

TALITA MOTTA QUIARIM

**ESTUDO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DE
Toxoplasma gondii E A CORRELAÇÃO COM A
INFECÇÃO HUMANA**

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

Orientador:

Prof(a). Dr(a). Vera Lucia Pereira-Chioccola

SÃO PAULO

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Quiarim, Talita Motta

Estudo das vesículas extracelulares de *Toxoplasma gondii* e a correlação com a infecção humana/ Marcos Paulo Guilherme. -2021.

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, 2021.

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

1. Toxoplasma/parasitologia. 2. Vesículas
extracelulares/parasitologia. 3. MicroRNAs/imunologia. 4.
Virulência/imunologia. 5. Citocinas/ imunologia.

SES/CCD/CD - 429/2021

Elaborada por Renan Matheus Predasoli CRB 8/9275

Dedicatória

Dedico este trabalho a todos os cientistas que, apesar de todas as dificuldades enfrentadas no país, cortes e negacionismos, ainda encontram motivos para continuar, obter novos conhecimentos e disseminar a importância que a ciência possui em nossas vidas.

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a minha família pelo constante apoio e incentivo ao meu crescimento pessoal e profissional, por me ajudar a correr atrás dos meus sonhos e me dar forças para conseguir realizá-los.

Agradeço a minha orientadora Dra. Vera, por ter me acolhido no início do mestrado e me ajudado a desenvolver todo esse trabalho. Obrigada por todo conhecimento compartilhado nesses dois anos.

Dra. Cristina, por todo apoio no meu projeto, pelos conhecimentos compartilhados e descontração no laboratório.

Agradeço à Marta por tudo que me ensinou nesse período, desde o meu primeiro dia no laboratório, pela companhia nas salas de aulas e nos momentos de descontração no laboratório. Admiro muito essa pessoinha maravilhosa e sou grata pela amizade que formamos.

À Alle e Ingrid pelos conhecimentos compartilhados, pelo apoio no meu projeto, cia nas aulas e, principalmente, pela amizade construída.

Obrigada Marta, Alle e Ingrid pelas cervejas compartilhadas, carnavais e pelas risadas nos momentos que mais precisei.

Agradeço a Margarete por todo o apoio técnico do meu projeto e pela ajuda no manuseio dos camundongos, além das inúmeras risadas na rotina do laboratório. Admiro essa pessoa guerreira e agradeço a amizade formada.

Aos colegas de trabalho do Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas e Fungos, Ricardo e Cida, pelo auxílio na parte técnica e experimental, na qual contribuíram de alguma forma na construção do meu projeto.

E não menos importante, agradeço a todos os meus amigos que tornaram esse dois anos divertidos e me deram todo o apoio emocional para conseguir finalizar mais essa etapa da minha vida. Obrigada!

Este trabalho teve o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 2018/04709-8.

Talita Motta Quiarim teve apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”

Ricardo Reis

RESUMO

Toxoplasma gondii é causador da toxoplasmose, uma das doenças mais prevalentes no mundo. Estudos recentes mostraram que vesículas extracelulares (EVs) liberadas por parasitas participam no processo de invasão e replicação no hospedeiro, porém o mecanismo de infecção ainda não está completamente elucidado. O objetivo desse trabalho foi identificar e caracterizar EVs produzidas por taquizoítos das cepas RH, ME-49 e VEG de *T. gondii* e a participação na patogênese da toxoplasmose. Purificação de EVs liberadas das três cepas de *T. gondii* foi realizada por cromatografia de exclusão de tamanho seguida por ELISA. Concentração e tamanho das vesículas isoladas foram analisados por *Nanoparticle Tracking Analysis*, o qual mostrou que as três cepas possuem perfis de liberação de EVs similares, com maior produção observada pela cepa RH. Quando analisados diferentes tempos de incubação, observou-se que em 2 horas de incubação ocorreu maior liberação de EVs do que em 24 horas de incubação, para as três cepas. A maior parte das vesículas encontradas possuía tamanho entre 100-200 nm, caracterizadas como microvesículas. Observou-se através de imagens capturadas por Microscopia Eletrônica de Varredura que a cepa RH liberou mais EVs do que as cepas VEG e ME-49. Após a análise de taquizoítos da cepa RH por Microscopia Eletrônica de Transmissão, observou-se que no início da incubação dos parasitas em meio de cultura inicia-se a formação de corpos multivesiculares contendo vesículas prontas para serem liberadas no meio extracelular. Após 24 horas, observou-se liberação intensa de EVs tanto pela membrana plasmática, quanto pelo poro posterior e anel apical. Além disso, verificou-se que *T. gondii* pode expressar os mesmos miRNAs que hospedeiros infectados. miR-155-5p, miR-125b-5p e miR-423-3p foram os mais expressos tanto em taquizoítos quanto em EVs por eles produzidas, para as três cepas. Experimentos com camundongos infectados com taquizoítos da cepa RH misturados com EVs mostraram que EVs são capazes de aumentar a parasitemia e virulência, diminuindo a sobrevivência do animal, especialmente para EVs produzidas pela cepa RH. Proteínas extraídas de

EVs das três cepas apresentaram perfis eletroforéticos similares, mas quando incubadas com soro de pacientes com toxoplasmose no *Immunoblot*, as cepas VEG e ME-49 reagiram fracamente, ao contrário de EVs da cepa RH que reagiram com soros de pacientes com toxoplasmose gestacional e cerebral. O estímulo de esplenócitos de camundongos *in vitro* com EVs liberadas pelas três cepas causou produção semelhante de IL-10 e IFN- γ após estímulos de 24 e 48 horas, para as três cepas. EVs da cepa RH estimularam mais TNF- α em relação às cepas VEG e ME-49. Em suma, estes resultados sugerem que EVs liberadas por taquizoítos das três cepas de *T. gondii*, especialmente para EVs liberadas por taquizoítos da cepa RH, foram capazes de promover a comunicação entre células do parasita e do hospedeiro, modulando a resposta imune, no entanto, desregulam a resposta imune celular do hospedeiro, já que carregam fatores de virulência.

Palavras-chave: cepas de *Toxoplasma gondii*; taquizoítos; vesículas extracelulares; miRNA; virulência; citocinas.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is the agent of toxoplasmosis, one of the most prevalent diseases in the world. Recent studies show that extracellular vesicles (EVs) released by parasites are involved in the invasion and replication mechanisms in the host, however they are not completely clear. The aim of this study was to identify and characterize EVs released by tachyzoites from RH, ME-49 and VEG strains of *T. gondii* and their role in toxoplasmosis pathogenesis. EVs purification was performed by size exclusion chromatography followed by ELISA. Size and concentration of EVs was analysed by Nanoparticle Tracking Analysis, which showed similar EVs release profile from the three strains, however RH strain showed higher production of EVs. When analysed different incubation periods, it was observed higher production of EVs in 2 hours rather than 24 hours of incubation, for the three strains. The majority size of EVs found was of 100-200 nm which is classified by microvesicles. Images captured by Scanning Electron Microscopy showed that tachyzoites from RH strain released more EVs than tachyzoites from ME-49 and VEG strains. Also, images captured by Transmission Electron Microscopy of tachyzoites from RH strain showed that in the beginning of incubation period starts the formation of multivesicular bodies with vesicles inside ready to be released in the lumen. After 24 hours, it was able to observe intense release of EVs from the plasmatic membrane, as well as from posterior pore and apical ring. Furthermore, it was found that *T. gondii* was able to express the same miRNAs found in infected hosts. miR-155-5p, miR-125b-5p e miR-423-3p were the most expressed in tachyzoites as well as in EVs released from them in the three strains. Experiments with laboratory mice infected with tachyzoites of RH strain mixed with EVs, especially for EVs released from RH strain, showed that EVs can enhance parasitemia and virulence, decreasing mice's survival. Protein extracted from EVs of the three strains demonstrated similar electrophoretic profiles, but when EVs were incubated with sera from patients with toxoplasmosis, in Immunoblot analysis, EVs from ME-49 and VEG strains reacted poorly, unlike EVs from RH strains which reacted with sera from

patients with gestational and cerebral toxoplasmosis. Stimulus of EVs released from the three strains in mice splenocytes *in vitro* produced similar concentrations of IL-10 and IFN- γ after 24 and 48 hours, in the three strains. EVs released from RH strain stimulated the production of more TNF- α than EVs released from ME-49 and VEG strains. Finally, these results suggest that EVs released from tachyzoites of three *T. gondii* strains, especially the ones released from RH strain, were able to establish communication between host cells and parasites, modulating host immune system, although they unbalance the host immune response since they carry virulence factors.

Keywords: *Toxoplasma gondii* strains; tachyzoites; extracellular vesicles; miRNA; virulence; cytokines.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACK	Do inglês <i>Ammonium-Chloride-Potassium lysis buffer</i>
ALT	Antígeno lisado de taquizoítos
APCs	Células apresentadoras de antígeno
BSA	Albumina sérica bovina
ConA	Concanavalina A
DC	Célula dendrítica
ELISA	Do inglês <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ESAs	Do inglês <i>excreted/secreted antigens</i>
EVs	Vesículas extracelulares
GBPs	Proteínas guanilato-ligantes
GPI	Proteínas glicosilfosfatidilinositol
GRA15	Proteína de grânulo denso 15
GRA24	Proteína de grânulo denso 24
IDO	Indolamina 2,3-dioxigenase
IFN- γ	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina de classe A
IgE	Imunoglobulina de classe E
IgG	Imunoglobulina de classe G
IgM	Imunoglobulina de classe M
IGRs	Proteínas GTPases imuno-relacionadas
IL-1B	Interleucina 1B
IL-6	Interleucina 6

IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LPS	Lipopolissacarídeo
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MIC	Proteína de micronema
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NK	Do inglês <i>natural killer</i>
NTA	Do inglês <i>nanoparticle tracking analysis</i>
PBS	Do inglês <i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
QR	Quantificação relativa
RISC	Complexo silenciador induzido por RNA
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROP5	Proteína de rópria 5
ROP16	Proteína de rópria 16
ROP18	Proteína de rópria 18
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SAG	Proteína de superfície
SDS-PAGE	Do inglês <i>sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SFB	Soro fetal bovino

SNC	Sistema nervoso central
STAT1	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 1
STAT3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
STAT6	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 6
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
TgESAs	Do inglês, <i>T. gondii excreted/secreted antigens</i>
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
Th1	Resposta celular do tipo 1
Th2	Resposta celular do tipo 2
TLRs	Receptores do tipo Toll
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UTR	Do inglês <i>untranslated region</i>

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação das formas parasitárias de *T. gondii*. Fonte: adaptado de Dubey, Lindsay e Speer (1998)..... 25
- Figura 2.** Processo de endodiogenia de taquizoítos observados ao microscópio eletrônico de transmissão. Fonte: Souza et al. (2010)..... 26
- Figura 3.** Microscopia eletrônica de transmissão de um cisto tecidual contendo centenas de bradizoítos. Fonte: Pavesio et al. (1992)..... 28
- Figura 4.** Oocistos de *T. gondii*. Fonte: Dubey, Lindsay e Speer (1998)..... 29
- Figura 5.** Esquema do ciclo de vida de *T. gondii*, demonstrando a biologia, infecção e replicação das três formas infectivas do parasita em seus respectivos hospedeiros. Fonte: adaptado de Robert-Gangneux e Dardé (2012)..... 30
- Figura 6.** Figura esquemática da transferência de proteínas e ácidos nucleicos por EVs. Fonte: adaptado de Raposo e Stoorvogel (2013)..... 48
- Figura 7.** Figura esquemática dos meios de comunicação intracelular mediada por EVs. Fonte: Adaptado de Marti e Johnson (2016). 51
- Figura 8.** Microscopia eletrônica de varredura demonstrando a liberação de EVs por taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH. Fonte: Silva et al. (2018)..... 53
- Figura 9.** Resultados do ELISA após a purificação de EVs de *T. gondii* da cepa RH por coluna de afinidade. 81
- Figura 10.** Métodos utilizados para romper a membrana das EVs e as respectivas concentrações de proteínas obtidas no BCA. 82
- Figura 11.** Perfil eletroforético de EVs liberadas por taquizoítos da cepa RH em SDS-PAGE 10% corado com prata..... 83
- Figura 12.** Representação do gel de poliacrilamida corado com prata..... 83

Figura 13. Análises por NTA de EVs liberadas pelos taquizoítos das cepas RH, ME-49 e VEG em 2 e 24 horas de incubação.....	85
Figura 14. Análise de tamanhos de EVs das três cepas de <i>T. gondii</i>	86
Figura 15. Purificação por cromatografia de exclusão de tamanho e ELISA de EVs liberadas por taquizoítos das cepas RH (A), VEG (C) e ME-49 (E) e concentrações de EVs avaliadas por NTA das cepas RH (B), VEG (D) e ME-49 (F).	87
Figura 16. Concentração de EVs dosadas por NTA após a purificação por cromatografia por exclusão de tamanho das cepas RH, VEG e ME-49 de <i>T. gondii</i>	88
Figura 17. Microscopia eletrônica de varredura de taquizoítos das cepas RH (A e B), VEG (C e D) e ME-49 (E e F) de <i>T. gondii</i> mostrando a liberação de numerosas EVs pela membrana plasmática após incubação por 2 horas...	89
Figura 18. Microscopia eletrônica de transmissão dos taquizoítos de <i>T. gondii</i> da cepa RH em dois tempos de incubação para se observar a liberação de EVs.	90
Figura 19. Expressão dos miRNAs miR-155-5p, miR-125b-5p, miR-423-3p, miR-21-5p, miR-29c-3p, miR-9-5p, miR-146a-5p e miR-484 em taquizoítos e EVs produzidas por taquizoítos das cepas RH, VEG e ME-49 de <i>T. gondii</i> . 92	
Figura 20. Parasitemia de camundongos infectados com taquiozítos da cepa RH (colunas beges) e camundongos infectados com taquizoítos da cepa RH e EVs das cepas RH (colunas rosas – A), VEG (colunas verdes – C) e ME-49 (colunas azuis – E), e índices de sobrevivência de camundongos infectados com taquiozítos da cepa RH (linhas pretas) e camundongos infectados com taquizoítos da cepa RH e EVs das cepas RH (linha vermelha – B), VEG (linha verde – D) e ME-49 (linha azul – F).	95
Figura 21. Perfil eletroforético em SDS-PAGE 10% coradas com prata de EVs das cepas RH (1), VEG (4) e ME-49 (7)	96

Figura 22. Immunoblot a partir de SDS-PAGE 10% contendo EVs secretadas por taquizoítos da cepa RH e transferidos para membrana de nitrocelulose, que foram incubadas com soros humanos com toxoplasmose gestacional (1 e 2), cerebral (3 e 4), sem toxoplasmose (5), soros murinos infectados com a cepa VEG (6), ME-49 (7) e sem toxoplasmose (8). 97

Figura 23. Produção de IFN- γ , IL-10 e TNF- α por esplenócitos de camundongos in vitro após estímulo por EVs das cepas RH, VEG e ME-49 98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. miRNAs utilizados para o ensaio de expressão gênica e seus respectivos genes-alvo humanos e as sequências nucleotídicas. Fonte: Thermo Fisher Scientific, disponível em:

<www.thermofisher.com/order/genome-database> 69

Tabela 2. Quantificação Relativa da expressão dos miRNAs pesquisados tanto em taquizoitos quanto em EVs produzidas nas três cepas de *T. gondii*.

..... 93

ÍNDICE

1. Introdução.....	20
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i> e toxoplasmose	20
1.1.1. Histórico	20
1.1.2. Epidemiologia	21
1.1.3. Morfologia e ciclo de vida	23
1.1.4. Variação genética.....	32
1.1.5. Transmissão e manifestações clínicas	35
1.1.6. Diagnóstico, tratamento e prevenção	37
1.2. Relação parasita-hospedeiro - Resposta imunológica contra <i>T. gondii</i>	39
1.2.1. Antígenos excretados/secretados de <i>T. gondii</i>	43
1.3. Vesículas Extracelulares.....	43
1.3.1. Métodos para isolamento e caracterização de vesículas extracelulares	45
1.3.2. Comunicação entre as células	47
1.3.3. Infecções parasitárias.....	49
1.3.4. EVs de <i>T. gondii</i>	52
1.4. microRNAs.....	54
1.5. Justificativa	57
2. Objetivos.....	58
2.1. Objetivo Geral	58
2.2. Objetivos Específicos.....	58
3. Metodologia	59
3.1. Considerações éticas.....	59
3.2. Manutenção das cepas de <i>T. gondii</i> em camundongos	59
3.3. Cultura de células VERO	60
3.4. Manutenção de cepas de <i>T. gondii</i> em cultura de células VERO ...	61
3.5. Produção de antígeno lisado de taquizoítos (ALT) da cepa RH de <i>T. gondii</i>	62

3.6.	Diagnóstico sorológico da toxoplasmose em soros humanos e murinos	63
3.7.	Recuperação e purificação de EVs de <i>T. gondii</i>	64
3.7.1.	Recuperação de EVs de <i>T. gondii</i> em cultura de células	64
3.7.2.	Cromatografia por exclusão de tamanho.....	64
3.7.3.	ELISA para seleção das frações de EVs purificadas.....	65
3.7.4.	Purificação de EVs por ultracentrifugação.....	65
3.8.	Análise estrutural de EVs.....	66
3.8.1.	Determinação das concentrações e tamanho de EVs por <i>Nanoparticle Tracking Analysis</i> (NTA).....	66
3.8.2.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	66
3.8.3.	Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)	67
3.9.	Expressão gênica de miRNA	68
3.9.1.	Extração de RNA e miRNA	70
3.9.2.	Síntese de DNA complementar (cDNA)	71
3.9.3.	PCR em tempo real quantitativo (qPCR).....	72
3.10.	Ensaio de virulência.....	72
3.10.1.	Extração de DNA.....	73
3.10.2.	PCR em tempo real quantitativo (qPCR).....	74
3.11.	Análise proteica e antigênica de EVs	75
3.11.1.	Quantificação de proteínas.....	75
3.11.2.	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	75
3.11.3.	Immunoblot.....	76
3.12.	Cultura de esplenócitos e ensaio de detecção de citocinas	77
3.12.1.	Detecção das concentrações de citocinas por ELISA	78
3.13.	Análise dos dados	79
4.	Resultados.....	81
4.1.	Padronizações	81
4.2.	Purificação e caracterização de EVs produzidas por taquizoítos das cepas RH, VEG e ME-49.....	83

4.3. Taquizoítos e EVs produzidas por taquizoítos das cepas RH, VEG e ME-49 expressam miRNAs encontrados em hospedeiros infectados por <i>T. gondii</i>	91
4.4. EVs aumentam a virulência de taquizoítos	93
4.5. EVs como biomarcadores no diagnóstico da toxoplasmose	96
4.6. EVs estimulam a produção de IL-10, IFN- γ e TNF- α em esplenócitos de camundongos <i>in vitro</i>	97
5. Discussão	100
6. Conclusão.....	110
7. Referências bibliográficas.....	111
ANEXO 1 – Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Adolfo Lutz (CEUA-IAL)	
ANEXO 2 – Comitê de Ética Humana CONEP-IAL/SES e CEP/Plataforma Brasil	

1. Introdução

1.1. *Toxoplasma gondii* e toxoplasmose

Toxoplasma gondii, agente etiológico da toxoplasmose, é responsável por uma das infecções zoonóticas mais prevalentes no mundo e pode ser considerado o parasita mais bem-sucedido, já que tem habilidade de infectar e se replicar em qualquer animal homeotérmico e se diferenciar em formas parasitárias que conseguem escapar das defesas de seu hospedeiro (Djurković-Djaković et al, 2019; Paris, 2020).

