS*. 2009; 117:458-76.

Bobrie A, Colombo M, Krumeich S, Raposo G, Thery C. Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are

present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation. *J Extracell Vesicles*. 2012; 1: 18397.

Bohne W, Gross U, Ferguson DJ, Heesemann J. Cloning and characterization of a bradyzoite-specifically expressed gene (*hsp30/bag1*) of *Toxoplasma gondii*, related to genes encoding small heat-shock proteins of plants. *Mol Microbiol*. 1995; 16: 1221-30.

Boing AN, Vand der Pol W, Grootemaat AE, Coumans FAW, Sturk A, Nieuwland R. Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *J Extracell Vesicles*. 2014; 3: 10.3402.

Bucki R, Bachelot-Loza C, Zachowski A, Giraud F, Sulpice JC. Calcium induces phospholipid redistribution and microvesicle release in human erythrocyte membranes by independent pathways. *Biochemistry*. 1998; 44: 15383-91.

Bulow R, Boothroyd JC. Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with p30 antigen in liposomes. *J Immunol*. 1991; 47: 3496-500.

Buschow SI, Nolte-t Hoen EN, van Niel G, Pols MS, ten Boreke T, Lauwen M, Ossendorp F, Melief CJ, Raposo G, Wubbolts R, Wauben MH, Stoorvogel W. MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathway. *Traffic*. 2009. 10: 1528-42.

Campos JH, Soares RP, Ribeiro K, Cronemberger-Andrade A, Batista WL, Torrecilhas AC. Extracellular vesicles: role in inflammatory responses and potential uses in vaccination in cancer and infectious diseases. *J Immunol Res*. 2015; 2015: 1-14.

Capron A, Dessaint JP. Vaccination against parasitic diseases: some alternative concepts for the definition of protective antigens. *Ann Inst Pasteur Immunol.* 1988; 139: 109-117.

Carruthers VB, Sibley LD. Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *Mol Microbiol.* 1999; 31: 421-8.

Carruthers VB, Sibley LD. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur J Cell Biol.* 1997; 73: 114-23.

Carruthers VB. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Trop.* 2002; 81:111-22.

Cesbron-Delauwn MF. Dense-granule organelles of *Toxoplasma gondii*: their role in the host-parasite relationship. *Parasitol Today.* 1993; 10: 293-6.

Chaput N, They C. Exosomes: immune properties and potencial clinical implementations. *Semin Immunopathol.* 2011; 5: 419-40.

Cleary MD, Singh U, Blader IJ, Brewer JL, Boothroyd JC. *Toxoplasma gondii* asexual development: indentification of developmentally regulated genes and distinct patterns of gene expression. *Eukaryot Cell.* 2002; 1: 329-40.

Coakley C, McCaskill J, Borger JG, Simbari F, Robertson E, Milar M, Marcus Y, McSorley HJ, Maizels RM, Buck AH. Extracelullar vesicles from a helminth parasite supress macrophage activation and constitute an effective vaccine for protective immunity. *Cell Rep.* 2017; 8: 1545-1557.

Coakley G, Maizels RM, Buck AH. Exosomes and other extracellular vesicles: the new communicators in parasite infections. *Trends Parasitol.* 2015; 10: 477-89.

Coccucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol.* 2009; 19: 43-51.

Colombo FA, Vidal JE, Penalva e Oliveira AC, Hernández AV, Bonasser Filho F, Nogueira RS, et al. Diagnosis of cerebral toxoplasmosis in AIDS patients in Brazil: importance of molecular and immunological methods using peripheral blood samples. *J Clin Microb.* 2005; 43: 5044-5047.

Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014; 30: 255-89.

Conrad PA, Miller MA, Kreuder C, James ER, Mazet J, Dabritz H, Jessup DA, Gulland F, Grigg ME. Transmission of *Toxoplasma*: clues from the study of sea otters as sentinels of *Toxoplasma gondii* flow into the marine environment. *Int J Parasitol.* 2005; 35:1155-68.

Corso G, Mager I, Lee Y, Gordens A, Bultema J, Giebel B, Wood MJA, Nordin JZ, Andaloussi SE. Reproducible and scalable purification of extracellular vesicles using combined bind-elute and size exclusion chromatography. *Sci Rep.* 2017; 7: 11561.

Costa-Silva TA, Meira CS, Ferreira IM, Hiramoto RM, Pereira-Chioccola VL. Evaluation of immunization with tachyzoite excreted-secreted proteins in a novel susceptible mouse model (A/Sn) for *Toxoplasma gondii*. *Exp Parasitol.* 2008; 120: 227-234.

Coyner CB, Lazer HM. Zika virus - reigniting the TORCH. *Nature.* 2016; 14: 707-715.

Crawford S, Diamond D, Brustolon L, Penarreta R. Effect of increased extracellular Ca⁺⁺ on microvesicle production and tumor spheroid formation. *Cancer Microenviron.* 2011; 1: 93-103.

Cronemberger-Andrade A, Aragão-França L, de Araujo CF, et al. Extracellular vesicles from leishmania-infected macrophages confer an anti-infection cytokine-production profile to naive macrophages. *PLoS Neglected Tropical Diseases.* 2013; 9: e3161.

Daryani A, Hosseine AZ, Dalimi A. Immune responses against excreted/secreted antigens of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in the murine model. *Vet Parasitol.* 2003; 2: 123-34.

Delabranx X, Berger A, Boisrame-Helms J, Meziani F. Microparticles and infectious diseases. *Med Mal Infect.* 2012; 42: 335–343.

Długońska H, Gatkowska J. Exosomes in the context of *Toxoplasma gondii* – host communication. *Ann Parasitol.* 2016; 62: 169-174.

D'Souza-Schorey C, Clancy JW. Tumor-derived microvesicles: shedding light on novel microenvironment modulators and prospective cancer biomarkers. *Genes Dev.* 2012; 26: 1287-99.

Dubey JP, Ferreira LR, Martins J, McLeod R. Oral oocyst-induced mouse model of toxoplasmosis: effect of infection with *Toxoplasma gondii* strains of different genotypes, dose, and model strains (transgenic, out-bred, in-bred) on pathogenesis and mortality. *Parasitology.* 2012; 1: 1-13.

Dubey JP, Frenkel JK. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J Protozool.* 1972; 19: 155-177.

Dubey JP, Jones JL. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *Int. J. Parasitol.* 2008; 38: 1257-1278.

Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones JL. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology.* 2012; 11: 1375-424.

Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clinical Microbiology Reviews.* 1998; 2:267-299.

Dubey JP, Miller NL, Frenkel JK. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *J Exp Med.* 1970; 132:636-662.

Dubey JP. A review of toxoplasmosis in wild birds. 2002; 106:121-53.

Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 1998; 28:1019-24.

Dubey JP. Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats. *J Parasitol.* 1995; 81: 410-5.

Dubey JP. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. *Vet. Parasitol.* 2004; 126: 57-72.

Dubey JP. Toxoplasmosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 1994; 205: 1593-1598.

Eliaz D, Kannan S, Shaked H, et al. Exosome secretion affects social motility in *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathog.* 2017; 3: e1006245.

Ferguson DJ. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008. homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104: 133-148.

Filipe V, Hawe A, Jiskoot W. Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. 2010; 27: 796-810.

Fleming A, Sampey G, Chung M. et al. The carrying pigeons of the cell: exosomes and their role in infectious diseases caused by human pathogens. *Pathog Dis*. 2014; 71: 109–120.

Frenkel J. K. *Toxoplasma* in and around us. Bioscience. 1973; 23: 343–352

Frenkel JK. Pathology and pathogenesis of congenital toxoplasmosis. Bull NY Acad Med. 1974; 50: 182–91.

Gardiner C, Ferreira YK, Dragovi RA, Redman CWG, Sargent IL. Extracellular vesicle sizing and enumeration by nanoparticle tracking analysis, Journal of Extracellular Vesicles. 2013; 2:1, DOI: 10.3402/jev.v2i0.19671.

Gonçalves MF, Umezawa ES, Katzin AM, et al. *Trypanosoma cruzi*: shedding of surface antigens as membrane vesicles. Experimental Parasitology. 1991; 1: 43-53.

Gould SJ, Graça R. As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. J Extracell Vesicles. 2013; 2: 1-3.

Grimwood J, Smith JE. *Toxoplasma gondii*: the role of parasite surface and secreted proteins in host cell invasion. Int J Parasitol. 1995; 26: 169-73.

Gross U, Bohne W, Soète M, Dubremetz JF. Developmental differentiation between tachyzoites and bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. Parasitol Today. 1996; 12: 30-3.