1.1.1. Histórico

T. gondii foi descrito pela primeira vez em 1908, na Tunísia, pelos pesquisadores Nicolle e Manceaux, que descobriram o parasita em roedores norte-africanos *Ctenodactylus gondii*. No mesmo ano, o pesquisador Splendore, no Brasil, encontrou o parasita em coelhos (Dubey et al., 2012; Halonen e Weiss, 2013).

A toxoplasmose foi considerada importante na clínica médica na década de 1920, na descoberta do parasita em crianças com infecção congênita e sintomas como hidrocefalia, retinocoroidite e encefalite, e teve a sua relevância como um patógeno emergente no final da década de 1930 (Halonen e Weiss, 2013; Paris 2020).

Em 1948, pesquisadores Sabin e Feldman desenvolveram um novo teste sorológico para toxoplasmose, hoje conhecido como reação de Sabin-Feldman ou *dye-test*, tornando possível conduzir os primeiros estudos epidemiológicos da doença (Dubey et al., 2012; Djurković-Djaković et al., 2019).

Apesar de sua relevância na medicina, foi apenas em 1960 que o ciclo de vida do parasita foi completamente entendido, com a descoberta dos felídeos como hospedeiros definitivos e a transmissão de oocistos através das

fezes desses animais, assim como a classificação e caracterização das três formas parasitárias infectivas (Robert-Gangneux e Dardé, 2012).

A partir dessa descoberta, presumiu-se, então, que o parasita se originou de felídeos na América do Sul com dispersão através de aves migratórias e, em particular, através de transatlânticos, com o tráfico de escravos, que proporcionou a migração de gatos domésticos, ratos e camundongos (Lehmann et al., 2006; Aguirre et al., 2019).

Há cerca de 80 anos, então, a toxoplasmose ficou conhecida como uma doença importante tanto para clínica médica quanto para veterinária (Djurković-Djaković et al., 2019).

1.1.2. Epidemiologia

Toxoplasmose é um problema de saúde pública no mundo todo e se qualifica como sendo uma doença da Saúde Única já que afeta significativamente humanos, animais domésticos, animais selvagens e ecossistemas, e é considerada uma ameaça àqueles que dependem dos animais para sua sobrevivência (Aguirre et al., 2019).

Os felídeos desempenham um papel importante na epidemiologia da toxoplasmose pois são os únicos animais capazes de liberar oocistos resistentes no meio ambiente (Amouei et al., 2019). A soroprevalência em gatos varia de 30-40% em conjunto com a prevalência regional e de acordo com o clima, ou seja, a prevalência é baixa em regiões com climas mais secos e frios (16,1% nos Estados Unidos da América - EUA) e, em regiões mais quentes e úmidas, a prevalência é maior (59,2% no Havaí) (Halonen e Weiss, 2013).

Com décadas de estudos epidemiológicos, as diferenças na prevalência de infecção por *T. gondii* no âmbito global são grandes. Atualmente, a prevalência varia em menos de 1% como na Coreia do Sul até mais que 75% como no Brasil (Djurković-Djaković et al., 2019). Diante disso, estima-se que um terço da população mundial já teve contato com o parasita, tendo em vista que países em desenvolvimento apresentam maior incidência

e, países desenvolvidos, menores incidências, além de variar de acordo com locais que possuem diferentes hábitos alimentares, condições ambientais e a presença de hospedeiros definitivos (Halonen et al., 2013; Paris, 2020).

Cerca de 8-22% da população norte-americana já contraiu toxoplasmose e o mesmo acontece com a população da Inglaterra, já na França, a prevalência entre mulheres grávidas decaiu de 80%, em 1960, para cerca de 37% em 2010 (Aguirre et al., 2019; Paris, 2020). Entende-se que os menores índices nesses países se relacionam à melhoria dos hábitos de higiene, assim como para o preparo de alimentos, e o melhor entendimento da população em relação aos riscos de consumir carne crua ou malpassada (Paris, 2020).

Nos países em desenvolvimento e tropicais, a prevalência depende das condições climáticas e ambientais, podendo ser maior em áreas urbanas e em climas úmidos (Paris, 2020).

Cerca de 30-90% da população da América Central, América do Sul, Europa Continental, Oriente Médio e partes do sudeste africano e asiático foi infectada (Pappas, Roussos e Falagas, 2009; Aguirre et al., 2019). A prevalência é geralmente maior na América do Sul (53% no sul do Brasil), ou mesmo na África (46% na Tanzânia e 40,8% na Nigéria), e menor na Índia (20,3%) ou no Leste Asiático (<10% Coreia ou China) (Paris, 2020).

Em relação ao Brasil, a soroprevalência de *T. gondii* é quatro vezes maior que nos EUA, e dentre a prevalência entre as crianças, a soropositividade chega a variar de 20-80%, sendo que 50% dos pré-adolescentes foram expostos ao parasita, e a prevalência é ainda maior em mulheres grávidas, variando de 36-92%, indicando que a soroprevalência de *T. gondii* em crianças e mulheres grávidas no Brasil é uma das maiores no mundo todo (Dubey et al., 2012).

Nos últimos 50 anos, 25 surtos de toxoplasmose foram descritos no Brasil, dos quais 56% ocorreram entre 2010 e 2018 (Shapiro et al., 2019).

Dentre eles, Malta et al. (2019) descreveu um surto que ocorreu na cidade de Gouveia/MG, entre os meses de fevereiro e maio de 2015, o qual

envolveu 50 casos confirmados e possivelmente associados ao consumo de água contaminada e linguiças artesanais.

Dentre os meses de dezembro de 2015 e junho de 2016, na cidade de Montes Claros de Goiás/GO, mais um surto envolveu 14 indivíduos positivos para toxoplasmose, sendo a provável transmissão através da ingestão água contaminada e consumo de leite e queijo fresco vindos de uma determinada fazenda da cidade (Da Costa et al., 2019).

Na cidade de Londrina/PR, entre os meses de dezembro de 2015 e fevereiro de 2016, foi identificado um surto envolvendo 20 pessoas infectadas de uma mesma instituição de pesquisa e, apesar de não ter sido possível estabelecer uma rota de transmissão, possivelmente essas pessoas adquiriram a infecção através do consumo de vegetais crus do restaurante da instituição onde trabalhavam (Pinto-Ferreira et al., 2019).

Em abril de 2018, ocorreu um dos maiores surtos no país, na cidade de Santa Maria/RS, envolvendo 809 casos confirmados de toxoplasmose, no qual um reservatório de água contaminada foi a possível via de transmissão do parasita (BRASIL, 2018; Minuzzi et al., 2020).

Já no começo de 2019, houve três surtos importantes no município de São Paulo/SP. Em fevereiro, quatro soldados de um quartel da polícia militar foram infectados e acredita-se que ocorreu devido ao contato com fezes de gatos no local. Já em abril, foram notificados dois surtos envolvendo contaminação de alimentos, sendo que o primeiro ocorreu em um restaurante de comida árabe e 47 pessoas foram infectadas, já o segundo ocorreu em uma festa infantil familiar e 35 pessoas adquiriram a infecção (BRASIL, 2019).

1.1.3. Morfologia e ciclo de vida

Pertencente ao filo Apicomplexa, classe Conoidasida, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidiida, família Sarcocystidae e subfamília Toxoplasmatinae, *T. gondii* é um protozoário intracelular obrigatório, ou seja, é um eucarioto unicelular que sobrevive dentro de células hospedeiras (Pereira, Franco e Leal, 2010; Kochanowsky e Koshy, 2018).

Assim como *T. gondii*, o filo Apicomplexa inclui outros patógenos de zoonoses importantes como *Plasmodium* spp., responsável por causar a malária, e *Cryptosporidium* spp., causador de diarreias graves em pacientes imunocomprometidos (Souza et al., 2010).

Esses organismos são caracterizados por conter similaridades em sua morfologia (apicoplasto) e organelas secretórias apicais (rôptrias, micronemas e grânulos densos) que liberam substâncias essenciais no processo de invasão, defesa e incorporação do metabolismo celular do hospedeiro para sobreviver (Kim, 2018; Zhang Y et al., 2019). As proteínas das rôptrias são responsáveis pela biogênese e associação das organelas do hospedeiro com o vacúolo parasitóforo, as proteínas dos micronemas participam na adesão e entrada do parasita na célula hospedeira, e as proteínas do grânulo denso modificam o vacúolo parasitóforo para aquisição de nutrientes da célula infectada (Carruthers, 2002)

O parasita é encontrado na natureza em três formas parasitárias distintas: esporozoítos (em oocistos), bradizoítos (em cistos teciduais) e taquizoítos (Robert-Gangneux e Dardé, 2012; Saadatnia e Golkar, 2012; Halonen e Weiss, 2013). Em geral, são células alongadas, em forma de meia-lua, com aproximadamente 5-8 μm de comprimento e 2-6 μm largura, com uma extremidade posterior arredondada e outra extremidade apical pontiaguda, que contém organelas secretórias usadas na invasão de células hospedeiras, são limitados por uma membrana complexa, denominada de película, que está associada ao citoesqueleto para manter a integridade estrutural e motilidade do parasita (Robert-Gangneux e Dardé, 2012; Halonen e Weiss, 2012). Pode-se observar na figura 1 a morfologia do bradizoíto e taquizoíto.

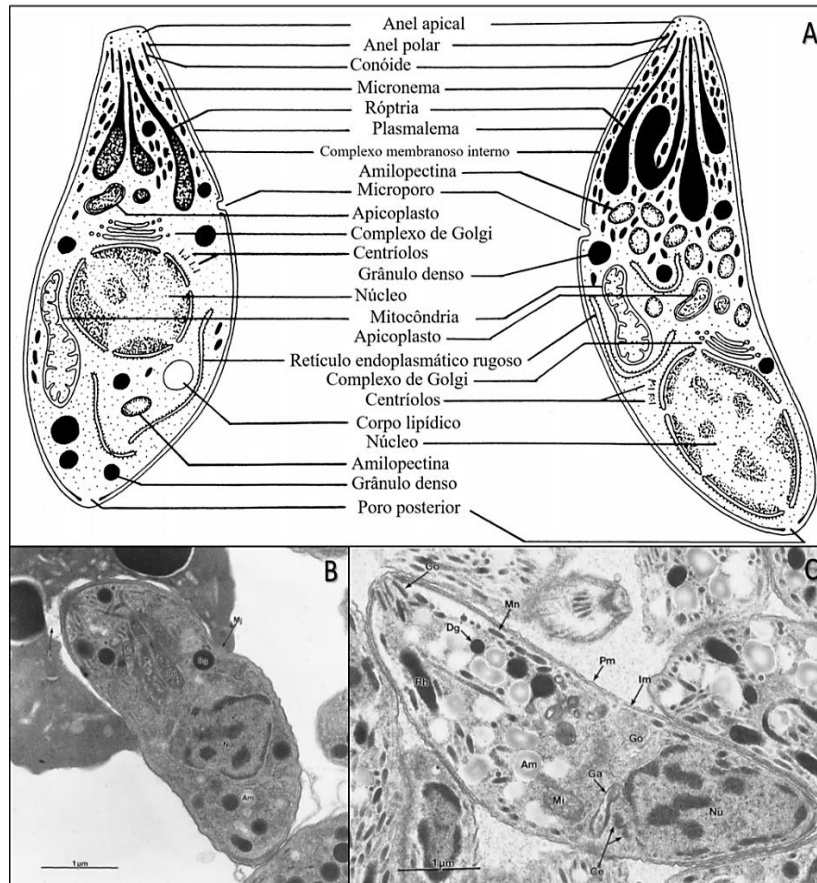


Figura 1. Representação das formas parasitárias de *T. gondii*. (A) Desenho esquemático, a partir de microscopia eletrônica, da morfologia de um taquizoíto (esquerda) e um bradizoíto (direita). (B) Microscopia eletrônica de transmissão de um taquizoíto invadindo um neutrófilo. (C) Microscopia eletrônica de transmissão de um bradizoíto dentro de um cisto tecidual. Fonte: adaptado de Dubey, Lindsay e Speer (1998).

Taquizoítos, formas disseminativas e de divisão rápida, são capazes de invadir praticamente todos os tipos celulares de vertebrados e se multiplicam a cada 6-8 horas, por endodiogenia (figura 2), dentro de compartimentos intracelulares chamados de vacúolos parasitóforos (Robert-Gangneux e Dardé, 2012; Halonen e Weiss, 2013; Kochanowsky e Koshy, 2018). No processo de infecção, o parasita secreta proteínas das três principais organelas secretórias – micronemas, róptrias e grânulos densos – para facilitar a adesão e invasão da célula hospedeira e formação do vacúolo parasitóforo (Ajioka, Fitzpatrick e Reitter, 2001).

O vacúolo parasitóforo é uma interface entre o parasita e as funções celulares do hospedeiro, é formado por uma membrana impermeável, a qual facilita a replicação e diferenciação do parasita, assim como fornece proteção contra radicais livres, pH e mudanças de osmolaridade da célula hospedeira, e que também auxilia nos mecanismos de evasão e ativação do sistema imunológico do hospedeiro (Pereira et al., 2010; Halonen e Weiss, 2013; Tu, Yakubu e Weiss, 2018).

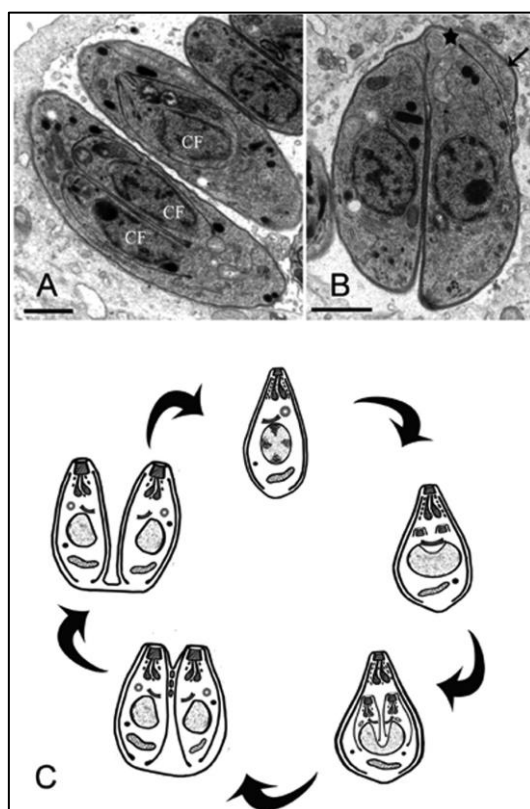


Figura 2. Processo de endodiogenia de taquizoítos observados ao microscópio eletrônico de transmissão. (A) Endodiogenia de dois taquizoítos. No parasita inferior observa-se a formação de duas células filhas (CF). (B) Final do processo de endodiogenia, observando-se duas células filhas completamente formadas. (C) Diagrama demonstrando como ocorre o processo de divisão assexuada (endodiogenia): inicialmente, começam a desenvolver dois complexos apicais no meio da célula, similar a um conóide rudimentar e um centro organizador de microtúbulos. O núcleo forma uma cavidade côncava e, à medida que o complexo interno se expande, o núcleo, apicoplasto e mitocôndria dividem-se entre duas

células filhas em formação. Ao final do processo, as células filhas se dividem completamente pela lise da membrana plasmática da célula mãe. Fonte: Souza et al. (2010).

Bradizoítos estão localizados primariamente em cistos teciduais no músculo ou no cérebro de hospedeiros intermediários e resultam da conversão de taquizoítos em formas de divisão lenta e que formam cistos teciduais (Robert-Gangneux e Dardé, 2012; Halonen e Weiss, 2013; Kochanowsky e Koshy, 2018). A diferenciação em bradizoítos é acompanhada pela alteração do perfil de expressão genética do parasita, havendo o remodelamento no esqueleto do parasita, mudanças no metabolismo de proteínas e suas atividades, e a formação da parede do cisto (Kim, 2018).

Os cistos teciduais são levemente esféricos, quando presentes em células cerebrais, ou alongados em células musculares esqueléticas e cardíacas. Cistos novos, contendo menos de três bradizoítos, medem cerca de 10 μm e, aqueles que contém centenas ou milhares de bradizoítos, chegam a medir mais de 100 μm (figura 3) (Robert-Gangneux e Dardé, 2012; Paris, 2020).

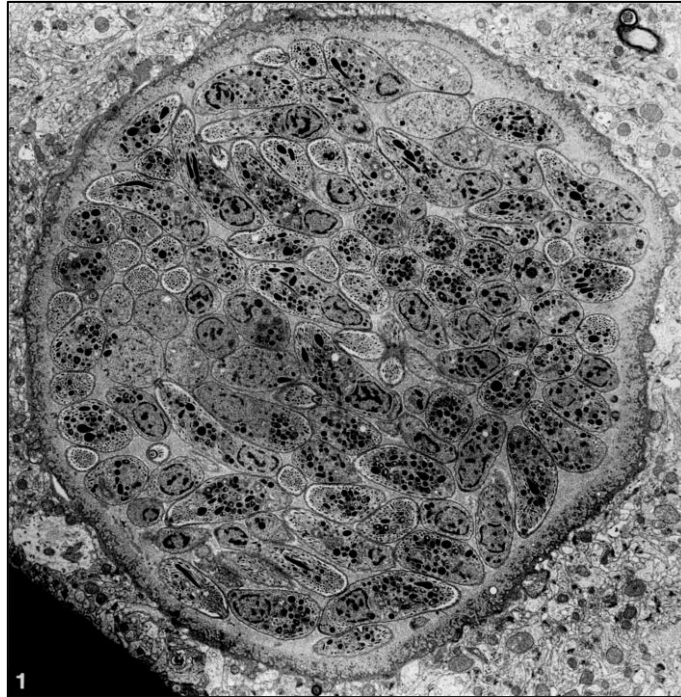


Figura 3. Microscopia eletrônica de transmissão de um cisto tecidual contendo centenas de bradizoítos. Fonte: Pavesio et al. (1992).

Uma característica definidora dos bradizoítos é a presença da parede do cisto, uma membrana modificada do vacúolo parasitóforo (Robert-Gangneux e Dardé, 2012). É compreendida por uma membrana espessa e limitante com inúmeras invaginações e material granular elétron-denso (Robert-Gangneux e Dardé, 2012; Tu, Yakubu e Weiss, 2018).

O cisto irá ajudar o parasita a estabelecer uma infecção crônica, proteger o parasita da resposta imune do hospedeiro e, também, proteger de ambientes extremamente ácidos do trato digestivo durante a ingestão, aumentando a sobrevivência no hospedeiro (Kochanowsky e Koshy, 2018; Tu, Yakubu e Weiss, 2018). Além disso, quando há a morte da célula parasitada, a parede do cisto se rompe e ocorre a liberação dos parasitas no meio extracelular (Tu, Yakubu e Weiss, 2018).

Esporozoítos estão localizados dentro de oocistos maduros. Oocistos são estruturas ovaladas de 12-13 μm que, após a esporulação, contêm dois esporocistos e cada um contendo quatro esporozoítos, tornando-se infectivo (figura 4) (Robert-Gangneux e Dardé, 2012; Shapiro et al., 2019).