Gross U, Pohl F. Influence of antimicrobial agents on replication and stage covnersation of *Toxoplasma gondii*. Curr Top Microbiol Immunol. 1996; 219: 235-45.

Guescini M, Guidolin D, Vallorani L, Casadei L, Giocchani AM, Tibollo P, Battistelli M, Falcieri E, Battistin L, Agnati LF, Stocchi V. C2C12 myoblasts release micro-vesicles containing mtDNA and proteins involved in signal transduction. Exp Cell Res. 2010; 312: 1977-84.

Gyorgy B, Szabó TG, Pasztói M, Pal Z, Misják P, Aradi B, Laszló, V, Pallinger E, Pap E, Kittle A, Nagy G, Falus A, Buzas EI. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. Cell Mol Life Sci. 2011; 16: 2667-2688.

Hafid J, Raberin H, Pozzeto B, Akono ZY, Sung RT, Jana M, Gaudin O. Comparison of excretory/secretory and circulating antigens of *Toxoplasma gondii* by enzyme immunoassay and immunoblotting. Int J Parasitol. 1992; 8: 1083-1088.

Hagel L, Östberg M, Andersson T. Apparent pore size distributions of chromatography media. J Chrom A. 1996; 743: 33–42.

Hess C, Sadallah S, Hefti A, Landmann R, Schifferli JA. Ectosomes releases by human neutriphils are specialized functions units. J Immunol. 1999; 163: 4564-4573.

Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. Clin Microbiol Infect. 2002; 8: 634-40.

Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. Anim Health Res Rev. 2005; 6: 41-61.

Hill DE, Dubey JP. *Toxoplasma gondii* as a parasite in food: Analysis and control. Microbiol Spectr. 2016; 4: 1-17.

Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. J. Infect. Dis. 1995; 172: 1561–1566.

Hoy AM, Lundie RJ, Ivens A, Quintana JF, Nausch N, Foster T, Jones F, Kabatereine NB, Dunne DW, Mutapi F, MacDonald AS, Buck AH. Parasite-derived microRNAs in host serum as novel biomarkers of helminth infection. 2014; 8: e2701.

Hristov M, Erl W, Linder S, Weber PC. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. Blood. 2004; 104: 2761-66.

Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). J Biol Chem. 1987; 262: 9412-20.

Joiner KA, Roos DS. Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*: less is more. J Cell Biol. 2002; 157: 557-563.

Jones EJ, Korcsmaros T, Carding SR. Mechanisms and pathways of *Toxoplasma gondii* transepithelial migration. Tissue Barriers. 2017; 5: e1273865.

Jung C, Lee CY, Grigg ME. The SRS supefamily of *Toxoplasma* surface proteins. Int J Parasitol. 2004; 34: 285-96.

Jung, M. K., Mun, J. Y. Sample Preparation and Imaging of Exosomes by Transmission Electron Microscopy. *J. Vis. Exp.* 2018; 131: e56482, doi:10.3791/56482.

Kalra H, Drummen GPC, Mathivanan S. Focus on extracellular vesicles: introducing the next small big thing. *Int J Mol Sci.* 2016; 2: 170.

Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, et al. Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol.* 2012; 10: e1001450.

Kasper LH, Buzoni-Gatel D, Ups and downs of mucosal cellular immunity against protozoan parasites. *Infection and Immunity.* 2001; 69: 1-8.

Katzmann DJ, Babst M, Emr SD. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. 2001; 106: 145-155.

Keller S, Sanderson MP, Stoeck A, Altevogt P. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunol Lett.* 2006; 2: 102-108.

Khan A, Bohme U, Kelly KA, Adlem E, Brooks K, Simmonds M, Mungall K, et al. Common inheritance of chromosome Ia associated with clonal expansion of *Toxoplasma gondii*. *Genome Res.* 2006; 16: 1119-25.

Khan A, Fux B, Su C, Dubey JP, Darde ML, Ajika JW, Rosenthal BM, Sibley LD. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 04: 14872-7.

Kim D, Sung YM, Park J, Kim S, Park J, Ha H, Bae JY, Kim S, Baek D. General rules for functional microRNA targeting. *Nat Genet.* 2016; 12: 1517-1526.

Kim MJ, Jung BK, Cho J, Song H, Pyo KH, Lee JM, Kim MK, Chai JY. Exosomes secreted by *Toxoplasma gondii*-infected L6 cells: their effects on host cell proliferation and cell cycle changes. *Korean J Parasitol.* 2016; 2: 147-154.