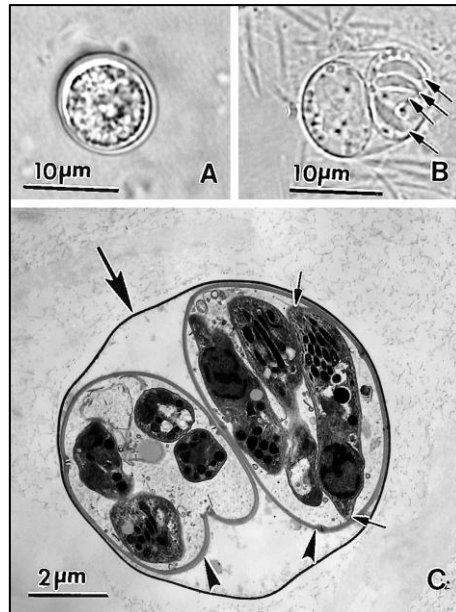


Figura 4. Oocistos de *T. gondii*. (A) Oocisto não-esporulado. (B) Oocisto esporulado com dois esporocistos. As setas apontam quatro esporozoítos dentro de um dos esporocistos. (C) Microscopia eletrônica de transmissão de um oocisto esporulado. A seta maior indica a parede do cisto. A seta mediana indica dois esporocistos. E as setas menores indicam os esporozoítos. Fonte: Dubey, Lindsay e Speer (1998).

A parede do oocisto possui multicamadas, além da parede que delimita os esporocistos, conferindo alta resistência e proteção a danos físicos e químicos, o que permite o parasita sobreviver por mais de um ano em um ambiente úmido (Robert-Gangneux e Dardé, 2012; Shapiro et al., 2019).

Além de proteção, a parede do oocisto também pode influenciar no transporte e aderência dos oocistos no solo e água para a disseminação no meio ambiente, por exemplo, os oocistos serem carregados do solo pela chuva e dispersos em rios ou lagos (Shapiro et al., 2019).

O ciclo de vida do *T. gondii* é complexo (figura 5) e envolve praticamente todos os animais homeotérmicos como hospedeiros intermediários (ciclo assexual) além dos felídeos como hospedeiros definitivos (ciclo sexual) (Lüder e Rahman, 2017; Zhang Y et al., 2019).

Felídeos podem ser infectados com as três formas do parasita e liberar oocistos infectivos, já os humanos, ou outros animais homeotérmicos, geralmente adquirem a infecção através da ingestão de cistos teciduais (presentes na carne de outros hospedeiros intermediários) ou oocistos (presentes nas fezes de gatos e pela contaminação do solo ou vegetais) ou mesmo pela transmissão vertical (Saadatnia e Golkar, 2012; Amouei et al., 2019).

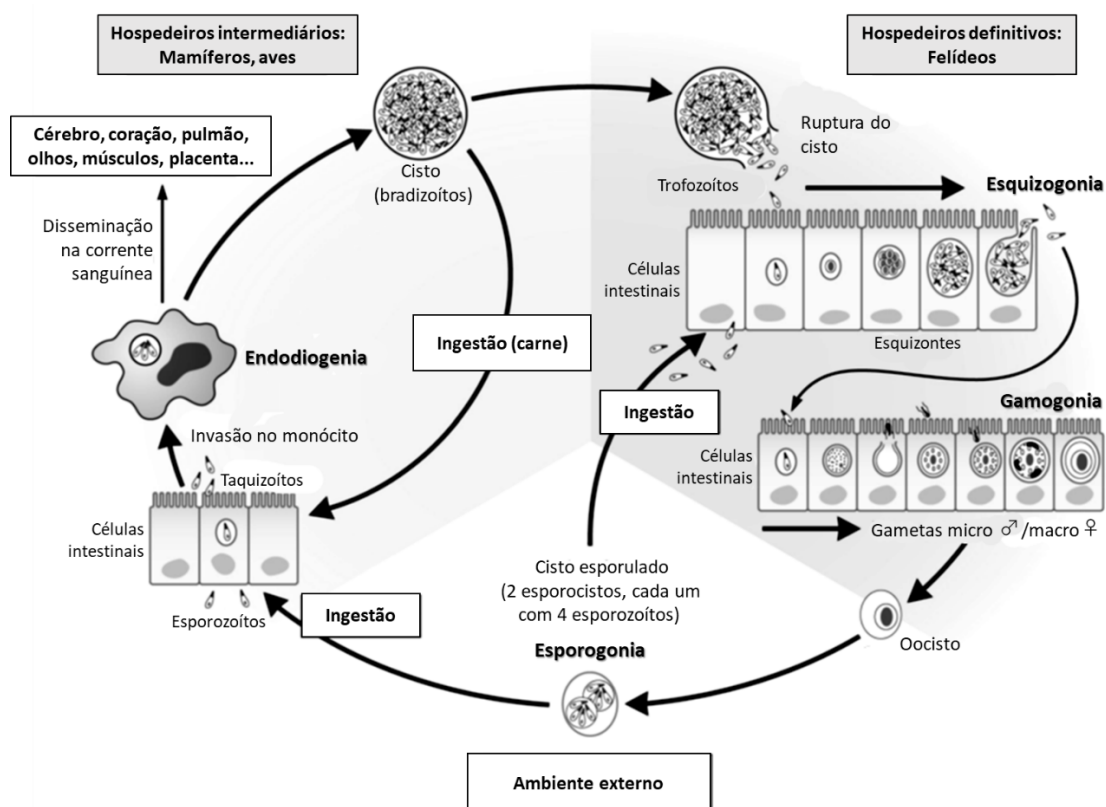


Figura 5. Esquema do ciclo de vida de *T. gondii*, demonstrando a biologia, infecção e replicação das três formas infectivas do parasita em seus respectivos hospedeiros. Fonte: adaptado de Robert-Gangneux e Dardé (2012).

As três formas parasitárias são haploides, sendo que taquizoítos e bradizoítos se dividem assexuadamente, enquanto esporozoítos são produtos da meiose (reprodução sexuada dentro dos enterócitos no intestino dos felídeos, produzindo oocistos diploides que entrarão em meiose) (Sibley et al., 2009).

A reprodução sexuada do parasita ocorre apenas nos felídeos (gatos domésticos e selvagens). Após a ingestão de cistos presentes em hospedeiros intermediários, a parede do cisto é degradada pelas enzimas gástricas do animal, liberando os parasitas. Bradizoítos, então, alojam-se nos enterócitos do intestino delgado e se multiplicam assexuadamente para a formação de merozoítos e, por conseguinte, esquizontes. Após isso, começa o ciclo sexuada, no qual há formação de gametas femininos e masculinos (gametogênese a partir da divisão dos esquizontes) e, após a fertilização, os oocistos formados nos enterócitos são liberados no lúmen intestinal, através da ruptura da célula, e excretados em formas não-esporuladas nas fezes do felídeo (Robert-Gangneux e Dardé, 2012).

A produção de oocistos pode começar de 3-7 dias após a ingestão de cistos teciduais e pode durar até 20 dias, sendo que os felídeos liberam cerca de 360 milhões de oocistos em suas fezes em um único dia (Pereira, Franco e Leal, 2010; Robert-Gangneux e Dardé, 2012; Kochanowsky e Koshy, 2018). Após alguns dias no meio ambiente, os oocistos irão esporular para sua forma infectiva (esporogonia), contendo esporozoítos, que serão ingeridos ou inalados pelos hospedeiros intermediários e irão se reproduzir assexuadamente no tecido desses animais (Aguirre et al., 2019).

Nos hospedeiros intermediários ocorre apenas a reprodução assexuada, ou seja, o parasita se reproduz simplesmente replicando seu genoma haploide e se dividindo em duas células filhas iguais (endodiogenia) (Kochanowsky e Koshy, 2018).

Após a ingestão de cistos ou oocistos, a parede dos mesmos é degradada e são liberados os bradizoítos/esporozoítos no lúmen intestinal (Robert-Gangneux e Dardé, 2012).

A interação entre o parasita e as células do hospedeiro envolve um estágio inicial de adesão e posterior invasão, os quais são importantes para o estabelecimento da infecção (Pereira, Franco e Leal, 2010). Durante a invasão, três proteínas são secretadas das organelas secretórias do parasita, róprias, micronemas e grânulos densos, dentro da célula do hospedeiro, essas proteínas irão alterar a função celular e inibir a resposta imunológica

contra os parasitas (Dupont, Christian e Hunter, 2012). Posto isso, bradizoítos/esporozoítos invadem as células intestinais (enterócitos), onde se diferenciam em taquizoítos e rapidamente começam a se multiplicar por endodiogenia, dentro dos vacúolos parasitóforos (Robert-Gangneux e Dardé, 2012; Saadatnia e Golkar, 2012).

Os taquizoítos, então, irão sair dos enterócitos através da lise celular e circular pelos vasos sanguíneos e linfáticos, com a possibilidade de infectar qualquer célula e tecido, incluindo o coração, pulmão e sistema nervoso central (SNC), podendo até atravessar a barreira transplacentária e infectar o feto (fase aguda) (Saadatnia e Golkar, 2012; Aguirre et al., 2019). Com a ação do sistema imunológico e/ou quimioterapia, ocorrerá a rápida transformação dos taquizoítos em bradizoítos e formação de cistos teciduais, normalmente se alojando em tecidos cerebrais, musculares e oculares (fase crônica) (Saadatnia e Golkar, 2012; Zhang Y et al., 2019).

O ciclo se completa quando os felídeos se alimentam da carne dos hospedeiros intermediários, ou mesmo os oocistos, e a reprodução sexuada se inicia novamente (Aguirre et al., 2019).

Uma das formas na qual o parasita facilita o término de seu ciclo de vida é pela manipulação do hospedeiro através de cistos presentes no cérebro (infecção crônica), tal como um estudo demonstrou que roedores infectados perderam o medo natural de gatos e demonstram atração pela urina desses animais, tornando-os vulneráveis à predação (Ingram et al., 2013; Aguirre et al., 2019). Outros estudos relataram distúrbios comportamentais e neurológicos em humanos relacionados à forma crônica da toxoplasmose, tais como convulsões, distúrbio bipolar, esquizofrenia, epilepsia e até distúrbio obsessivo-compulsivo (Martinez et al., 2018; Chegueni et al., 2019; Carrillo et al., 2020).

1.1.4. Variação genética

A estrutura populacional de *T. gondii* é resultante da habilidade do parasita de se reproduzir tanto via assexuada quanto sexuada. A reprodução

assexuada, infecção direta de um hospedeiro intermediário a outro, permite a evasão da reprodução sexuada e expansão de clones do parasita, ao passo que a reprodução sexuada produz novas linhagens parasitárias no hospedeiro definitivo e se distribui pela população através da reprodução clonal (Halonen e Weiss, 2013).

A combinação de cruzamentos genéticos seguidos de amplificação clonal de uma cepa pode ser uma adaptação importante do parasita permitindo a transmissão de novas linhagens e sua disseminação epidêmica (Halonen e Weiss, 2013).

Sendo assim, o entendimento da biologia populacional de *T. gondii* irá auxiliar, principalmente, na predição da infecção baseado no genótipo do parasita, havendo a possibilidade de identificar as diferenças na patogenia da toxoplasmose em uma determinada espécie animal e sua epidemiologia (Saeij, Boyle e Boothroyd, 2005; Pereira-Chioccola, Vidal e Su, 2009).

Atualmente, já foram descritos pelo menos 15 haplogrupos baseados em 138 linhagens diferentes de *T. gondii*, sendo que 107 linhagens se originaram na América Latina, indicando uma área de importante diversidade genética do parasita (Ajzenberg, 2015).

Estudos dos genótipos de *T. gondii* começaram na década de 1990 e, apesar da presença do ciclo sexual e distribuição mundial, a estrutura populacional do parasita foi inicialmente descrita como sendo altamente clonal e com baixa diversidade genética, agrupada em uma população clonal contendo três cepas diferentes, denominadas tipos I (RH), II (ME-49) e III (VEG), as quais se diferem geneticamente em menos de 1% (Saeij, Boyle e Boothroyd, 2005; Robert-Gangneux e Dardé, 2012).

As três diferentes cepas foram isoladas de humanos e animais domésticos na Europa e América do Norte, e as cepas RH e VEG são comumente encontrados no mundo todo, ao passo que a cepa ME-49 é predominante na Europa Ocidental e nos Estados Unidos, mas não há evidências na América do Sul (Paris, 2020).

As três cepas possuem baixo nível de divergência genética, em torno de 1-2% de divergência na sequência de DNA entre elas (Xiao e Yolken,

2015). Embora tenha pouca variação genética, as três cepas possuem diferentes fenótipos na análise de virulência em camundongos de laboratório, sendo que cepa RH causa infecções letais para os animais, mesmo que em títulos pequenos, enquanto a cepa ME-49 é moderadamente letal e a cepa VEG é consideravelmente menos virulenta (Sibley et al., 2009; Xiao e Yolken, 2015; Kochanowsky e Koshy, 2018).

As diferenças na patogenicidade das cepas são determinadas pelas diferenças no polimorfismo e expressão de proteínas como os grânulos densos e róprias (Sibley et al., 2009; Xiao e Yolken, 2015; Kochanowsky e Koshy, 2018).

A cepa RH, por ser mais virulenta, não produz prontamente cistos teciduais, enquanto as cepas ME-49 e VEG têm a capacidade de completar todo seu ciclo de vida, por se replicar mais lentamente, conseguem formar os cistos teciduais (Ajioka, Fitzpatrick e Reitter, 2001; Jeffers et al., 2018). Além disso, a cepa RH possui maior capacidade migratória *in vivo* e *in vitro*, rápida taxa de crescimento *in vitro* e pode chegar a altas cargas de infecção em camundongos de laboratório (Xiao e Yolken, 2015).

Na América do Norte e Europa, a cepa ME-49 é a mais comumente associada à toxoplasmose humana e alguns estudos mostraram que é também encontrada em animais do setor agrícola, como porcos e ovelhas, ao passo que galinhas apresentaram maior prevalência da cepa VEG do que da cepa ME-49 (Sibley et al., 2009). Na América do Sul, cepa RH foi associada a infecções de pacientes no Brasil (Hanolen e Weiss, 2013). Sendo assim, há uma relação entre as infecções das diferentes cepas e a susceptibilidade de cada hospedeiro animal e humano (Sibley et al., 2009; Ajzenberg, 2015).

Apesar de haver essas três cepas já descritas, regiões como América do Sul, África ou Ásia não apresentavam o mesmo padrão genotípico (exceto a cepa VEG que é cosmopolita), então, diversos estudos feitos com diferentes animais selvagens e em outras regiões geográficas demonstraram que a população genética do parasita é mais complexa e possui grande diversidade, as quais foram denominadas de linhagens atípicas ou recombinantes (Robert-Gangneux e Dardé, 2012; Amouei et al., 2019).

Além disso, foi demonstrado haver uma ligação entre a variedade genética e a manifestação clínica da toxoplasmose, como evidenciado em alguns casos na América do Sul, os quais apresentaram diversos casos de toxoplasmose severa em pacientes imunocompetentes. As linhagens recombinantes ou atípicas não são bem adaptadas ao hospedeiro humano, o que explica o aumento da severidade na infecção humana (Paris, 2020).

1.1.5. Transmissão e manifestações clínicas

A transmissão do parasita ocorre predominantemente através da ingestão de cistos teciduais, ingestão de oocistos presentes na água ou alimentos contaminados, ou mesmo pela transmissão congênita, além de infecções através de transplantes de órgãos e sangue e, também, pela ingestão de leite não-pasteurizado (Halonen e Weiss, 2013; Cerutti, Blanchard e Besteiro, 2020).

Oocistos são altamente infecciosos para herbívoros, assim como bradizoítos dos cistos teciduais são para os gatos, e a infecção causada pela ingestão de oocistos são clinicamente mais severas para hospedeiros intermediários do que aqueles infectados pela ingestão de cistos teciduais (Pereira, Franco e Leal, 2010).

Toxoplasmose em animais tende a ser ligada à exposição aos oocistos presentes no meio ambiente e, a presença de gatos domésticos circulando livremente em fazendas, é um fator de risco para os animais de corte criados no local, já que pode afetar ovelhas, cabras, porcos e galinhas, mas gado e cavalos são notavelmente resistentes à doença. Esses animais geralmente são assintomáticos, porém a transmissão congênita é mais grave e normalmente causa abortos ou morte dos filhotes pós-parto (VanWormer et al., 2013; Aguirre et al., 2019).

Gatos domésticos infectados por *T. gondii* são normalmente assintomáticos e não possuem sintomas clínicos notáveis, mas quando a infecção ocorre nos filhotes, essa tende a ser mais severa (Aguirre et al., 2019).

Apesar da toxoplasmose ser assintomática em 80% dos casos humanos, quando há sintomas, possui diferentes manifestações clínicas (Paris, 2020).

- I. Toxoplasmose aguda em pacientes imunocompetentes: em cerca de 20% dos pacientes sintomáticos, a doença se apresenta branda, com sintomas parecidos com mononucleose ou gripe moderada. Os sintomas tendem a desaparecer espontaneamente em poucas semanas/meses (Kaparos, 2014).
- II. Toxoplasmose em pacientes imunocomprometidos: a doença se apresenta na sua forma mais severa e, na maioria dos casos, é decorrente da reativação da infecção crônica devido à deficiência nas células T, resultando em encefalite ou pneumonia e pode ser fatal (Saadatnia e Golkar, 2012; Jeffers et al., 2018). Os grupos de alto risco incluem pacientes com infecção por HIV, pacientes tratados com medicamentos imunossupressores e pacientes que receberam transplante de medula óssea (Paris, 2020).
- III. Toxoplasmose aguda durante a gravidez: infecção primária da mãe e, a consequente infecção da placenta, é o mecanismo para a transmissão congênita, sendo a complicação mais grave dessa forma da doença. A placenta possibilita a transmissão ao feto em cerca de 30-50% das infecções adquiridas na gravidez (Montoya, 2008).
- IV. Toxoplasmose congênita: no início da gestação, pode ocorrer aborto espontâneo e a forma severa da doença se apresenta após o parto com calcificações intracranianas, hidrocefalia, retardo mental e coriorretinite, e sequelas da doença podem aparecer logo após o parto ou mais tarde (Halonen e Weiss,

2013). No entanto, a maioria dos neonatos são assintomáticos e irão apresentar sequelas muito tempo depois, sendo a visão a mais acometida, além de problemas neurológicos e cognitivos (Saadatnia e Golkar, 2012; Xiao e Yolken, 2015).

- V. Toxoplasmose ocular: é a principal causa de uveíte posterior no mundo, sendo a maioria dos casos em pacientes imunocompetentes e pacientes com infecção congênita (Xiao e Yolken, 2015). O envolvimento ocular da infecção não está diretamente ligado à infecção primária e pode ficar dormente por diversos meses (até anos) após a infecção primária e ser caracterizado por episódios recorrentes de coriorretinite que, quando associada à morbidade severa da doença, pode se estender a estruturas essenciais da visão, provocando desde a descolamento da retina até a cegueira (Paris, 2020).

Alta prevalência da toxoplasmose ocular tem sido notificada na América do Sul e África. No Brasil, a incidência é cerca de 17,7% comparado com 0,6% no Alabama (EUA) e, a seqüela ocular da toxoplasmose congênita é mais frequente, mais recorrente e mais severa do que na Europa (Gilbert et al., 2008). Estudos mostram que algumas cepas possuem tropismo pelo tecido ocular, sendo responsável pela toxoplasmose ocular, como, por exemplo, na França, a cepa ME-49 é responsável pela toxoplasmose ocular tanto em pacientes imunocompetentes quanto em imunocomprometidos, e nas Américas, as cepas RH e atípicas são responsáveis pela maioria dos casos (Xiao e Yolken, 2015; Paris, 2020).

1.1.6. Diagnóstico, tratamento e prevenção

O diagnóstico das diversas formas clínicas da toxoplasmose é estabelecido através da detecção direta do parasita ou de seu DNA em amostras de tecido/biópsias (sistema nervoso central, linfonodo, medula

óssea) e fluidos biológicos (sangue, líquido cefalorraquidiano, lavagem brocoalveolar, líquido amniótico) ou através da detecção indireta pela sorologia (Saadatnia e Golkar, 2012).

A detecção direta do parasita permite o diagnóstico da infecção aguda e requer a visualização de taquizoítos, através do isolamento dos parasitas do sangue e outros fluidos biológicos, e se faz através da inoculação intraperitoneal da amostra em camundongos de laboratório, sendo útil também para isolar a cepa do parasita (Paris, 2020).

Já a técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) é utilizada para a detecção direta do material genético do parasita na amostra biológica e vem sendo efetiva na detecção de toxoplasmose congênita, ocular e em pacientes imunocomprometidos (Mesquita et al., 2010, Saadatnia e Golkar, 2012; Paris, 2020). A técnica de PCR em tempo real (qPCR) é a mais usada para detectar e quantificar o DNA do parasita e é considerada uma técnica altamente sensível, específica e rápida (Galvani et al., 2019).

Considerando que a toxoplasmose é comumente assintomática ou não possui sintomas específicos, a detecção indireta da infecção através da sorologia é a mais utilizada (Saadatnia e Golkar, 2012). Diversos testes são usados para a detecção das diferentes classes de anticorpos (IgA, IgM, IgG, IgE) em fluidos biológicos, tais como ensaio de imunofluorescência indireta, teste de aglutinação direta e indireta, ensaio imunoenzimático ELISA, teste de avididade de IgG e *Western blotting/Immunoblotting* (Zhang K et al., 2016; Luo et al., 2019).

Após a detecção da infecção por *T. gondii*, a maioria dos medicamentos disponíveis para o tratamento da toxoplasmose são ativos apenas contra taquizoítos e pode não haver a completa eliminação da infecção, já que não são efetivos contra bradizoítos dentro de cistos teciduais e infecções persistentes, sendo recomendado apenas para pacientes com toxoplasmose severa, infecção congênita, para pacientes imunocomprometidos e pacientes grávidas com infecção primária (Wang et al., 2019).

Como ainda não há uma vacina disponível para toxoplasmose, a prevenção da doença é baseada primariamente na educação em saúde para se evitar exposição ao parasita e vigilância sorológica de pacientes grávidas para prevenção de toxoplasmose congênita (Saadatnia e Golkar, 2012; Paris, 2020).

1.2. Relação parasita-hospedeiro - Resposta imunológica contra *T. gondii*

O mecanismo de imunidade contra *T. gondii* é complexo e envolve as respostas imunes inata e adaptativa e, com uma resposta ágil desse sistema à proliferação dos parasitas, eliminando rapidamente os taquizoítos e, assim, impedindo o aparecimento de sintomas, entende-se o porquê a toxoplasmose é em sua maioria assintomática (Lüder e Rahman, 2017; Sasai, Pradipta e Yamamoto, 2018; Wang et al., 2019).

A resposta imunológica contra a infecção por *T. gondii* é mediada primariamente por células do tipo Th1 que dependem da produção de interleucina-12 (IL-12) e interferon gama (IFN- γ) (Pifer e Yarovinsky, 2011; Halonen e Weiss, 2013). IL-12 e IFN- γ são citocinas essenciais para a eliminação de taquizoítos durante a infecção aguda e são importantes para a indução da formação de cistos teciduais e manutenção da infecção crônica (Wang et al., 2019).

Após a invasão das células por taquizoítos e início da infecção, células do sistema imune inato (células dendríticas, macrófagos e neutrófilos) são as primeiras a migrar para o local de infecção e fazer a detecção do parasita através de receptores padrão de reconhecimento (PRRs), como receptores *Toll-Like* (TLRs), receptores *Nod-like* e lecitinas do tipo C (Dupont, Christian e Hunter, 2012; Sasai e Yamamoto, 2019; Wang et al., 2019).

Quando as células epiteliais são parasitadas, estas secretam quimiocinas, antígenos de *T. gondii* (profilinas - essenciais para a invasão do parasita nas células hospedeiras), os quais são detectados pelas células apresentadoras de antígeno (APCs) – macrófagos e células dendríticas (DC) (Betancourt et al., 2019; Sasai e Yamamoto, 2019). Os receptores TLR11 e

TLR12 dos macrófagos e DCs irão interagir com proteínas profilina do parasita presentes no lúmen e secretar IL-12 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e estes irão estimular células T CD4⁺ e CD8⁺ e células NK (*natural killer*) a produzirem altos níveis de IFN- γ e mediarão a citotoxicidade (Sasai, Pradipta e Yamamoto, 2018; Betancourt et al., 2019; Sasai e Yamamoto, 2019; Wang et al., 2019).

Além disso, neutrófilos são atraídos para o local de infecção e, em conjunto com macrófagos e DCs, irão fagocitar os parasitas que estão livre no lúmen, outros que foram opsonizados logo que entram na célula epitelial, ou mesmo fagocitar a célula infectada que entrou em apoptose (Robert-Ganganeux e Dardé, 2012; Betancourt et al., 2019; Sasai e Yamamoto, 2019).

Sendo assim, as APCs irão induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-12, importantes para a ativação das respostas imunológicas subsequentes (Sasai e Yamamoto, 2019; Wang et al., 2019). Além disso, a produção de TNF- α e IL-12 induz a diferenciação de células T CD4⁺ em células Th1, em resposta aos receptores TLR2 e TLR4 que detectam proteínas glicosilfosfatidilinositol (GPI) ancoradas ao parasita, e há secreção de IFN- γ (Betancourt et al., 2019; Wang et al., 2019).

IFN- γ irá limitar a proliferação do parasita, assim como a progressão da infecção, na fase aguda, eliminando o parasita através de diversos mecanismos intracelulares, como a estimulação da expressão de proteínas guanilato-ligantes (GBPs) e GTPases imuno-relacionadas (IGRs) para haver a degradação dos vacúolos parasitóforos (VP), aumentando a expressão de complexos principais de histocompatibilidade (MHC) e genes apresentadores de antígeno, assim como haverá a supra-regulação de outros fatores antiparasitários como espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) (Dupont, Christian e Hunter, 2012; Sasai e Yamamoto, 2019; Wang et al., 2019).

Sendo assim, IFN- γ amplifica o sinal pelo receptor de superfície e ativa o transdutor de sinal e ativador de transcrição 1 (STAT1), em resposta à ativação, macrófagos e monócitos irão supra-regular a expressão da enzima indolamina 2,3-dioxigenase (IDO), a qual diminui o triptofano, que é um

aminoácido essencial para a replicação dos taquizoítos; irão supra-regular a expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que controla a replicação do parasita com a diminuição de arginina; e supra-regular a expressão de espécies reativas de oxigênio (ROS), que controlam a replicação do parasita dentro da célula (Lima e Lodoen, 2019; Wang et al., 2019; Zhu et al., 2019).

O reconhecimento do parasita pelas células do sistema imune inato leva a ativação do sistema imune adaptativo (Sasai, Pradipta e Yamamoto, 2018). Imunidade adaptativa é dependente das APCs e a habilidade dessas células em detectar os antígenos de *T. gondii* (através da fagocitose do parasita ou de células infectadas, ou mesmo vestígios do parasita no lúmen, ou pela endocitose de antígenos secretados pelo parasita no meio) por TLRs e apresentar para as células B, células T CD4⁺ e CD8⁺ e células NK e ativá-las, havendo também o recrutamento de monócitos e neutrófilos para o local de infecção (Dupont, Christian, Hunter, 2012; Sasai, Pradipta e Yamamoto, 2018; Wang et al., 2019).

Uma vez ativadas, as células B se comportam como APCs e estimulam as células T CD4⁺ a secretarem citocinas como IL-12 (indutor de mitose em células T) e, juntamente com IFN- γ , resultará em cópias de células T CD4⁺ e CD8⁺ antígeno-específicas, que produzem IFN- γ nos locais de infecção, além de produzir IL-10 para suprimir a inflamação exacerbada (Hanolen e Weiss, 2013; Sasai e Yamamoto, 2019; Wang et al., 2019).

Monócitos e células NK também induzem a produção da citocina anti-inflamatória IL-10, a qual é produzida desde a fase inicial da infecção até a fase crônica e é importante para a modulação a resposta imunológica e previne a produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias do tipo Th1 (IFN- γ , TNF- α), limitando a inflamação (Dupont, Christian e Hunter, 2012; Sasai e Yamamoto, 2019; Wang et al., 2019).

Células T CD4⁺ e CD8⁺ são importantes para a sobrevivência a longo prazo do hospedeiro, agindo em sinergia para prevenir a reativação de cistos e reinfeções (Lüder e Rahman, 2017; Wang et al., 2019). Células T CD4⁺ irão auxiliar na resposta das células T CD8⁺ através da facilitação da apresentação de antígenos e supra-regulação de moléculas co-estimulatórias das DCs que

irão induzir a resposta das células T CD8⁺, auxiliando também no surgimento e replicação de células T CD8⁺ de memória (Khan, Hwang e Moretto, 2019). Dito isso, quando há a ruptura de cistos e liberação de taquizoítos, haverá o recrutamento de células T CD8⁺ e liberação de IFN- γ para controlar a replicação dos parasitas e eliminá-los (Cerutti, Blanchard e Besteiro, 2020).

Imunidade humoral também é importante para o controle da toxoplasmose, já que a infecção promove a produção de altos níveis de imunoglobulinas circulantes (IgA, IgE, IgM e IgG) e estas possuem funções de proteção através de diferentes mecanismos, tais como a opsonização dos parasitas para fagocitose, inibição da adesão do parasita nas células hospedeiras, bloqueio da invasão parasitária e ativação da via clássica do sistema complemento (Dupont, Christian e Hunter, 2012; Wang et al., 2019).

Enquanto o hospedeiro responde à infecção através de morte celular e produção de citocinas, alguns taquizoítos conseguem escapar e se disseminar pelo corpo do hospedeiro parasitando as células imunológicas, principalmente monócitos, que são capazes de atravessar as barreiras biológicas (Robert-Gangeneux e Dardé, 2012; Fisch, Clough e Fricke 2019; Melchor e Ewald, 2019).

Além disso, os parasitas possuem meios para evadir a resposta imunológica e são dependentes das proteínas das organelas secretórias (róptrias e grânulos densos), como por exemplo, ROP18 é capaz de fosforilar IGRs, modulados pela ROP5, formando um polímero que impedirá a ruptura do vacúolo parasitóforo, e a ROP16 é capaz de interferir na sinalização das células imunológicas, em particular através da fosforilação dos fatores de transcrição STAT3 e STAT6, o que leva a infra-regulação na produção de IL-12 por macrófagos e, conseqüentemente, infra-regulação na produção de IFN- γ (Robert-Gangeneux e Dardé, 2012; Betancourt et al., 2019).

Assim, os taquizoítos conseguem sobreviver e logo se transformar em bradizoítos para escapar do sistema imune e, como não há evidência de inflamação ao redor dos cistos, estes se tornam invisíveis, o que aumenta a sobrevivência do parasita e o início da fase crônica no hospedeiro,

permanecendo soropositivos indefinidamente (Carruthers, 2002; Betancourt et al., 2019; Cerutti, Blanchard e Besteiro, 2020).

1.2.1. Antígenos excretados/secretados de *T. gondii*

Durante a infecção, o parasita libera no lúmen numerosas moléculas denominadas antígenos excretados/secretados de *T. gondii* (TgESAs) que ajudarão no processo de invasão e sobrevivência do parasita, através de imunomodulação, e podem ser os primeiros alvos do sistema imune do hospedeiro (Cesbron-Delauw e Capron, 1993; Saadtania et al., 2012).

TgESAs são altamente imunogênicos e se comportam como quimiocinas que levam a disfunção de DCs na resposta imune inata, inibem a supra-regulação de moléculas de MHC classe II e inibem a citocina pró-inflamatória TNF- α , o que leva a estabelecer um microambiente anti-inflamatório favorável à replicação do parasita (Diana et al., 2005; Leroux et al., 2015; Wang et al., 2017; Zhu et al., 2019).

Além disso, há a estimulação da resposta de células T e produção de anticorpos, modulando a imunidade protetora a longo prazo (Carruthers, 2002; Meira et al., 2008; Costa-Silva et al., 2012).

Recentemente, descobriu-se que TgESAs, essas moléculas imunomodulatórias parasita-específicas, as quais são liberadas no espaço extracelular, são transportadas por vesículas extracelulares (Bhatnagar et al., 2007; Barteneva, Maltsev e Vorobjev, 2013; Kuipers et al., 2018; Ramírez-Flores et al., 2019a).

1.3. Vesículas Extracelulares

Vesículas extracelulares (EVs) são definidas como partículas ou fragmentos membranosos que são liberadas naturalmente por praticamente todas as células eucarióticas e procarióticas (Szatanek et al., 2017; Théry et al., 2018; Anand et al., 2019).

EVs possuem uma camada fosfolipídica, similar à célula de origem, não conseguem se replicar, ou seja, não possuem núcleo funcional (Szatanek

et al., 2017; Théry et al., 2018) e são capazes de transportar diversas moléculas incluindo proteínas (citocinas, receptores, ou mesmo ligantes de receptores), ácidos nucleicos (DNA, mRNA e miRNA) e lipídeos durante sua formação, que se dá através de ativação ou estresse celular (Szatanek et al., 2017; Kao e Papoutsakis, 2019).

A biogênese de EVs consiste em diferentes processos que originam três estruturas distintas: exossomos, ectossomos ou microvesículas e corpos apoptóticos (Szatanek et al., 2017), sendo que uma única célula consegue secretar diferentes tipos de EVs ao mesmo tempo (Anand et al., 2019).

a. Exossomos

Exossomos são pequenas vesículas com diâmetro em torno de 40-100 nm e são liberadas através de corpos multivesiculares quando entram em fusão com a membrana plasmática da célula (Szatanek et al., 2017; Kalluri e LeBleu, 2020).

Inicialmente, endossomos são formados pela invaginação da membrana plasmática, passam pelo processo de maturação e se transformam em corpos multivesiculares, estes contêm uma população de vesículas intraluminais, que serão chamadas de exossomos quando liberadas no meio extracelular (Li X et al., 2019; Kalluri e LeBleu, 2020). Os corpos multivesiculares irão, então, serem transportados para lisossomos, os quais serão degradados ou irão se fundir com a membrana plasmática da célula e liberar os exossomos no meio extracelular, sem haver sinalização de processos apoptóticos ou necróticos (Deolindo, Evans-Osses e Ramirez, 2013; Li X et al., 2019; Kalluri e LeBleu, 2020).

Essas vesículas possuem principalmente proteínas derivadas da célula de origem enriquecidas por histonas, proteínas MHC de classe I e II, proteínas de choque térmico (*heat-shock*) e tetraspaninas, além de ácidos nucleicos e lipídeos (Deolindo, Evans-Osses e Ramirez 2013; Raposo e Stoorvogel, 2013).

b. Microvesículas (ectossomos)

Microvesículas se originam de um brotamento da membrana plasmática da célula de origem, mecanismo dependente de Ca^{2+} , e isso define a composição molecular da vesícula, pela incorporação seletiva de proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos, conferindo maior heterogeneidade em comparação aos exossomos, e seu diâmetro pode variar entre 100 nm e 1 μm (Szatanek et al., 2017; Li X et al., 2019; Kalluri e LeBleu, 2020).

Dependendo da origem da célula e o estímulo, essas vesículas podem conter diferentes proporções de fosfolipídios e lipídios bioativos, RNAs (mRNA e miRNA), enzimas e proteínas derivadas do citoplasma, além de citocinas e receptores característicos da célula de origem (Deolindo, Evans-Osses e Ramirez, 2013).

c. Corpos apoptóticos

Corpos apoptóticos são formados quando a célula entra em apoptose (morte celular programada), havendo desintegração da célula e formação de bolhas na membrana plasmática, a qual serão liberadas no meio extracelular como vesículas, sendo que o diâmetro das mesmas varia de 50 nm a 5 μm (Akers et al., 2013; Szatanek et al., 2017; Anand et al., 2019).

Uma vez que EVs são liberadas, essas se disseminam pelo organismo e podem ser encontradas em fluidos biológicos, tais como sangue, saliva, lágrima, urina, líquido cefalorraquidiano, linfa, líquido amniótico, leite materno, sêmen, líquido pleural, escarro (Akers et al., 2013; Szatanek et al., 2017; Wu et al., 2019).

1.3.1. Métodos para isolamento e caracterização de vesículas extracelulares

Sabendo que EVs podem transportar informações do estado fisiológico da célula de origem, técnicas foram desenvolvidas para detecção e caracterização das propriedades bioquímicas, moleculares e biofísicas das vesículas (Szatanek et al., 2017).

Tamanho, morfologia, concentração, origem celular e composição molecular (proteômica, lipidômica e genômica) podem ser usadas para caracterizar as EVs (Li X et al., 2019).

Diversas técnicas vêm sendo aplicadas para isolamento, detecção e caracterização de EVs, dentre elas é utilizado a microscopia eletrônica de transmissão, microscopia de força atômica e microscopia eletrônica de varredura, ultracentrifugação, cromatografia por exclusão de tamanho, imunoafinidade, separação por gradiente de densidade e sistemas microfluídicos, citometria de fluxo e análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) (Van der Pol 2014, Szatanek et al., 2017; Li X et al., 2019; de Souza e Barrias, 2020). Além disso, vêm sendo usado para isolamento das vesículas métodos como filtração seriada e métodos imunológicos, como ELISA, utilizando anticorpos conjugados com *beads* magnéticos específicos para detectar proteínas ancoradas nas EVs (Akers et al., 2013).

Considerando que exossomos são pequenos e de baixa densidade, a ultracentrifugação é a mais usada como método de isolamento dessas vesículas e, para a análise de proteínas e ácidos nucleicos, espectrometria de massa vem sendo empregada para caracterizar o conteúdo das vesículas (de Souza e Barrias, 2020). *Western blotting* também é usado para caracterização das proteínas presentes nas EVs, além de demonstrar a integridade das moléculas proteicas (Akers et al., 2013).

Sabendo que EVs são capazes transportar proteínas e material genético para o meio extracelular e que podem ser encontrados em fluidos biológicos, estas se tornam potenciais biomarcadores em diagnósticos (Akers et al., 2013; Coakley Maizels e Buck, 2015; Li X et al., 2019). Diversos ensaios foram desenvolvidos para se testar os potenciais biomarcadores, tais como ensaios de tipagem proteica, ensaios de expressão gênica e sequenciamento do material genético das EVs (Akers et al., 2013).

Além disso, estratégias terapêuticas utilizando EVs estão sendo estudadas, já que podem ser veículos para fármacos/genes específicos a um determinado alvo, dado que são biocompatíveis, possuem alta estabilidade e

são eficazes na transferência de seu conteúdo para a célula alvo (Akers et al., 2013; Coakley, Maizels e Buck, 2015; de Souza e Barrias, 2020).

1.3.2. Comunicação entre as células

EVs são mediadores importantes para a comunicação intercelular, ou seja, as células irão usar EVs e seus conteúdos para comunicar entre si através de contato direto de receptores específicos ou mesmo por transferência de material genético, proteínas e lipídeos (Coakley, Maizels e Buck, 2015), participando na regulação de diversos processos biológicos, desde homeostase de populações celulares a atividades imunológicas e metabólicas e até em processos patogênicos (Deolindo, Evans-Osses e Ramirez, 2013; Kao e Papoutsakis, 2019; Kalluri e LeBleu, 2020).