Koojijmans SA, Vader P, van Dommelen SM, van Solinge WW, Schifferlers RM. Exosome mimetics: a novel class of drug delivery systems. *Int J Nanomedicine.* 2012; 7: 1525-41.

Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, Dingli F, Loew D, Tkach M, Thery C. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *J Proceedings of National Academy of Sciences.* 2016; 201521230.

Lagana A, Russo F, Veneziano D, et al. Extracellular circulating viral microRNAs: current knowledge and perspectives. *Front Genet.* 2013; 4: 120.

Lane CS. What is chromatography all about. *Journal of Research of the National Institute of Standards and technology.* 2017; 122: 10.6028.

Lekutis C, Ferguson DJ, Boothroyd JC. *Toxoplasma gondii*: identification of a developmentally regulated family of genes related to SAG2. *Exp Parasitol.* 2000; 96: 89-96.

Leroux LP, Dasanayake D., Rommereim LM, et al. Secreted *Toxoplasma gondii* molecules with expression of MHC-II in interferon gamma-activated macrophages. *Int J Parasitol* 2015; 45: 319-322.

Levine ND, Corliss JO, Cox FE, Deroux G, Grain J, Honigberg BM, et al. A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool.* 1980; 27:37-58.

Li Y, Liu Y, Xiu F, et al. Characterization of exosomes derived from *Toxoplasma gondii* and their functions in modulating immune responses. *Int J Nanomedicine.* 2018; 19:467-477.

Li Y, Liu Y, Xiu F, Wang J, Cong H, He S, Shi Y, Wang X, Li X, Zhou H. Characterization of exosomes derived from *Toxoplasma gondii* and their functions in modulating immune responses. *Int J Nanomedicine.* 2018; 13: 467-477.

Linares R, Tan S, Gounou C, Brisson AR. Imaging and qualification of extracellular vesicles by transmission electron microscopy. *Methods Mol Biol.* 2017; 1545: 43-54.

Lobb RJ, Becker M, Wen SW, Wong CS, Wiegmans AP, Leimgruber A, Moller A. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *J Extracell Vesicles.* 2015; doi: 10.3402/jev.v4.27031.

Lozano-Ramos I, Bancu I, Oliveira-Tercero A, Armengol MP, Menezes-Neto A, Del Portillo HAD, Lauzurica-Valdemoros R, Borrás FE. Size-exclusion chromatography-based enrichment of extracellular vesicles from urine samples. *J Extracell Vesicles.* 2015; 4: 10.3402.

Lycke E, Carlberg K, Norrby R. Interactions between *Toxoplasma gondii* and its hosts cells: functions of the penetration-enhancing factor of *Toxoplasma*. *Infect Immun.* 1975; 11: 853-861.

Lyons RE, Mcleod R, Roberts CW. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. *Trends Parasitol.* 2002; 18: 198-201.

Maas SLN, De VJ, Broekman ML. Quantification and size-profiling of extracellular vesicles using tunable resistive pulse sensing. *J Vis Exp*. 2014; 19: 10.3791.

Maas SLN, Vrij J, Vlist EJV, Geragousian B, Bloois L, Mastrobattista E, Schiffelers RM, Wauben MH, Broekman MLD, et al. Possibilities and limitations of current technologies for quantification of biological extracellular vesicles and synthetic mimics. *Journal of Controlled Release*. 2015; 200: 87-96.

Mantel PY, Marti M. The role of extracellular vesicles in *Plasmodium* and other protozoan parasites. *Cell Microbiol*. 2014; 3: 344-354.

Mathinavan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics*. 2009; 73: 1907-20.

Meira CS, Costa-Silva TA, Vidal JE, Ferreira IM, Hiramoto RM, Pereira-Chiocola VL. Use of the serum reactivity against *Toxoplasma gondii* excreted-secreted antigens in cerebral toxoplasmosis diagnosis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Med Microbiol*. 2008; 7: 845-500.

Meira CS, Pereira-Chiocola VL, Vidal JE, de Mattos CC, Motoie G, Costa-Silva TA, Gava R, Frederico FB, de Mattos LC; *Toxoplasma* Groups. Cerebral and ocular toxoplasmosis related with IFN- γ , TNF- α , and IL-10 levels. *Front Microbiol*. 2014 Oct 13;5:492.

Meira CS, Vidal JE, Costa-Silva TA, Frazatti-Gallina N, Pereira-Chiocola VL. Immunodiagnosis in cerebrospinal fluid of cerebral toxoplasmosis and HIV-infected patients using *Toxoplasma gondii* excreted/secreted antigens. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011 Nov;71(3):279-85.

Momen-Heravi F, Balai L, Alian S, Toxavidis V, Ericsson M, Distel RJ, Ivanov AR, Skog J, Kuo WP. Alternative methods for characterization of extracellular vesicles. *Front Physiol.* 2012; 3: 1-8.

Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet* 2004; 363:1965–1976.

Morrisette NS, Sibley LD. Cytoskeleton of Apicomplexan Parasites. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002; 66:21-38.

Moura Mde A, Amendoeira MR, Barbosa HS. Primary culture of intestine epithelial cells as a potential model for *Toxoplasma gondii* enteric cycle studies. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104: 822-4.

Nogueira PM, Ribeiro K, Silveira AC, Campos JH, Martins-Filho OA, Bela SR, Campos MA, Pessoa NL, Colli W, Alves MJ, Soares RP, Torrecilhas AC. Vesicles from different *Trypanosoma cruzi* strains trigger differential innate and chronic immune responses. *J Extracell Vesicles.* 2015; 4: e28734.

Odberg-Ferragut C, Soète M, Engels A, Samyn B, Loyes A, Van Beeumen J, Camus D, Dubremetz JF. Molecular cloning of the *Toxoplasma gondii* sag4 gene encoding an 18 kDa bradyzoite specific surface protein. *Mol Biochem Parasitol.* 1996; 82: 237-44.

Pappas G, Roussos N, Falagas ME. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int J Parasitol.* 2009; 39: 1385-94.

Pereira-Chioccola VL, Vidal JE, Su C. *Toxoplasma gondii* infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients. *Future Microbiol.* 2009; 4: 1363-1379.

Perkins ME. Rhoptry organelles of apicomplexan parasites. *Parasitol Today*. 1992; 8: 28-32.

Pittman KJ, Knoll LJ. Long-Term Relationships: the Complicated Interplay between the Host and the Developmental Stages of *Toxoplasma gondii* during Acute and Chronic Infections. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2015; 79:387-401.

Pope SM, Lasser C. *Toxoplasma gondii* infection on fibroblasts causes the production of exosome-like vesicles containing a unique array of mRNA and miRNA transcripts compared to serum starvation. *J Extracell Vesicles*. 2013; 1: 1-8.

Prigione I, Facchetti P, Lecordier L, Deslée D, Chiesa S, Cesbron-Delauw MF. T cell clones raised from chronically infected healthy humans by stimulation with *Toxoplasma gondii* excretory-secretory antigens cross-react with live tachyzoites: characterization of the fine antigenic specificity of the clones and implications for vaccine development. *J Immunol*. 2000; 164: 3741-3748.

Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of Cell Biology*. 2013; 200: 373-83.

Reiss M, Viebig N, Brecht S, Fourmaux MN, Soete M, Di Cristina M, Dubremetz JF, Soldati D. Identification and characterization of an escorter for two secretory adhesins in *Toxoplasma gondii*. *J Cell Biol*. 2001; 152: 563-78.

Robert-Gangneux F, Dardé ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev*. 2012; 25: 264-96.

Ryning FW, McLeod R, Maddox JC, Hunt S, Remington JS. Probable transmission of *Toxoplasma gondii* by organ transplantation. *Ann Intern Med*. 1979; 1: 47-9.

Savina A, Furlan M, Vidal M, Colombo MI. Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *J Biol Chem.* 2003; 278: 20083-90.

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

Schwab A, Meyering SS, Lepene B, et al. Extracellular vesicles from infected cells: potential for direct pathogenesis. *Front Microbiol.* 2015; 20: 1132 eCollection 2015.

Silverman JM, Reiner NE. Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes. *Cellular Microbiology.* 2011; 1: 1-9.

Simons M, Raposo G. Exosomes-vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol.* 2009; 4: 575-81.

Souza W, Martins Duarte ES, Lemgruber L, Attias M, Vommaro RC. Structure organization of the tachyzoite of *Toxoplasma gondii*. *Scientia Medica.* 2010; 1:131-143.