A comunicação intercelular se dá tanto pela interação direta entre a membrana proteica da EV e o respectivo receptor da célula ou mesmo por endocitose e fusão da membrana da EV e, conseqüente, internalização do conteúdo pela célula receptora (figura 6) (Raposo e Stoorvogel, 2013; Akers et al., 2013; Kao e Papoutsakis, 2019).

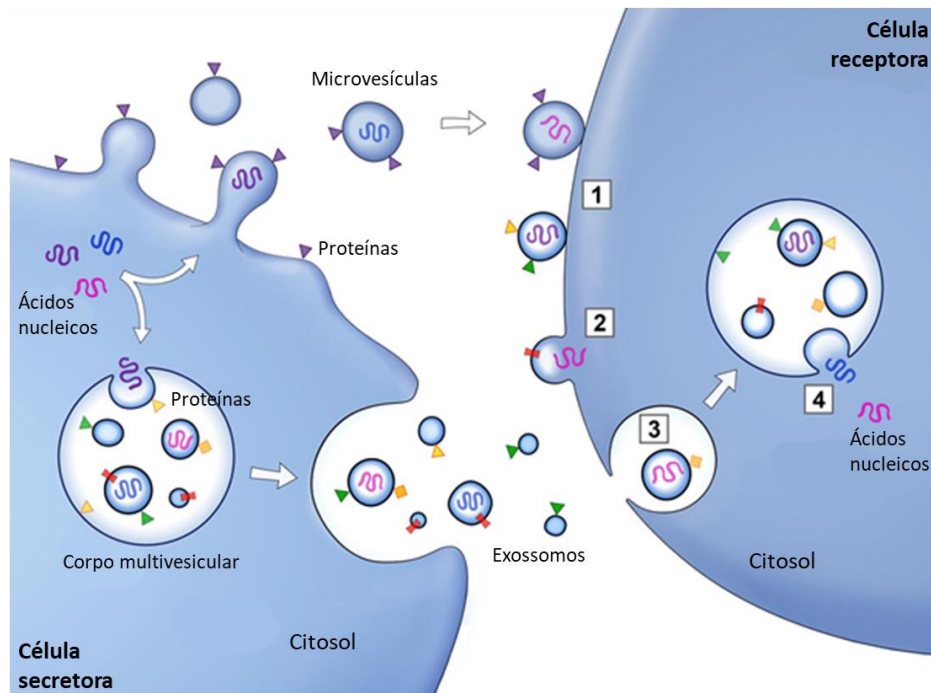


Figura 6. Figura esquemática da transferência de proteínas e ácidos nucleicos por EVs. Proteínas e ácidos nucleicos são selecionados e incorporados em vesículas intraluminais dos corpos multivesiculares ou mesmo nos brotamentos da membrana plasmática, que formarão as microvesículas. Os corpos multivesiculares se fundem à membrana plasmática e liberam os exossomos no meio extracelular. EVs irão entrar em contato com a célula receptora (1) e podem ser incorporadas à membrana plasmática (2) ou serem endocitadas (3). Vesículas endocitadas se juntam à membrana plasmática da célula receptora e formam endossomos (4). Ambas as formas resultam na liberação das moléculas presentes nas EVs no citosol da célula receptora. Fonte: adaptado de Raposo e Stoorvogel (2013).

Apesar disso, EVs não interagem com qualquer célula que venham a entrar em contato quando estiverem navegando no meio extracelular, as vesículas possuem receptores específicos de reconhecimento celular, fazendo com que interajam exclusivamente com a célula receptora para a qual elas foram designadas a interagir, como, por exemplo, vesículas provenientes de plaquetas vão interagir com macrófagos e células endoteliais, mas não com neutrófilos, porém vesículas de neutrófilos podem interagir com plaquetas, macrófagos e DCs (Cocucci, Racchetti e Meldolesi, 2009).

Estudos mostram que EVs participam de diferentes modos em patologias, incluindo o câncer (Mantel e Marti, 2014; Coakley, Maizels e Buck, 2015). Tumores secretam vesículas contendo fatores carcinogênicos que se relacionam com o estabelecimento e progressão do tumor nos tecidos subjacentes (Deolindo, Evans-Osses e Ramirez, 2013; Coakley, Maizels e Buck 2015; Tai et al., 2019) e há evidências que estão envolvidos na angiogênese para progressão tumoral e migração de células tumorais em metástases (Raposo e Stoorvogel 2013; Tai et al., 2019), além da descoberta de certos tipos de câncer estarem associados ao transporte de miRNA pelas vesículas (Szatanek et al., 2017; Tai et al., 2019).

Enquanto a maioria dos estudos disponíveis estão focados em oncologia, mais e mais estudos estão sendo feitos na área de doenças infecciosas, já que se descobriu um papel importante das EVs na patogênese dessas doenças (Coakley, Maizels e Buck, 2015).

1.3.3. Infecções parasitárias

Nos últimos 20 anos, diversos estudos foram publicados mostrando a liberação de EVs no meio extracelular por parasitas, porém ainda não se sabia a importância dessas vesículas, contudo, com avanços na pesquisa, hoje é largamente aceito como um fenômeno que possui um significado patológico (Torrecilhas et al., 2012; Kuipers et al., 2018).

Há cerca de 50 anos, a liberação de EVs foi descoberta em estudos com bactérias gram-negativas, *Vibrio cholerae* e *Neisseria meningitidis*, além de estudos com fungos *Cryptococcus neoformans* e parasitas como *Schistosoma mansoni* e *Fasciola hepatica* (Kuipers et al., 2018). Inicialmente, achava-se que EVs eram artefatos, até que em estudos mais aprofundados com bactérias gram-negativas descobriu-se que EVs liberadas pelas bactérias aumentavam sua sobrevivência, assim como participavam na formação de biofilmes e faziam transferência de DNA para outras bactérias, compartilhando genes envolvidos na resistência de antibióticos (Kuipers et al., 2018).

Já na última década, estudos conseguiram evidenciar a produção e função de EVs em bactérias gram-positivas, fungos, parasitas, como *Trypanosoma* sp., *Giardia intestinalis*, *Leishmania* sp., *Plasmodium* sp. e *Acanthamoeba castellanii* (Deolindo, Evans-Osses e Ramirez, 2013; Kuipers et al., 2018).

A partir desses estudos, descobriu-se que EVs de parasitas exercem um papel importante em hospedeiros infectados, já que possuem antígenos parasita-específicos importantes na superfície (proteínas excretadas/secretadas - ESAs) que se relacionam com fatores de virulência (toxinas, proteases, adesinas) e com a patogênese, participando na modulação do sistema imunológico do hospedeiro (resposta pró-inflamatória) e disseminação do parasita (Torrecilhas et al., 2012; Berteneva, Maltsev e Vorobjev, 2013, Szempruch et al., 2016).

Em geral, é possível distinguir três tipos de liberação de EVs em infecções: EVs liberadas exclusivamente por parasitas, EVs oriundas das células do hospedeiro que foram estimuladas por EVs do parasita, e EVs das células do hospedeiro infectadas (Mantel e Marti, 2014; Wu et al., 2019).

EVs liberadas pelo parasita contêm informações do mesmo (proteínas, ácidos nucleicos) que serão transferidas às células hospedeiras que irão ajudá-lo a modular e escapar do sistema imunológico e assim promover a infecção, por outro lado, EVs liberadas pelas células infectadas, seja pelo estresse da infecção parasitária, irão ativar células do sistema imunológico (macrófagos, células NK, monócitos, células T e B) que irão promover uma resposta imune contra o parasita (Coakley, Maizels e Buck, 2015; Wu et al., 2019).

A principal função das EVs de parasitas é conseguir estabelecer comunicação entre os parasitas e com as células do hospedeiro e, na maioria das vezes, beneficiar-se da interação com o hospedeiro e aumentar sua sobrevivência, conseguindo escapar da resposta imunológica e contribuir na dispersão de fatores de virulência, mas também poderá facilitar a indução de respostas imunes do hospedeiro contra o parasita (figura 7) (Mantel e Marti, 2014; Kuipers et al., 2018).

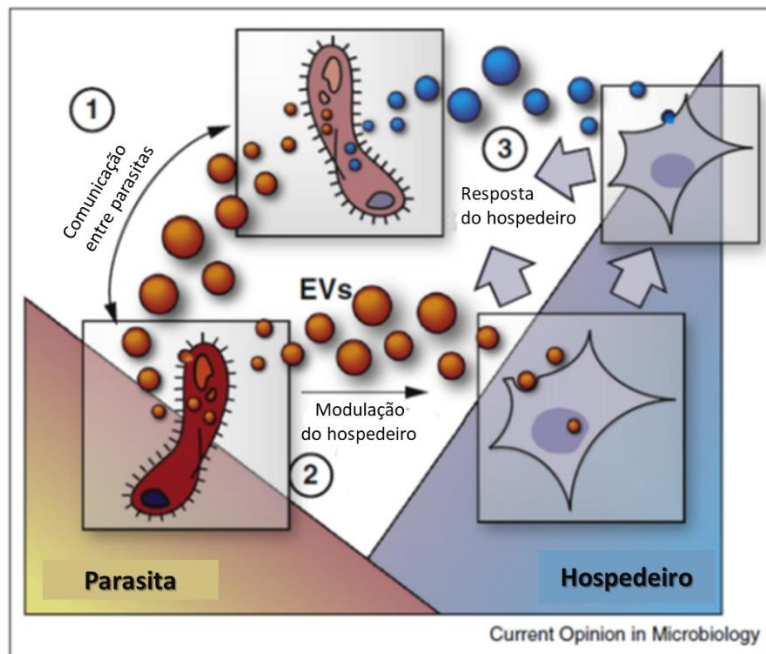


Figura 7. Figura esquemática dos meios de comunicação intracelular mediada por EVs. (1) Comunicação entre os parasitas – EVs podem regular o comportamento da população parasitária e realizar trocas entre si de fatores de virulência (*Trypanosoma brucei*) ou mesmo fatores de resistência de fármacos (*Plasmodium falciparum*). (2) Comunicação entre parasita-hospedeiro – EVs conseguem modular a resposta imunológica do hospedeiro através da ativação/supressão de respostas inflamatórias, ou mesmo induzir respostas do hospedeiro que facilitam alguns aspectos fenotípicos do parasita, como aumentar a aderência da célula hospedeira (*Trichomonas vaginalis*) ou mesmo induzir a proliferação celular, ajudando no crescimento e replicação de parasitas intestinais. (3) Resposta do hospedeiro – parasitas induzem a produção de EVs pela célula hospedeira, os quais conseguem tanto promover quanto suprimir a infecção, por exemplo, EVs derivadas de plaquetas e células endoteliais promovem a infecção por *Plasmodium* sp. e EVs derivadas de células epiteliais contém propriedades antimicrobianas contra infecção por *Cryptosporidium parvum*. Fonte: Adaptado de Marti e Johnson (2016).

Sendo assim, EVs conseguem estimular a célula hospedeira e, assim, transportar moléculas (proteínas, lipídeos, polissacarídeos ou RNAs) para o

seu interior e modificar sua função ou mesmo induzir apoptose (Deolindo, Evans-Osses e Buck, 2013; Kuipers et al., 2018), tal qual a transferência de miRNAs do parasita (ou hospedeiro) é capaz de modificar a expressão gênica da célula hospedeira, ou mesmo a transferência de proteínas contendo fatores de virulência são capazes de evadir o sistema imune inato do hospedeiro, ou mesmo causar citotoxicidade e induzir resposta pró-inflamatória (Marti e Johnson, 2016; Kuipers et al., 2018).

Foi demonstrado, por exemplo, que vesículas podem ser internalizadas pelas células do hospedeiro, sendo então processadas e, assim, conseguir apresentar os antígenos na forma de complexos MHC, provocando uma resposta imunológica antiparasitária, envolvendo-se na imunopatogênese do hospedeiro (Deolindo, Evans-Osses e Buck, 2013).

Diversas infecções parasitárias levam a um aumento da concentração de EVs nos fluidos biológicos de hospedeiros infectados, podendo ter influência na regulação fisiológica e progressão da doença (Mantel e Marti, 2014; da Cruz et al., 2020), diante disso, as moléculas transportadas pelas EVs dos parasitas podem ser potenciais biomarcadores da doença e ter aplicações terapêuticas, como, por exemplo, a detecção de miRNA associado às EVs de *Schistosoma mansoni* no soro de pacientes infectados como sendo um biomarcador para o diagnóstico da doença ou mesmo a descoberta de novos fármacos que têm como alvo a fusão das EVs de *Trypanosoma* sp. aos eritrócitos do paciente para se evitar casos de anemia (Kuipers et al., 2018; Wu et al., 2019).

1.3.4. EVs de *T. gondii*

Apesar de não haver muitos estudos disponíveis sobre EVs de *T. gondii*, recentemente conseguiu-se isolar e identificar EVs liberadas pelo parasita através de microscopia eletrônica (figura 8), NTA e *Western Blotting* (Li Y et al., 2018a; Silva et al., 2018; de Souza e Barrias, 2020). Além disso, demonstrou-se que taquizoítos são capazes de liberar vesículas da membrana plasmática, anel apical e poro posterior, e o tamanho das EVs

identificadas foram de aproximadamente 50-100 nm (exossomos) e 200 nm (microvesículas) (Ramírez-Flores et al., 2019a; Ramírez-Flores et al., 2019b).

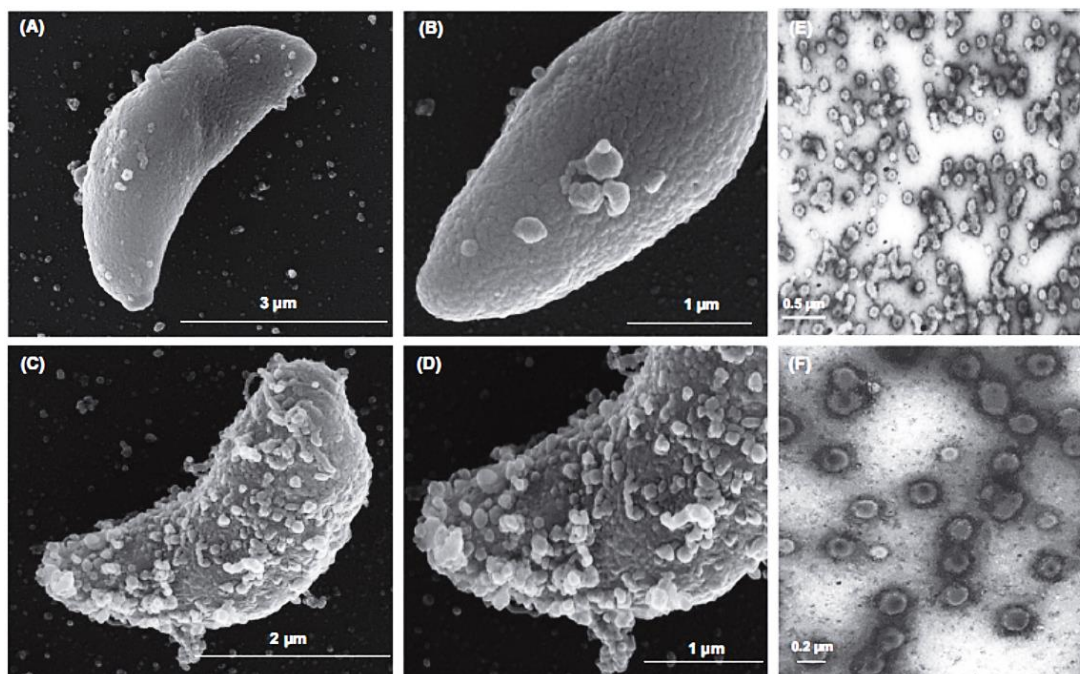


Figura 8. Microscopia eletrônica de varredura demonstrando a liberação de EVs por taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH. (A) e (B) mostram a membrana do parasita liberando numerosas EVs depois de incubados em meio de cultura por 2 horas, já (C) e (D) mostram o aumento da liberação de EVs depois de 24 horas de incubação. (E) e (F) demonstram, através de microscopia eletrônica de transmissão, as EVs liberadas pelos taquizoítos após serem purificadas pela técnica de cromatografia por exclusão de tamanho. Fonte: Silva et al. (2018).

Wowk et al. (2017) foi o primeiro a descrever o perfil proteômico dos exossomos liberados por taquizoítos isolados de cultura de células. Demonstrou as diversas proteínas exclusivas do parasita presentes nas EVs, mas ainda não se sabe exatamente quais as funções biológicas das vesículas de *T. gondii* no hospedeiro.

Estudos mostram, também, que altas concentrações de EVs do parasita conseguem diminuir a viabilidade de macrófagos do hospedeiro, porém, quando em contato com pequenas quantidades de EVs, pode haver a

estimulação da produção de citocinas pró-inflamatórias, levando à resposta do sistema imune inato e regulação da comunicação entre o parasita e células do hospedeiro (Li Y et al., 2018a; Li Y et al., 2018b).

Outros estudos sugerem que EVs de *T. gondii* podem servir como vacinas contra a toxoplasmose, já que EVs carregam antígenos específicos do parasita e podem ser apresentados para células APCs direta ou indiretamente, o que pode desencadear uma resposta imunológica caracterizada pelo equilíbrio de citocinas Th1/Th2, resultando na produção de anticorpos contra *T. gondii*, desencadeando a imunidade protetora contra a infecção (Torrecilhas et al., 2012; Długońska e Gatkowska, 2016; Wu et al., 2019).

Além do mais, mostrou-se que EVs podem influenciar a proliferação e ciclo de vida das células do hospedeiro e vários miRNAs exossomais estão envolvidos na regulação de genes-alvo ligados à divisão celular, relacionando-se aos mecanismos de patogênese do parasita no hospedeiro (Długońska e Gatkowska, 2016).

1.4. microRNAs

microRNAs (miRNA) fazem parte dos RNAs não-codificadores, os quais não codificam proteínas, porém participam da manutenção do genoma e regulação da expressão gênica de cerca de 60% dos genes codificadores de proteínas em humanos (Ghalehnoei et al., 2019; Acuña, Floeter-Winter e Muxel, 2020).

São ácidos nucleicos de fita simples com aproximadamente 18-24 nucleotídeos que interagem com a região não-codificante 3' (3' UTR) do RNA mensageiro (mRNA), o que leva à degradação ou mesmo à inibição da transcrição e tradução do mRNA em proteínas, sendo importante para a regulação da expressão gênica (Cai e Shen, 2016; Ghalehnoei et al., 2019; Acuña, Floeter-Winter e Muxel, 2020).

A síntese de miRNA é um processo com diversas etapas. Primeiramente, genes do miRNA são transcritos pela RNA polimerase II em

transcritos primários de miRNA (pri-miRNA) de dupla-fita, contendo centenas de nucleotídeos. No núcleo, pri-miRNA será clivado pelo complexo ribonuclease nuclear III (DROSHA) e DGCR8 (proteína ligante de RNA dupla-fita, também conhecido como PASHA) dando origem ao precursor de miRNA (pre-miRNA), com aproximadamente 70 nucleotídeos e com formato de grampo. Em seguida, pre-miRNA é exportado para o citoplasma através da proteína exportina-5. A enzima RNase III (DICER) irá, então, reconhecer a forma do pre-miRNA e o clivar em pequenas moléculas dupla-fita de miRNAs, e estas serão convertidas em fitas simples, através de enzimas helicases, formando o miRNA maduro (Cai e Shen, 2016; Ghalehnoei et al., 2019; Acuña, Floeter-Winter e Muxel, 2020).

Depois de pronto, o miRNA poderá se ligar ao complexo ribonucleoproteico da proteína argonauta e o complexo silenciador induzido por RNA (RISC) e irá interagir com o mRNA alvo, levando à regulação da expressão gênica (Cai e Shen, 2016; Ghalehnoei et al., 2019; Acuña, Floeter-Winter e Muxel, 2020).