Souza W. Secretory organelles of pathogenic protozoa. *An Acad Bras Cienc.* 2006; 78: 271-291.

Speer CA, Dubey JP. Ultrastructure differentiation of *Toxoplasma gondii* schizonts (types B to E) and gamonts in the intestines of cats fed bradyzoites. *Int J Parasitol.* 2005; 35: 193-206.

Stegmann BJ, Carey JC. TORCH infections. Toxoplasmosis, Others (syphilis, varicella-zoster, parvovirus B19), rubella, cytomegalovirus (CMV), and Herpes infections. *Curr Womens Health Rep.* 2002; 4: 253-8.

Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol.* 2000. 30: 1217-1258.

Tenter AM. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104: 364-369.

Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol.* 2006; cap 3. unidade 22.

Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2009; 8: 581-93.

Tkach M, Théry C. Communication by Extracellular vesicles: where we are and where we need to go. *Cell.* 2016. 164: 1226-1232.

Tomavo S, Dubremetz JF, Schwarz RT. Structural analysis of glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of the *Toxoplasma gondii* tachyzoite surface glycoprotein gp23. *Biol Cell.* 1993; 78: 155-162.

Torres M, Ducournau C, Dimier-Poisson I. *Toxoplasma gondii*: qualified to secrete exosomes? International Meeting of ISEV 2012 International Society for Extracellular Vesicles, Gothenburg, <http://prodinra.inra.fr/record/188869>.

Trocoli Torrecilhas AC, Tonelli RR, Pavanelli WR, et al. *Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. *Microbes and Infection.* 2009; 1: 29-30.

Twu O, de Miguel N, Lustig G, et al. *Trichomonas vaginalis* exosomes deliver cargo to host cells and mediate host parasite interactions. PLoS Pathogen. 2013; 7: e1003482.

Van der Pol E, Boing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. Pharmacol Rev. 2012; 64: 676-705.

Van Der Pol E, Hoekstra AG, Sturk A, Otto C, Van Leeuwen, et al. Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2010; 8: 2592-2607.

Velge-Roussel F, Chardès T, Mévélec P, Brillard M, Hoebeke J, Bout D. Epitopic analysis of the *Toxoplasma gondii* major surface antigen SAG1. Mol Biochem Parasit. 1994; 66:31–38.

Wan KL, Carruthers VB, Sibley LD, Ajioka JW. Molecular characterization of an expressed sequence tag locus of *Toxoplasma gondii* encoding the micronela protein MIC2. Mol Biochem Parasitol. 1997; 84: 203-14.

Wang Y, Yin H. Research progress on surface antigen 1 (SAG1) of *Toxoplasma gondii*. Parasit Vectors. 2014; 7: 180.

Webber J, Clayton A. How pure are your vesicles. J Extracell Vesicles. 2013; 2: 10.3402.

Webster JP. The effect of *Toxoplasma gondii* on animal behavior: playing cat and mouse. Schizophr Bull. 2007; 33: 752-756.

Weiss LM, Kim K. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. Front Biosci. 2000; 5: 391-405.

Williams A, Hagel L. Column handbook for size exclusion chromatography. 1999; Philadelphia, PA: Academic Press.

Witwer KW, Buzas EI, Bemis LT, Bora A, Lasser J, Lotvall J, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles*. 2013; 27: 20360.

Wowk PF, Zardo ML, Miot HT, Goldenberg S, Carvalho PC, Mörking PA. Proteomic profiling of extracellular vesicles secreted from *Toxoplasma gondii*. *Proteomics*. 2017; 17:15–16.

Wu Y, Deng W, Klinker DJ. Exosomes: improved methods to characterize their morphology, RNA content, and surface protein biomarkers. *Analyst*. 2015; 140: 6631-6642.

Wubbolts R, Leckie RS, Veenhuizen PT, Schwarzmann G, Mobius W, Hoernschemeyer J, Slot JW, Geuze HJ, Stoorvogel W. Proteomic and biochemical analyses of human B-cell derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J Biol Chem*. 2003; 278: 10963-72.

Yilmaz SM, Hopkins SH. Effects of different conditions on duration of infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts. *J Parasitol*. 1972; 58: 938-9.

Yoshioka Y, Konishi Y, Kosaka N, Katsuda T, Kato T, Ochiya T. Comparative marker analysis of extracellular vesicles in different human cancer types. *J Extracell Vesicles*. 2013; 2: 10.3402.