Diversos estudos mostram a importância dos miRNAs como mediadores na imunidade inata e adaptativa, controlando a diferenciação e função das células imunológicas, tais como através da ativação de macrófagos, células dendríticas e células NK, além do controle no desenvolvimento de células B e T, limitação da diferenciação de células Th1 e auxílio na produção de anticorpos de alta afinidade (Ghalehnoei et al., 2019; Khan, Hwang e Moretto, 2019).

O envolvimento de miRNA em diferentes processos biológicos, tais como doenças crônicas ou doenças infecciosas, demonstram a complexidade na interação simultânea com diversas moléculas controlando diferentes aspectos da expressão gênica (Acuña, Floeter-Winter e Muxel, 2020). Diferentes estudos mostram que miRNAs são expressos de diversas maneiras em pacientes com hepatotoxicidade (Ozer et al., 2008), doenças cardiovasculares (Contu, Latronico e Codorelli, 2010) e doenças infecciosas (Fu et al., 2011; Reynoso et al., 2014), o que o torna um potencial biomarcador para essas patologias (Acuña, Floeter-Winter e Muxel, 2020).

Além disso, miRNAs são encontrados em EVs e medeiam a comunicação entre as células, já que as EVs protegem os miRNA de serem degradados no meio extracelular até chegarem na célula alvo, o que o classifica, também, como potencial biomarcador, pois as EVs podem refletir o estado da célula que as originaram (Akers et al., 2015; Bayer-Santos, Marini e da Silveira, 2017; Jun, Yang e Zhisu, 2019; Acuña, Floeter-Winter e Muxel, 2020).

Em infecções parasitárias, a identificação de diferentes miRNAs tem se tornado útil para se estudar a patogênese de muitas espécies de protozoários como *Cryptosporidium* sp., *Plasmodium* sp. e *T. gondii*, além de ajudar no diagnóstico e monitoramento da progressão das doenças que esses parasitas causam (Judice et al., 2016).

Uma vez dentro do hospedeiro, os parasitas conseguem regular a expressão gênica das células do hospedeiro, ou seja, modificam a expressão de diferentes miRNAs da célula, induzido pelo parasita ou em resposta aos mecanismos de defesa do hospedeiro, para aumentar sua habilidade de infectar e se proliferar dentro das células-alvo, tais como células epiteliais, hepatócitos, hemácias e, para alguns parasitas, células do sistema imune, macrófagos e células dendríticas, através da inibição da resposta imunológica envolvidas na apoptose e produção de citocinas (Judice et al., 2016; Bayer-Santos, Marini e da Silveira, 2017).

T. gondii desenvolveu mecanismos sofisticados para sobreviver e estabelecer a infecção no hospedeiro depois do processo de invasão e um exemplo disso é sua habilidade em modificar miRNAs importantes do hospedeiro sendo capaz de alterar os genes associados com o sistema imunológico do mesmo, já que miRNAs são importantes para o bom funcionamento das células do sistema imune (Cai e Shen, 2016; Judice et al., 2016).

O parasita necessita de miRNAs específicos para eficientemente se replicar e conseguir manipular os meios de sinalização de infecção do hospedeiro, a exemplo disso é a capacidade de cistos teciduais e taquizoítos em alterar a expressão de miRNA no cérebro e baço do hospedeiro para

progredir com a infecção (Zeiner e Boothroyd, 2010; Xu et al., 2013; Hu et al., 2018; Khan, Hwang e Moretto, 2019).

Além disso, estudos mostram que o parasita consegue modular a expressão gênica do hospedeiro de modo que, em 24 horas após a infecção, há um aumento de 15% da expressão de genes do parasita na célula infectada e, como consequência, grande parte da produção de proteínas do hospedeiro é mediada pela expressão gênica provocada pelo *T. gondii* (Zeiner e Boothroyd, 2010; Zeiner et al., 2010).

Assim sendo, *T. gondii* é capaz de modificar o perfil genético dos miRNAs do hospedeiro de modo a alterar a resposta à infecção a favor do parasita (Acuña, Floeter-Winter e Muxel, 2020).

1.5. Justificativa

Diante do levantamento bibliográfico relatado acima, atualmente pouco se conhece a participação de EVs na relação *T. gondii* e seus hospedeiros e a relevância na patofisiologia da toxoplasmose, logo, este estudo pretende caracterizar a produção de EVs de três cepas de *T. gondii* e investigar a participação dessas vesículas no sistema imunológico de hospedeiros.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Investigar se há diferenciação na produção de vesículas extracelulares (EVs) produzidas por três cepas de *Toxoplasma gondii* e a participação destas vesículas na resposta imune de hospedeiros infectados.

2.2. Objetivos Específicos

- Estimular a produção de EVs de taquizoítos adaptados às culturas celulares de três cepas de *T. gondii*;
- Padronizar a metodologia de purificação e concentração de EVs;
- Comparar a produção e caracterização de EVs de cada cepa;
- Investigar se taquizoítos e EVs por eles liberadas possuem o mesmo perfil de expressão de miRNAs presentes em hospedeiros infectados;
- Investigar a capacidade de EVs de cada cepa em estimular o sistema imune do hospedeiro infectado;
- Determinar, por *Immunoblot*, anticorpos anti-EVs em pacientes com toxoplasmose;
- Investigar se EVs de *T. gondii* estimulam a produção *in vitro* de citocinas por esplenócitos de camundongos.

3. Metodologia

3.1. Considerações éticas

Este estudo foi realizado de acordo com as recomendações da: (i) “Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Adolfo Lutz (CEUA-IAL)” e “Conselho Nacional de Controle de Experimentação (CONCEA)”. Ambos os Comitês aprovaram este estudo sob o requerimento nº 01/2018. Todos os camundongos utilizados nos experimentos foram obtidos e mantidos no Centro de Laboratório de Animais e Experimentação do Instituto Adolfo Lutz. (ii) Comitê de Ética Humana do Instituto Adolfo Lutz e Plataforma Brasil, que aprovou este estudo sob o número CONEP-IAL/SES: 185705.

3.2. Manutenção das cepas de *T. gondii* em camundongos

As três cepas foram mantidas em camundongos isogênicos da linhagem AS/n, com idade entre 25 e 30 dias, no biotério de experimentação do Instituto Adolfo Lutz.

A cepa RH foi mantida semanalmente por inóculos intraperitoneais com 1×10^5 taquizoítos/animal e, após quatro dias de infecção, os animais foram submetidos a eutanásia e faz-se lavagens intraperitoneais com 5 mL de NaCl 0,85% estéril. Os lavados foram centrifugados durante 10 minutos a 3.000 rpm e os parasitas quantificados em câmara de Neubauer para cálculo e obtenção da concentração desejada. Os taquizoítos obtidos dos lavados intraperitoneais foram posteriormente utilizados para a manutenção da cepa em cultura de células e obtenção de antígeno para os testes sorológicos.

As cepas cistogênicas ME-49 e VEG foram mantidas por passagens seriadas, com intervalos de 30 a 45 dias, com inóculos orais contendo 10 cistos/animal. A suspensão usada é proveniente de macerado de células cerebrais em 5 mL de NaCl 0,85% de animais infectados com a respectiva cepa e, antes de fazer o inóculo, os cistos são quantificados por microscopia óptica (400X) entre lâmina e lamínula utilizando 10 µL da suspensão cerebral.

Como as cepas ME-49 e VEG são cisotogênicas e não há taquizoítos circulantes na corrente sanguínea do camundongo, como ocorre com a cepa RH, foi necessário imunossuprimir os camundongos previamente para extrair os taquizoítos e adaptá-los na cultura em células. Para isso, camundongos da linhagem AS/n foram imunossuprimidos com 15 mg/L de dexametasona, a qual foi adicionada na água do bebedouro dos animais, durante cinco dias. A seguir, os animais foram infectados por via oral com cistos provenientes de outros animais infectados, utilizando a mesma técnica mencionada acima. Os camundongos foram observados diariamente e, em cerca de sete dias, apresentaram a condição física da fase aguda. Então, os animais foram submetidos a eutanásia, os cistos foram retirados, em condições assépticas, do cérebro dos animais e macerados com solução fisiológica tamponada (PBS) pH 7,2 estéril, e os taquizoítos foram extraídos de lavados do peritônio utilizando PBS estéril. Os lavados intraperitoneais foram imediatamente inoculados na cultura de células. Já o macerado cerebral foi centrifugado a 2.000 rpm durante 1 minuto e incubado a 37 °C em estufa de CO₂ a 5% por 10 minutos. Após isso, o sobrenadante e o sedimento foram inoculados em cultura de células separadamente. O acompanhamento da infecção nas culturas de células foi observado rotineiramente por, no mínimo, 60 dias, até as culturas apresentar intensa infecção, produzindo grande quantidade de taquizoítos.

3.3. Cultura de células VERO

As culturas de células VERO foram mantidas em garrafas de cultura de 75 cm² contendo 5 mL de meio 199 suplementado com 2,5 µg/mL de gentamicina e 10% de soro fetal bovino (SFB) em pH 7,2 e acondicionadas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂.

Para o repique de células, o meio contido na garrafa foi desprezado e as células mantidas neste meio foram lavadas uma vez com 1 mL de 0,25% de tripsina/EDTA, depois adicionado uma nova alíquota de tripsina e foi incubado durante cinco minutos à temperatura ambiente para a desafixação

das células da parede da garrafa. Subseqüentemente, uma nova alíquota do meio 199 foi adicionada às células e estas contadas em câmara de Neubauer. Após a contagem, alíquotas de 1 mL das células foram distribuídas em novas garrafas de cultivo e acrescentado 5 mL de meio 199 suplementado para o crescimento das mesmas.

Os repiques foram feitos a cada 3-4 dias e mantidos a 37 °C em estufa de CO₂ a 5%. As células foram observadas diariamente, utilizando um microscópio invertido, até a completa formação da monocamada celular.

3.4. Manutenção de cepas de *T. gondii* em cultura de células VERO

Taquizoítos das cepas RH, ME-49 ou VEG foram transferidos dos camundongos para as culturas de células, como descrito anteriormente. Após a adaptação dos parasitas, a manutenção dos mesmos foi realizada em garrafas contendo as células VERO infectadas com 1×10^7 taquizoítos de cada cepa proveniente de outra garrafa e mantidas a 37 °C em estufa de CO₂ a 5%. As culturas foram observadas diariamente, com auxílio do microscópio invertido, até a completa lise das células e liberação dos taquizoítos no meio de cultura.

Os parasitas liberados no sobrenadante das culturas foram recolhidos em tubos cônicos de 15 mL e centrifugados a 400 rpm durante 10 minutos, para remover os restos celulares. O sobrenadante, contendo os parasitas, foi transferido para tubos novos e centrifugados a 3.000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento, contendo os parasitas, foi ressuspenso em 5 mL de PBS estéril. Para eliminar completamente o meio de cultura, a suspensão foi lavada (três vezes) com 5 mL de PBS estéril e centrifugada a 3.000 rpm por 10 minutos. A seguir, o sedimento foi ressuspenso com 1 mL de meio RPMI 1640 livre de SFB, 10 µL foi retirado da suspensão para estimar o número de parasitas utilizando a câmara de Neubauer e o restante foi utilizado tanto para infectar novas garrafas de cultura de células quanto para a produção de EVs.

3.5. Produção de antígeno lisado de taquizoítos (ALT) da cepa RH de *T. gondii*

A produção e purificação de ALT foi realizada como descrito previamente por MEIRA et al., 2008. Taquizoítos da cepa RH foram coletados de lavados intraperitoneais de camundongos infectados e centrifugados a 400 rpm durante 10 minutos para retirar células do peritônio do animal. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos para concentrar os parasitas. Esse procedimento foi repetido por pelo menos 10 vezes até obter uma grande quantidade de taquizoítos. A seguir, o sedimento contendo os parasitas foi ressuspenso com 2 mL de PBS estéril e filtrado (filtro com poros de 3,0 μm). Observou-se no microscópio (400X) se ainda havia presença de células do animal entre os parasitas e prosseguiu-se. Para que ocorresse a lise da membrana plasmática dos parasitas, a suspensão foi transferida para tubos de 1,5 mL contendo pérolas disruptoras (*beads*) de 150:212 μm e utilizou-se o disruptor de membrana TissueLyser LT[®] (Qiagen, Hilden, Alemanha), com 8 ciclos de 4 minutos (50 oscilações/segundo) e intervalos de 2 minutos entre os ciclos. Para a completa lise dos parasitas, a suspensão foi tratada por ultrassom (Eco-Sonics[®], Ultronique, São Paulo, Brasil) com 3 ciclos a 40 A/minuto, durante 5 minutos e 1 minuto de intervalo. Após a certificação da lise dos parasitas por microscopia óptica, o antígeno lisado foi dissolvido em NaCl 0,3 M e a concentração proteica determinada por espectrofotômetro NanoDrop[®] ND 100 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). A seguir, a concentração foi ajustada para 1 $\mu\text{g/mL}$ e as alíquotas estocadas a -70 °C para o uso.

O ALT foi utilizado para realizar o ELISA, para o diagnóstico sorológico das amostras clínicas, e como controle positivo nos procedimentos de análise das EVs de *T. gondii*.

3.6. Diagnóstico sorológico da toxoplasmose em soros humanos e murinos

Para este estudo foram utilizados 18 soros humanos e três soros murinos provenientes da soroteca de Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas e Fungos do Instituto Adolfo Lutz.

O diagnóstico sorológico da toxoplasmose foi realizado conforme descrito previamente (Colombo et al., 2005). Utilizou-se placas de poliestireno com 96 orifícios *medium-binding* serão sensibilizadas com 50 µL de ALT (1,5 µg/mL tampão bicarbonato de sódio) e incubados a 4 °C por 18 horas. Em cada placa foi incluído dois controles (positivo e negativo) e o branco (sem antígeno). Após esse período, foram feitas duas lavagens com solução de PBS-Tween 20 0,05% e a placa foi bloqueada com solução de PBS-leite desnatado 5% (200 µL/orifício) por 60 minutos a 37 °C. A seguir, a placa foi novamente lavada (cinco vezes) com solução de PBS-Tween 20 0,05%. A seguir foram adicionados os soros humanos e soros murinos diluídos 1:50 e 1:20, respectivamente, em PBS-leite desnatado 5% (50 µL/orifício) e incubados por 60 minutos a 37 °C. Após cinco lavagens com PBS-Tween 20 0,05%, adicionou-se aos poços 50 µL de um segundo anticorpo anti-humano IgG conjugado com peroxidase e anti-camundongo conjugado a peroxidase diluídos 1:20.000 e 1:1000 respectivamente, diluído em solução de PBS-leite desnatado 5% e incubados por mais 60 minutos a 37 °C. Após um novo ciclo de cinco lavagens com PBS-Tween 20 0,05%, adicionou-se 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) para a revelação da reação. 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.

Todas as amostras foram testadas em duplicata e a absorbância foi medida por um espectrofotômetro usando comprimento de onda de 492 nm. Os resultados foram determinados após a análise de 50 soros para determinação do *cut-off* da reação das amostras humanas realizado previamente na rotina diagnóstica do Laboratório.

3.7. Recuperação e purificação de EVs de *T. gondii*

3.7.1. Recuperação de EVs de *T. gondii* em cultura de células

As EVs foram purificadas a partir de sobrenadantes de culturas de células VERO contendo taquizoítos, como descrito anteriormente por Silva et al. (2018).

Os parasitas foram contados e lavados (três vezes) com PBS estéril a 3.000 rpm durante 10 minutos. Esta etapa foi realizada para separar os taquizoítos das células hospedeiras e garantir a purificação de EVs apenas dos parasitas e não das células VERO. A seguir, os parasitas foram concentrados em 1 mL de meio RPMI 1640 sem SFB. Para que a liberação de EVs, os parasitas foram incubados durante 2 horas a 37 °C em estufa de CO₂ a 5%. Ao final da incubação, a suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 3.000 rpm e o sobrenadante filtrado utilizando membrana de 0,22 µm, para a purificar as EVs. A seguir, a solução foi estocada a -20 °C até o momento do uso.

3.7.2. Cromatografia por exclusão de tamanho

As purificações foram realizadas separadamente para as três cepas estudadas. Para um bom rendimento, o produto excretado a ser passado pela coluna de afinidade deve ser de no mínimo 1×10^8 - 1×10^{10} taquizoítos. EVs foram purificados em uma coluna de Sepharose® CL-4B (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) pré-equilibrada com 100 mM de acetato de amônio, pH 6,5, e, então, concentradas em centrífuga a vácuo Speed Vaccum miVac SpeedTrap® (Genevac, SP Scientific, Pennsylvania, EUA).

A coluna de cromatografia (1 x 30 cm) foi montada com cerca de 20 g de resina (Sepharose® CL-4B - Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) dissolvida e equilibrada com 10 mM de acetato de amônio, pH 6,5. Após a passagem dos filtrados de *T. gondii*, a eluição foi realizada com o mesmo tampão num fluxo contínuo de 20 mL/hora, com auxílio de uma bomba peristáltica

(Pharmacia®). Em cada purificação, cerca de 20 frações de 1 mL foram recolhidas a cada purificação.

3.7.3. ELISA para seleção das frações de EVs purificadas

Após a purificação de EVs por cromatografia, foi realizada a seleção das frações contendo EVs por ELISA. As placas de poliestireno *medium-binding* com 96 orifícios foram sensibilizadas com 50 µL de cada fração recolhida na coluna de afinidade e incubados a 4 °C por 18 horas. Após as lavagens e bloqueio das placas, como descrito no item 3.6 (diagnóstico sorológico) foram adicionados em cada orifício 50 µL de um *pool* de cinco soros humanos positivos para toxoplasmose diluído 1:50 em PBS-leite desnatado 5%. Após a incubação das placas por 60 minutos a 37 °C e cinco lavagens com PBS-Tween 20 0,05% foram adicionados aos poços, 50 µL do segundo anticorpo anti-humano IgG conjugado à peroxidase diluído em solução de PBS-leite desnatado 5% (1:20.000). A seguir, procedeu-se a incubação por 60 minutos a 37 °C e um novo ciclo de cinco lavagens com PBS-Tween 20 0,05%. A reação enzimática e leituras foram realizadas como descritas no item 3.6. Como controle, foram incluídos à reação um controle positivo (ALT - 1,5 µg/mL), um controle negativo (*pool* de cinco soros humanos negativo para toxoplasmose diluído 1:50) e o branco (tampão acetato de amônio).

As frações que apresentaram densidade óptica (D.O.) maior que 0,7 foram agrupadas e concentradas em centrífuga a vácuo Speed Vacuum miVac SpeedTrap® (Genevac, SP Scientific, Pennsylvania, EUA) e ressuspensas em PBS para posterior análise.

3.7.4. Purificação de EVs por ultracentrifugação

EVs liberadas por taquizoítos foram alternativamente concentradas por ultracentrifugação. As amostras de EVs (1×10^8) foram transferidas para os tubos de 6 mL compatíveis com o rotor SW-55 da ultracentrífuga. Completou-

se o volume de 6 mL com PBS estéril. Os tubos foram pesados e igualados para ficarem com o mesmo peso para a centrifugação. Estes foram levados na ultracentrífuga Beckman® Coulter L8-80M Ultracentrifuge (Beckman Coulter, Inc., California, EUA) e centrifugados a 28.700 rpm durante 60 minutos a 25 °C. Após isso, o sobrenadante foi descartado e o sedimento, contendo EVs, foi ressuspenso com 200 µL de PBS estéril e acondicionado a -20 °C para posterior análise.