Zerlinger E, Barta T, Li M, Vlassov AV. Strategies for isolation of exosomes. *Cold Spring Harb Protocol*. 2015; 4: 319-323.

Zhou XW, Kafasck BF, Cole RN, Beckett P, Shen RF, Carruthers VB. The opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii* deploys a diverse legion of invasion and survival proteins. J Biol Chem. 2005; 40: 34233-34244.

Zwaal RF, Schroit AJ. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. Blood. 1997; 89: 1121-32.

8. Anexos

8.1. Anexo 1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ/SES 

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Purificação e expressão de exossomos de *Toxoplasma gondii* e a correlação com a toxoplasmose humana

Pesquisador: Vera Lucia Pereira Chioccola

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 54606816.0.0000.0059

Instituição Proponente: Instituto Adolfo Lutz

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO
Instituto Adolfo Lutz

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Outros

Detalhe: documento solicitado pela Dra Luz Marina

Justificativa: Documentos solicitados pela Dra Luz Marina Trujillo

Data do Envio: 03/10/2016

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.845.705

Apresentação da Notificação:

À Dra. Vera Lucia Pereira Chioccola, pesquisadora responsável, cabe por parte do CEP/IAL o reconhecimento e explicação da incorreção ocorrida no uso do sistema por ocasião da emissão do parecer substanciado de 23/08/2016, quando a situação do parecer foi apontada como Aprovado e o correto seria Pendente para esclarecimentos sobre aspectos do gerenciamento do material biológico humano em uso na pesquisa.

Em tempo, o comitê comunicou e orientou a pesquisadora para a submissão das respostas ao parecer substanciado de 23/08/2016 na forma de Notificação sem prejuízo da condução da pesquisa, uma vez que as exigências resumiram-se em informações complementares, o que foi satisfatoriamente atendido.

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90
Bairro: Cerqueira César **CEP:** 01.246-902
UF: SP **Município:** SÃO PAULO
Telefone: (11)3068-2859 **Fax:** (11)3085-3505 **E-mail:** cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 1.845.705

Objetivo da Notificação:

Submeter à análise ética informações complementares apontadas no parecer consubstanciado aprovado do CEPIAL de 23/08/2016.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Nada a acrescentar ao parecer consubstanciado aprovado do CEPIAL de 23/08/2016.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

Nada a acrescentar ao parecer consubstanciado aprovado do CEPIAL de 23/08/2016.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Nada a acrescentar ao parecer consubstanciado aprovado do CEPIAL de 23/08/2016.

Recomendações:

Nada a declarar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Análise ética com base no parecer consubstanciado aprovado do CEPIAL de 23/08/2016 e na Notificação submetida em 03/10/2016.

Em resposta a pesquisadora informou que os soros negativos e aqueles de indivíduos são estão armazenados em "soroteca" a -20°C, em repositório sob a responsabilidade do Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas e Fungos do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz. E, os soros não serão esgotados após a pesquisa; uma quantidade muito pequena será usada para os controles negativos.

O protocolo de pesquisa foi instruído de acordo com a Resolução CNS 466/2012 e está aprovado e coerente com as normas institucionais.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS 466 de 12/12/2012, o pesquisador responsável deverá cumprir o item transcrito integralmente a seguir.

XI - Do pesquisador responsável

XI.1 - A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

XI.2 - Cabe ao pesquisador:

a) apresentar o protocolo devidamente instruído ao CEP ou à CONEP, aguardando a decisão de aprovação ética, antes de iniciar a pesquisa; b) elaborar o Termo de Consentimento Livre e

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90
Bairro: Cerqueira César **CEP:** 01.246-902
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3068-2859 **Fax:** (11)3085-3505 **E-mail:** cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 1.845.705

Esclarecido; c) desenvolver o projeto conforme delineado; d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento; f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa; g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Os relatórios deverão ser adicionados ao protocolo de pesquisa na Plataforma Brasil para análise do CEP/IAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	respostaCONEP.doc	03/10/2016 16:59:38	Vera Lucia Pereira Chioccola	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 01 de Dezembro de 2016

Assinado por:
Luz Marina Trujillo
(Coordenador)

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90
Bairro: Cerqueira César **CEP:** 01.246-902
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3068-2859 **Fax:** (11)3085-3505 **E-mail:** cepial@ial.sp.gov.br