3.8. Análise estrutural de EVs

3.8.1. Determinação das concentrações e tamanho de EVs por *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA)

Concentrações (partículas/mL) e diâmetros (nm) das partículas de EVs foram determinadas por NTA usando o aparelho NanoSight® NS300 (Malvern Panalytical, Spectris, Surrey, Inglaterra) do Laboratório de Imunologia Clínica e Experimental da Disciplina de Nefrologia da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal do Estado de São Paulo.

As amostras de EVs foram diluídas 1:4 com PBS estéril e filtrado (para evitar a detecção de partículas de sais do tampão) e 500 µL de cada amostra foi injetada no aparelho para a leitura. O equipamento captura o movimento Browniano das partículas presentes na amostra. São realizadas três leituras por amostra e expressa o tamanho e dispersão de partículas/mL através de valores numéricos e gráficos.

3.8.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Com o intuito de verificar se a liberação de EVs poderia ser semelhante ou não nas três cepas de *T. gondii*, taquizoítos liberando EVs durante 2 horas foram analisados por MEV.

Taquizoítos (1×10^6) foram incubados em meio RPMI (1 mL) a 37 °C em estufa com 5% de CO₂, durante 2 horas para liberação das EVs. A seguir, os parasitas foram lavados duas vezes em PBS e aderidos em lamínulas

previamente revestidas com poli-L-lisina aquosa 0,1% (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) por 30 minutos em temperatura ambiente. Os parasitas foram fixados com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2), sacarose 0,146 M e CaCl₂ 5 mM durante 60 minutos em temperatura ambiente. Para a pós-fixação usou-se tetróxido de ósmio e, então, as amostras foram liofilizadas e revestidas a vácuo com ouro.

As imagens foram analisadas e fotografadas utilizando o Microscópio Eletrônico de Varredura a 10 kV (Quanta-FEG) do Laboratório de Caracterização Tecnológica, no Departamento de Engenharia de Minas e de Petróleo da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo/SP.

3.8.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

Para MET, os taquizoítos da cepa RH foram analisados em dois tempos: no início da liberação de EVs (T = 0) e após 24 horas. Os taquizoítos (1x10⁶) foram centrifugados e lavados (três vezes) com PBS. Os parasitas presentes no sedimento foram fixados em glutaraldeído a 2,5%, paraformaldeído a 4% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,4) durante 2 horas. Em seguida, os sedimentos foram lavados no mesmo tampão e fixados em uma solução contendo 1% de tetróxido de ósmio, 0,8% de ferrocianeto e 5 mM de cloreto de cálcio; lavados em tampão cacodilato de sódio 0,1 M; desidratados em acetona graduada e embebidos em resina Epon[®]. Cortes ultrafinos (100 nm) foram obtidos em ultramicrótomo Sorvall[®] e corados com acetato de uranila e citrato de chumbo.

As amostras foram analisadas no microscópio eletrônico de transmissão, modelo JEM 1.011 a 80 kV (JEOL, Massachusetts, EUA) e as imagens foram capturadas em uma câmera modelo 785 ES1000W Erlangshen (Gatan, California, EUA).

Os procedimentos de microscopia eletrônica foram realizados pela Dra. Noemi Nosomi Taniwaki e pela Ms. Gislene Mitsue Namiyama do Núcleo de Microscopia Eletrônica do Instituto Adolfo Lutz.

3.9. Expressão gênica de miRNA

Estes experimentos foram realizados para determinar se os taquizoítos e as EVs das três cepas albergam alguns miRNAs que são expressos em pacientes com toxoplasmose. São eles: miR-155, miR-146a, miR-21, miR-29c, miR-125b, miR-9, miR-484, miR423 e Cel-miR-39. A tabela 1 descreve as características de cada um deles.

Tabela 1. miRNAs utilizados para o ensaio de expressão gênica e seus respectivos genes-alvo humanos e as sequências nucleotídicas.Fonte: Thermo Fisher Scientific, disponível em: <www.thermofisher.com/order/genome-database>

miRNA	Gene-alvo	Nº de acesso	ID do Ensaio	Localização no cromossomo	Sequência de nucleotídeos
miR-155-5p	hsa-miR-155-5p	MI0000681	477927_miR	Chr. 21: 25573980 - 25574044 [+] on Build GRCh38	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGG U
miR-146a-5p	hsa-miR-146a-5p	MI0000477	478399_miR	Chr. 5: 160485352 - 160485450 [+] on Build GRCh38	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU
miR-21-5p	hsa-miR-21-3p	MI0000077	477975_miR	Chr.17: 59841266 - 59841337 [+] on Build GRCh38	CAACACCAGUCGAUGGGCUGU
miR-29c-3p	hsa-miR-29c-3p	MI0000735	479229_miR	Chr. 1: 207801852 - 207801939 [-] on Build GRCh38	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA
miR-9-5p	hsa-miR9-5p	MI0000466	427975_miR	Chr.1: 156420341 - 156420429 [-] on Build GRCh38	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUG A
miR-125b-5p	hsa-miR-125b-5p	MI0000446	477885_miR	Chr. 11: 122099757 - 122099844 [-]] on Build GRCh38	UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA
miR-423-3p	hsa-miR-423-3p	MI0001445	478327_miR	Chr. 17 - 30117079 - 30117172 [+] on Build GRCh38	AGCUCGGUCUGAGGCCCCUCAG U
miR-484	hsa-miR-484	MI0002468	478308_miR	Chr.16: 15643294 - 15643372 [+] on Build GRCh38	UCAGGCUCAGUCCCCUCCGAU
cel-miR-39-3p	cel-miR-39-3p	MIMAT00000 10	478293_miR	-	UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG

3.9.1. Extração de RNA e miRNA

As extrações de RNA foram realizadas utilizando kit comercial miRneasy® Mini-kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) e seguindo as recomendações do fabricante. Incluiu-se na reação 25 fmol de miRNA sintético de *Caenorhabditis elegans* (Cel-miR-39, Ambion Inc., Texas, EUA) como controle interno da reação.

Inicialmente, tubos contendo os taquizoítos ou EVs de cada cepa foram adicionados 700 µL de QIAzol® (Qiagen, Hilden, Alemanha) em cada amostra, para a lise. Após agitação em vórtex, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente durante 5 minutos. A seguir, foram acrescentados 5 µL de cel-miR-39 e, em seguida, 140 µL de clorofórmio. Os tubos foram agitados vigorosamente por 15 segundos, permanecendo em temperatura ambiente durante 3 minutos. A seguir, centrifugou-se a 14.000 rpm durante 15 minutos. Transferiu-se a fase aquosa incolor do sobrenadante para um novo tubo e adicionou-se 525 µL de etanol 100%. Cerca de 600 µL dessa solução foi transferida para a coluna RNeasy® Mini Column (Qiagen, Hilden, Alemanha) e centrifugado a 10.000 rpm durante 15 segundos, repetindo essa etapa até a completa transferência da amostra contendo o etanol. Na coluna, foram adicionados 350 µL do tampão RWT e centrifugado a 10.000 rpm durante 15 segundos, repetindo essa etapa mais uma vez. Então, 500 µL do tampão RPE foi adicionado e centrifugou-se a 10.000 rpm por 15 segundos, repetindo-se mais uma vez essa etapa. A coluna vazia foi novamente centrifugada a 14.000 rpm durante 1 minuto para retirar o etanol residual. A seguir, a coluna foi colocada em um novo tubo e adicionou-se 30 µL de água DEPEC e centrifugou-se a 10.000 durante 1 minuto. O filtrado foi colocado novamente da coluna e repetido a centrifugação. Por fim, esses filtrados, contendo o RNA total e miRNA extraídos, foram armazenados a -70 °C para depois dar prosseguimento ao experimento.

3.9.2. Síntese de DNA complementar (cDNA)

Para a síntese de cDNA utilizou-se 2 µL de RNA total (incluindo miRNA) para o uso na reação de síntese de cDNA usando o kit Taqman®Advanced miRNA-cDNA Synthesis (Life Technologies, California, EUA), seguindo as recomendações do fabricante.

A primeira etapa da reação consiste na adição da cauda poli A, então adicionou-se em um tubo os reagentes a seguir: 0,5 µL 10X Poly (A) Buffer; 0,5 µL ATP; 0,3 µL Poly A Enzyme; 1,7 µL água livre de RNase; e 2 µL amostra. Os tubos foram levados ao termociclador Veriti® (Applied Biosystems, California, EUA) e as ciclagens seguiram as seguintes etapas: poliadenilação – 37 °C por 45 minutos; reação de parada – 65 °C por 10 minutos; e *hold* – 4 °C até a retirada das amostras.

Para a segunda etapa, reação de ligação dos adaptadores, preparou-se os tubos com 3 µL 5X DNA Ligase Buffer, 4,5 µL PEG 8.000, 0,6 µL 25X Ligation Adaptor, 1,5 µL RNA ligase, 0,4 µL água livre de RNase e essa solução foi adicionada ao produto da etapa anterior. Os tubos foram levados ao termociclador Veriti® (Applied Biosystems, California, EUA) e as ciclagens seguiram as seguintes etapas: ligação – 16 °C durante 60 minutos, e *hold* – 4 °C até a retirada das amostras.

A terceira etapa é responsável pela reação de transcrição reversa. Preparou-se então uma mistura contendo 6 µL 5X RT Buffer, 1,2 µL dNTP mix (25 mM), 1,5 µL Universal RT Primer, 3 µL 10X RT Enzyme mix, 3,3 µL água livre de RNase, e adicionou-se ao produto da etapa anterior. Os tubos foram levados ao termociclador Veriti® (Applied Biosystems, California, EUA) e as ciclagens seguiram as seguintes etapas: transcrição reversa – 42 °C durante 15 minutos; reação de parada – 85 °C por 15 minutos; e *hold* – 4 °C até a retirada das amostras.

A quarta e última etapa consiste na reação de amplificação dos miRNAs e preparou-se tubos contendo 25 µL miR-Amp Master Mix, 2,5 µL 20X miR-Amp Primer Mix, 17,5 µL água livre de RNase e 5 µL do produto da reação anterior. Os tubos foram levados ao termociclador Veriti® (Applied

Biosystems, California, EUA) e as ciclagens seguiram as seguintes etapas: ativação da enzima – 95 °C durante 5 minutos; 14 ciclos para desnaturação – 95 °C por 3 segundos; 14 ciclos para anelamento/extensão – 60 °C por 30 segundos; reação de parada – 99 °C por 10 minutos; e *hold* – 4 °C até a retirada das amostras.

As amostras de cDNA foram armazenadas a -20 °C até o uso em ensaios de PCR em tempo real quantitativo (qPCR).

3.9.3. PCR em tempo real (qPCR)

Para verificar se *T. gondii* expressa os miRNAs escolhidos, foram realizadas as amplificações por qPCR para cada miRNA em um volume total de 10 µL. Cada reação constituía de 5 µL do master mix (2X TaqMan® Fast Advanced Master Mix, Applied Biosystems, California, EUA), 0,5 µL de cada miRNA (TaqMan® Advanced miRNA Assays - Applied Biosystems, California, EUA), 2,5 µL do cDNA teste (diluído 1:10) e 2 µL de água livre de RNase.

As reações foram preparadas em duplicata para cada amostra e em todos os ensaios e, para cada reação, foi adicionado um controle negativo, compondo-se somente do mix de amplificação. As amostras foram amplificadas e detectadas usando StepOne® Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, California, EUA) com a seguinte ciclagem: 95 °C por 20 segundos; 40 ciclos de 95 °C durante 1 segundo; 60 °C durante 20 segundos (modo Fast).

3.10. Ensaios de virulência

A participação de EVs na virulência de taquizoítos foi investigada em experimentos realizados com 20 camundongos isogênicos da linhagem AS/n, separados em quatro grupos de cinco animais:

- Grupo 1: camundongos infectados com 100 taquizoítos da cepa RH misturados com 5×10^8 EVs da cepa RH;

- Grupo 2: camundongos infectados com 100 taquizoítos da cepa RH misturados com 5×10^8 EVs da cepa ME-49;
- Grupo 3: camundongos infectados com 100 taquizoítos da cepa RH misturados com 5×10^8 EVs da cepa VEG;
- Grupo 4: camundongos infectados apenas com 100 taquizoítos da cepa RH (controle).

Os animais foram observados diariamente e, após quatro dias, iniciou-se a coleta de sangue da cauda para observar a parasitemia, que foi determinada por qPCR. Para a coleta de sangue de cada animal, retirou-se aproximadamente 20-25 μL de sangue com pipeta automática da ponta da cauda. No primeiro dia, uma pequena incisão na ponta da cauda foi realizada com uma tesoura cirúrgica esterilizada. Nos outros dias, o procedimento foi o mesmo, exceto que, a cicatriz da ferida foi suavemente retirada. As coletas foram realizadas até o início da mortalidade dos camundongos. Para as análises moleculares, as amostras de sangue coletadas foram colocadas em tubos de 1,5 mL contendo 50 μL de 0,1 mM EDTA pH 7,3 e, posteriormente, utilizadas para extração de DNA e qPCR.

3.10.1. Extração de DNA

A parasitemia dos camundongos foi determinada por qPCR. As extrações de DNA foram realizadas utilizando o kit PureLink Genomic DNA Kits (Qiagen, Hilden, Alemanha). Nos tubos contendo o sangue adicionaram-se 200 μL de Proteinase K e 200 μL de Buffer AL, homogeneizou-se e incubou-se a 56 °C durante 10 minutos. A seguir, 200 μL de etanol (96-100%) foram adicionados e homogeneizados por 15 segundos e transferiu-se o conteúdo para a coluna QIAmp[®] Mini-Spin (Qiagen, Hilden, Alemanha) e centrifugou-se a 8.000 rpm durante 1 minuto. As colunas foram transferidas para tubos novos, descartando o tubo contendo o filtrado, e adicionou-se 500 μL de Buffer AW1 e novamente centrifugado a 8.000 rpm durante 1 minuto. Depois, adicionou-se 500 μL de Buffer AW2 e centrifugou-se a 14.000 rpm durante 3 minutos. As colunas, então, foram colocadas em tubos novos e foi

adicionado 70 µL de Buffer AE, incubou-se a temperatura ambiente durante 1 minuto e centrifugou-se a 8.000 rpm durante 1 minuto. As colunas foram guardadas em geladeira e as amostras foram estocadas a -20 °C até o momento do uso para o método de qPCR.

3.10.2. PCR em tempo real (qPCR)

Para verificar se os camundongos desenvolveram a infecção, a presença de *T. gondii* foi detectada pela presença de DNA nas amostras extraídas anteriormente. Então, foram realizadas as amplificações por qPCR de cada amostra em um volume total de 20 µL. Cada reação constituía de 10 µL do master mix (2X SsoAdvanced® Universal Probes Supermix, Bio-Rad, California, EUA) contendo sonda marcada com FAM e BHQ1 (5'TCGTGGTGATGGCGGAGAGAATTGA3'), 0,5 µL do *primer forward* (5'AGAGACACCGGAATGCGATCT3') e 0,5 µL do *primer reverse* (5'TTCGTCCAAGCCTCCGACT3'), 0,25 µL da probe Rep 529, 3 µL do DNA teste e 5,75 µL de água livre de RNase. O marcador molecular Rep 529 amplifica uma sequência de 112-pb de uma região altamente repetitiva com 200-300 cópias do genoma de *T. gondii*.

As reações foram preparadas em duplicata para cada amostra e, para cada reação foi adicionado um controle negativo, compondo-se somente do mix de amplificação, e um controle positivo (DNA de *T. gondii*).

As amostras foram amplificadas e detectadas usando AriaMx® Real-Time PCR System (Agilent Technologies, California, EUA) com a seguinte ciclagem: 50 °C por 2 minutos; 95 °C durante 10 minutos; 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos; 60 °C durante 1 minuto (modo Fast).

3.11. Análise proteica e antigênica de EVs

3.11.1. Quantificação de proteínas

As proteínas de EVs concentradas foram quantificadas seguindo o protocolo do kit comercial para ensaio proteico Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA).

Para a construção da curva padrão, foi utilizado a albumina sérica bovina (BSA) em concentrações que variavam de 5-250 µg/mL. Então, 25 µL das amostras e dos padrões foram adicionados em uma placa de poliestireno e em seguida 200 µL do reagente WS (*work solution*) do kit (diluição 1:8). A seguir, a placa foi incubada por 30 minutos a 37 °C. As leituras em D.O. foram realizadas em espectrofotômetro, no comprimento de onda 562 nm e os resultados plotados em uma planilha do Excel (Microsoft, Washington, EUA) para comparação com uma curva padrão. Os valores de concentração foram gerados a partir dessa curva usando a equação polinomial de 2º grau, com $r^2 > 0.98$ para ensaio.

3.11.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As proteínas das EVs foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. Os géis foram preparados em duas etapas.

Para a preparação do *lower gel* (gel separador) foi utilizado 4,05 mL de água miliQ, 3,3 mL da solução de acrilamida/bis-acrilamida 30%, 2,5 mL de tampão Tris-HCl pH 8,8 1,5 M, 100 µL de SDS 10%, 100 µL de PSA 10% e 10 µL de TEMED (N, N, N', N'-tetra-metiletilenodiamina). O *upper gel* (gel concentrador) foi preparado com 6,16 mL de água miliQ, 1,2 mL da solução de acrilamida/bis-acrilamida 30%, 2,5 mL de tampão Tris-HCl pH 6,8 0,5 M, 100 µL de SDS 10%, 100 µL de PSA 10% e 10 µL de TEMED (N, N, N', N'-tetra-metiletilenodiamina).

Para a eletroforese, utilizou-se tampão de corrida (Tris-HCl 0,025M; glicina 0,192M; SDS 0,1%), voltagem de 60 V para o *upper gel*, durante 15 minutos, e 80 V com duração de 120 minutos. Precauções para se evitar

contaminações foram seguidas e marcador com 100 pares de base (100bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific®, Massachusetts, USA) utilizados em todas as reações. As amostras de EVs foram previamente incubadas a 100 °C com tampão redutor (SDS 2%; glicerol 10%; 2-mercaptoetanol 5%; Tris-HCl 60 mM pH 6,8; azul de bromofenol 0,002%) por 10 minutos.

Para a coloração em prata, os géis foram incubados primeiramente em solução fixadora contendo 10% de metanol, 0,5% de ácido acético e 200 mL de água miliQ, permanecendo por 30 minutos sob leve agitação. Em seguida, foram lavados com água miliQ e incubados com solução de prata 0,11M (0,185 g nitrato de prata + 100 mL água miliQ) por 30 minutos sob leve agitação. Depois, adicionou-se água miliQ em duas etapas para retirar o excesso de prata. Com 125 mL da solução reveladora (7,5 g de hidróxido de sódio, 250 mL de água miliQ e 2 mL de formalina), os géis foram revelados. Retirou-se o excesso da solução reveladora e foi adicionado 100 mL de ácido acético 5% para parar a reação e depois os géis foram acondicionados em recipiente contendo álcool etílico 10% para a conservação dos mesmos.

3.11.3. *Immunoblot*

Após a separação das proteínas na eletroforese, as EVs foram transferidas para a membrana de nitrocelulose (com poros de 0,45 µm de diâmetro) no equipamento Semi-dry Transfer Unit® TE70X (Hoefer, Massachusetts, EUA). Após o posicionamento e montagem do gel e membrana, envoltos em folhas de papel de filtro, a transferência foi efetuada em voltagem constante de 15 V durante 30 minutos em tampão de transferência (Tris-HCl 25 mM pH 8,2; glicina 0,192 M; metanol 20%; SDS 10%).

Ao final da transferência, as membranas foram, então, incubadas com PBS-leite desnatado 5%, pelo período de 60 minutos em temperatura ambiente, sob agitação, seguidos de três lavagens com PBS, durante 15 minutos cada. Em seguida, adicionaram-se os soros humanos (1:50) e soros

de camundongos (1:20) diluídos em PBS-leite desnatado 5% e incubou-se a 4 °C durante 18 horas.

Após as incubações, foram realizadas mais três lavagens, sob agitação, com PBS, por 15 minutos. A seguir, as membranas foram incubadas, sob agitação, por 60 minutos à temperatura ambiente com o anticorpo secundário anti-IgG conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), de acordo com a amostra usada anteriormente, com PBS-leite desnatado 5% (1:500), seguindo-se, então, um novo ciclo de lavagens. A revelação das bandas foi realizada cobrindo-se as membranas com substrato comercial Pierce ECL[®] para *Immunoblotting* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) e feito a leitura no C-DiGit[®] Blot Scanner (LI-COR Biosciences, Nebraska, EUA) utilizando o software Image Studio Digits Version 5.2 (LI-COR Biosciences, Nebraska, EUA).

3.12. Cultura de esplenócitos e ensaio de detecção de citocinas

Para determinar se EVs produzidos pelas três cepas de *T. gondii* poderiam estimular a resposta imune celular, baços de três camundongos isogênicos da linhagem A/Sn normais foram removidos sob condições assépticas. Em meio asséptico, os camundongos sofreram eutanásia e retirou-se o baço de cada animal. Em uma placa de petri, os baços foram macerados com PBS filtrado e estéril para a liberação dos esplenócitos do órgão. A suspensão foi, então, passada para um tubo de 50 mL e ajustou-se o volume para 20 mL com PBS estéril, este foi centrifugado a 2.000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 10 mL de ACK filtrada e estéril ao precipitado, agitou-se para a completa ressuspensão e deixou em repouso durante 5 minutos. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 2.000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensão com 10 mL de PBS estéril, centrifugou-se a 2.000 rpm durante 10 minutos (duas vezes). Depois, o precipitado foi ressuspensão com 2 mL de meio de cultura contendo meio RPMI e 10% de SFB.

Para a contagem e ajuste do número de células para o ensaio, em um tubo foram adicionados 10 μL da suspensão e 10 μL de azul de Tripán (análise da viabilidade celular) e transferidos para a câmara da Neubauer para a contagem.

Em uma placa de cultura contendo 48 poços, 500 μL da solução contendo os linfócitos contados (1×10^6 linfócitos/mL) foi adicionada em cada poço. Após isso, adicionou-se os controles positivos (proliferadores mitóticos) – 0,8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ConA (Concanavalina A) e 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ LPS (lipopolissacarídeo bacteriano) – e 10 μg de EVs de cada cepa (RH, ME-49 e VEG), além do controle negativo (meio de cultura). Cada procedimento foi feito em triplicata e incubados a 37 °C em estufa de CO₂ a 5%. Os sobrenadantes foram coletados em duplicata após 24 e 48 horas e acondicionados a -20 °C para o prosseguimento do ELISA.

3.12.1. Detecção das concentrações de citocinas por ELISA

As concentrações das citocinas IL-10, IFN- γ e TNF- α foram determinadas pelo kit comercial Mouse Cytokine Uncoated ELISA kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante.

A placa de poliestireno foi sensibilizada com 100 μL do anticorpo de captura diluído no Coating Buffer (1:250) e a placa foi incubada a 4 °C durante 24 horas (para cada citocina testada). Descartou-se a solução e lavou-se a placa com 250 μL de Wash Buffer, repetindo esse processo cinco vezes, com pausa de 1 minuto. Removeu-se os resíduos do tampão e adicionou-se 200 μL de Elispot (diluído 1:5 em água miliQ), em temperatura ambiente a placa foi incubada durante 60 minutos. Procedeu-se as cinco lavagens com Wash Buffer.

O recombinante foi diluído em água miliQ (de acordo com as concentrações: IL-10 – 1.000 pg/mL, IFN- γ – 2.000 pg/mL, TNF- α – 1.000 pg/mL) para a construção da curva do recombinante. Nos poços B, C, D, E, F e G foi adicionado 100 μL de Elispot e em A adicionou-se 200 μL do

recombinante diluído e procedeu-se com a diluição seriada até o G. Para o branco da reação, adicionou-se 200 µL de Elispot no poço H. Para as amostras, 100 µL de cada foi adicionado. A placa, então, foi incubada por 24 horas em temperatura ambiente.

A seguir, lavou-se cinco vezes com Wash Buffer e adicionou-se 100 µL do anticorpo de detecção diluído em Elispot (1:250) e incubou-se a temperatura ambiente durante 60 minutos. A placa foi lavada novamente, cinco vezes, e 100 µL de estreptoavidina (HRP) diluída em Elispot (1:100) foi adicionada, esta foi incubada a temperatura ambiente durante 30 minutos e procedeu-se com sete lavagens, com intervalo de 2 minutos. Após isso, adicionou-se 100 µL do substrato TMB e incubou-se por 15 minutos a temperatura ambiente, para revelação da cor. Em seguida, foi adicionado 50 µL da solução de parada (H₂SO₄ 2N) e foi levado ao espectrofotômetro para a leitura em comprimento de onda de 450 nm. Os valores em pg/mL foram determinados através da curva padrão de cada citocina.

3.13. Análise dos dados

Os resultados de NTA de EVs (concentração e tamanho) foram expressos como média aritmética ± SEM (erro padrão da média) em triplicata.

As análises de expressão gênica, que incluem os valores de expressão de miRNA, foram apresentados como Quantificação Relativa (QR) e calculados pelo método do Ct comparativo descrito por Livak e Schmittgen (2001), no programa geNorm.

Os resultados das citocinas expressos pg/mL em triplicata, foram apresentados como média ± SEM.

Nos experimentos de virulência, as comparações entre grupos experimentais (infecção por taquizoítos misturados ou não com EVs) foram avaliadas estatisticamente pelas parasitemias analisando-se os coeficientes de similaridade, calculado pelo teste *t-student* não pareado, com intervalo de confiança de 95%. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$.

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software Graph Pad Prism versão 6.0 (San Diego, CA, EUA).

4. Resultados

4.1. Padronizações

As padronizações iniciaram com a manutenção das três cepas de *T. gondii* (RH, VEG e ME-49) em cultura de células VERO. Após a coleta de EVs dos taquizoítos da cultura, estas foram purificadas por cromatografia de exclusão de tamanho e, em seguida, fez-se ELISA das frações coletadas para se determinar quais continham EVs (figura 9).

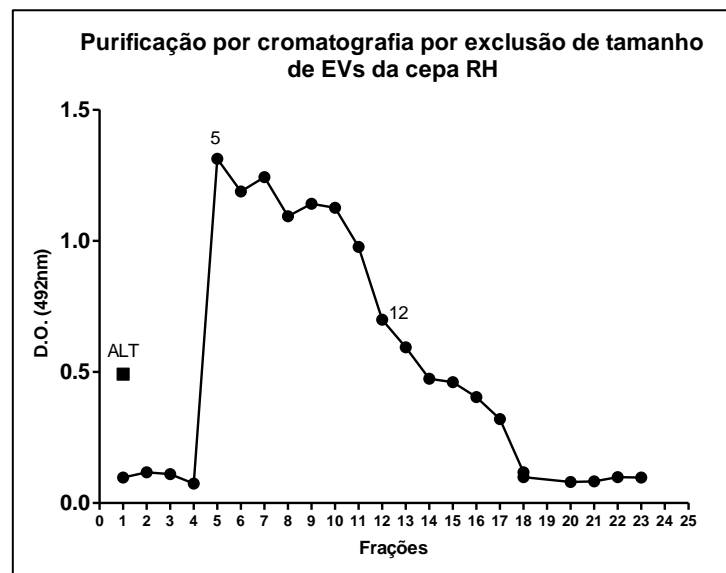


Figura 9. Resultados do ELISA após a purificação de EVs de *T. gondii* da cepa RH por coluna de afinidade. Os números destacados no gráfico (5-12) mostram o intervalo de frações com EVs e que foram usadas nos experimentos. ALT = antígeno lisado de taquizoítos e controle positivo da reação; D.O. = densidade óptica.

A seguir as frações de EVs foram concentradas em centrífuga à vácuo. Para determinar o melhor método de ruptura da membrana plasmática da vesícula e liberação das proteínas, comparou-se o método de ultrassom/sonicador (Eco-Sonics®, Ultronique, São Paulo, Brasil) e

TissueLyser LT® (Qiagen, Hilden, Alemanha) e, em seguida, quantificou-se as proteínas por BCA.

Observou-se que o sonicador foi o mais eficiente em romper a membrana plasmática de EVs e liberar as proteínas (figura 10).

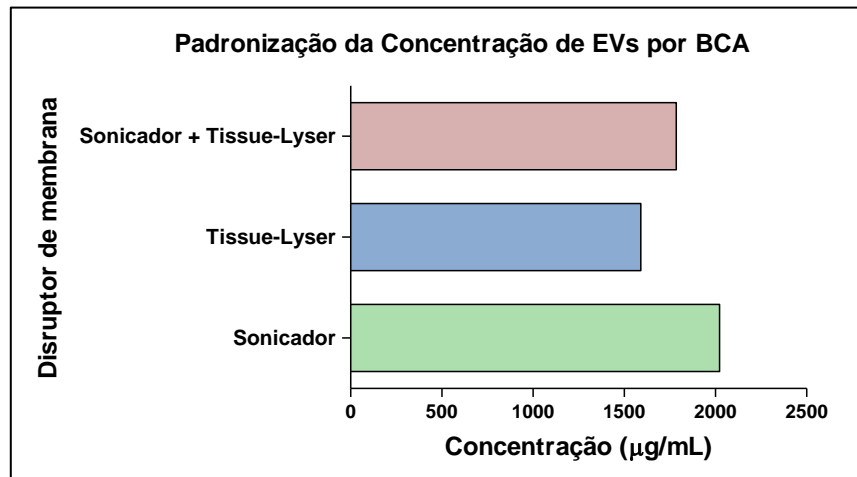


Figura 10. Métodos utilizados para romper a membrana das EVs e as respectivas concentrações de proteínas obtidas no BCA.

Após determinar o método mais eficaz para lisar EVs, as proteínas foram analisadas por SDS-PAGE para determinar o volume ideal de amostra de EVs para ser utilizada no *Immunoblot*.

A figura 11 mostra que volumes entre 10 µL, 20 µL e 30 µL contendo, respectivamente, 20 µg, 40 µg e 60 µg de proteínas de EVs seriam suficientes para serem transferidas na membrana de nitrocelulose.

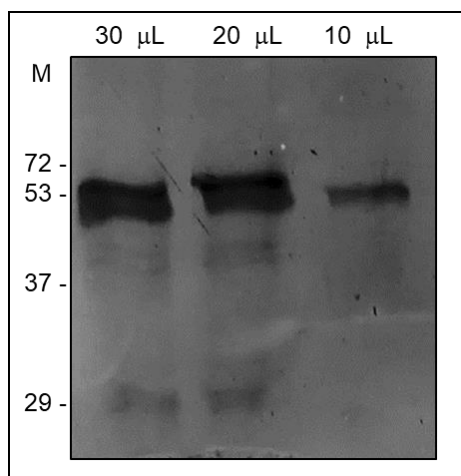


Figura 11. Perfil eletroforético de EVs liberadas por taquizoítos da cepa RH em SDS-PAGE 10% corado com prata. M = marcador de peso molecular de proteínas (kD).

4.2. Purificação e caracterização de EVs produzidas por taquizoítos das cepas RH, VEG e ME-49

O perfil eletroforético de EVs liberadas pelas três cepas foram analisadas por SDS-PAGE 10% (figura 12).

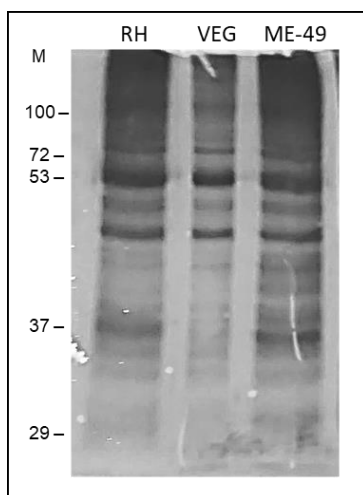


Figura 12. Representação do gel de poliacrilamida corado com prata. Observa-se o perfil eletroforético de cada amostra de EVs das cepas RH, VEG e ME-49 de *T. gondii*. M = marcador de peso molecular de proteínas (kD).

Em seguida, as concentrações de EVs liberadas por taquizoítos de cada cepa foram analisados por NTA. Taquizoítos (1×10^7) de cada cepa foram utilizados para liberação de EVs e incubou-se durante 2 horas e 24 horas a $37\text{ }^\circ\text{C}$ em estufa de CO_2 a 5%. Amostra de cada cepa foi utilizada para a determinação da concentração e tamanho de EVs no equipamento NanoSight® NS300 (Malvern Panalytical, Spectris, Surrey, Inglaterra).

O perfil de liberação de EVs das três cepas foi similar, porém, em 2 horas de incubação, houve maior liberação de EVs do que em 24 horas (figura 13).

As concentrações de EVs liberadas por taquizoítos da cepa RH durante 2 horas de incubação foi de $8,0 \times 10^8$ e, em 24 horas, $1,2 \times 10^8$. Já a cepa ME-49, as concentrações de EVs foram de $1,9 \times 10^8$ em 2 horas de incubação e $1,1 \times 10^8$ em 24 horas. As concentrações de EVs da cepa VEG foram de $4,7 \times 10^8$ em 2 horas de incubação e $1,3 \times 10^8$ em 24 horas. Observou-se, então, que a cepa RH produziu mais EVs, seguido da cepa VEG, e a cepa ME-49 foi a que menos produziu EVs nos dois períodos de incubação (figura 13).

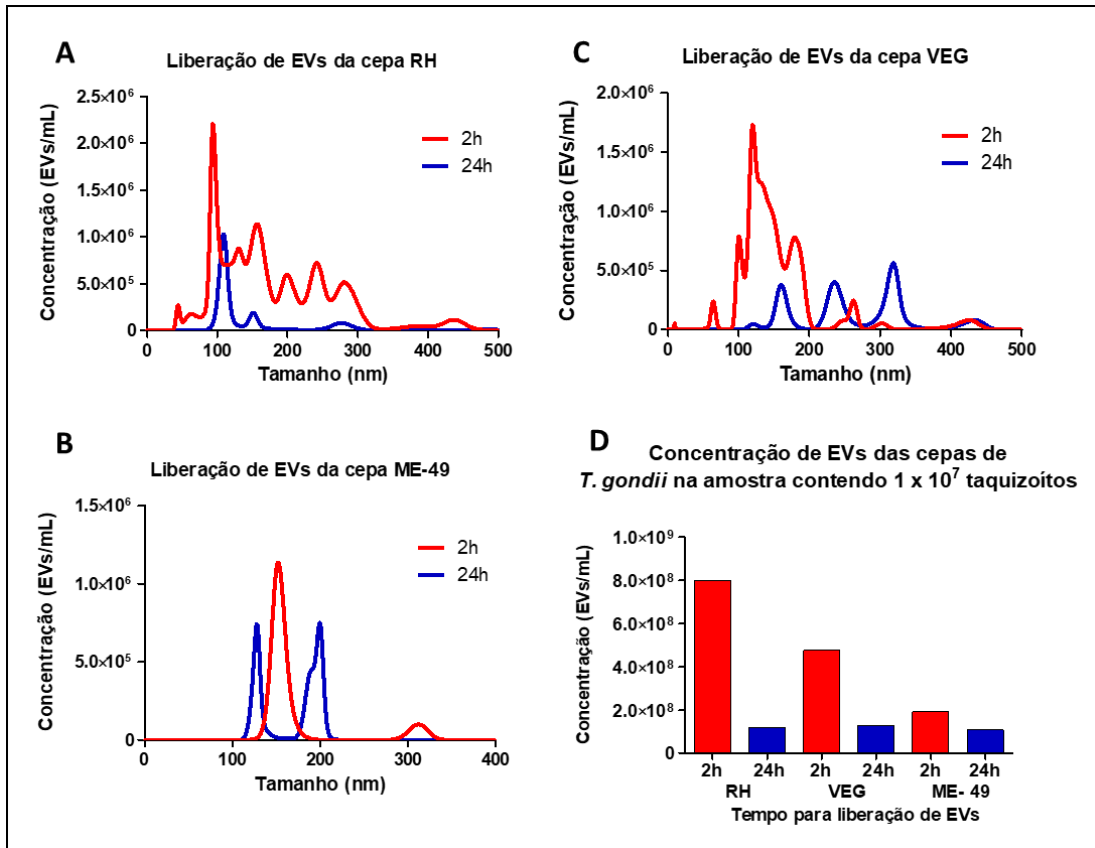


Figura 13. Análises por NTA de EVs liberadas pelos taquizoítos das cepas RH, ME-49 e VEG em 2 e 24 horas de incubação. (A), (B) e (C) concentrações de EVs (EVs/mL) de cada cepa em relação aos tamanhos (nm). (D) comparação das três cepas em relação à produção de EVs em 2 e 24 horas de incubação.

A figura 14 mostra a média de tamanho de EVs liberadas pelas três cepas, assim como o diâmetro de 90% (D90) de EVs encontradas nas amostras. Em relação à cepa RH, a média de tamanho de EVs foi de 160 nm e D90 de 140 nm. Já EVs da cepa ME-49 apresentaram média de tamanho de 200 nm e D90 de 205 nm. E a média de tamanho de EVs da cepa VEG foi de 150 nm e D90 de 140 nm.

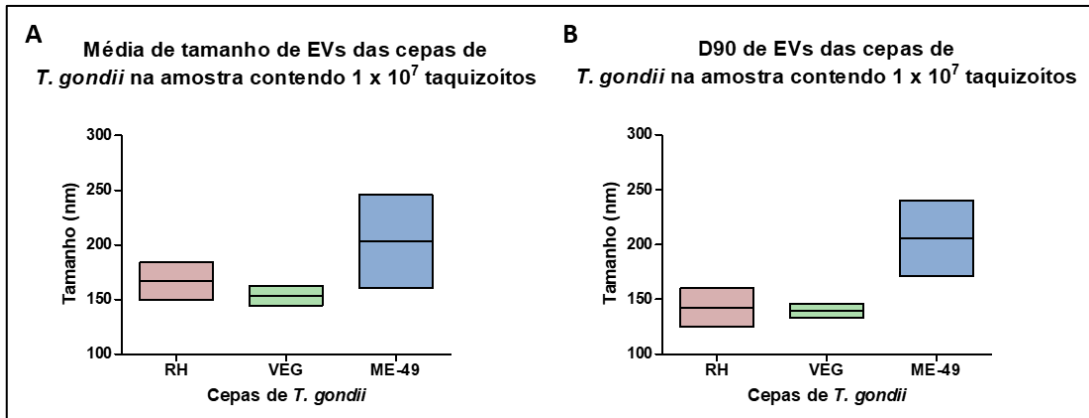


Figura 14. Análise de tamanhos de EVs das três cepas de *T. gondii*. (A) média de tamanho. (B) tamanho encontrado em 90% de EVs de cada cepa. D90 = diâmetro de 90% das vesículas na amostra.

Em seguida, as purificações de EVs de cada cepa foram analisadas quanto a purificação por cromatografia de exclusão de tamanho seguido por ELISA, além de quantificação por NTA. A figura 15 mostra a efetividade da cromatografia de exclusão de tamanho em separar as vesículas de *T. gondii* através do ELISA.

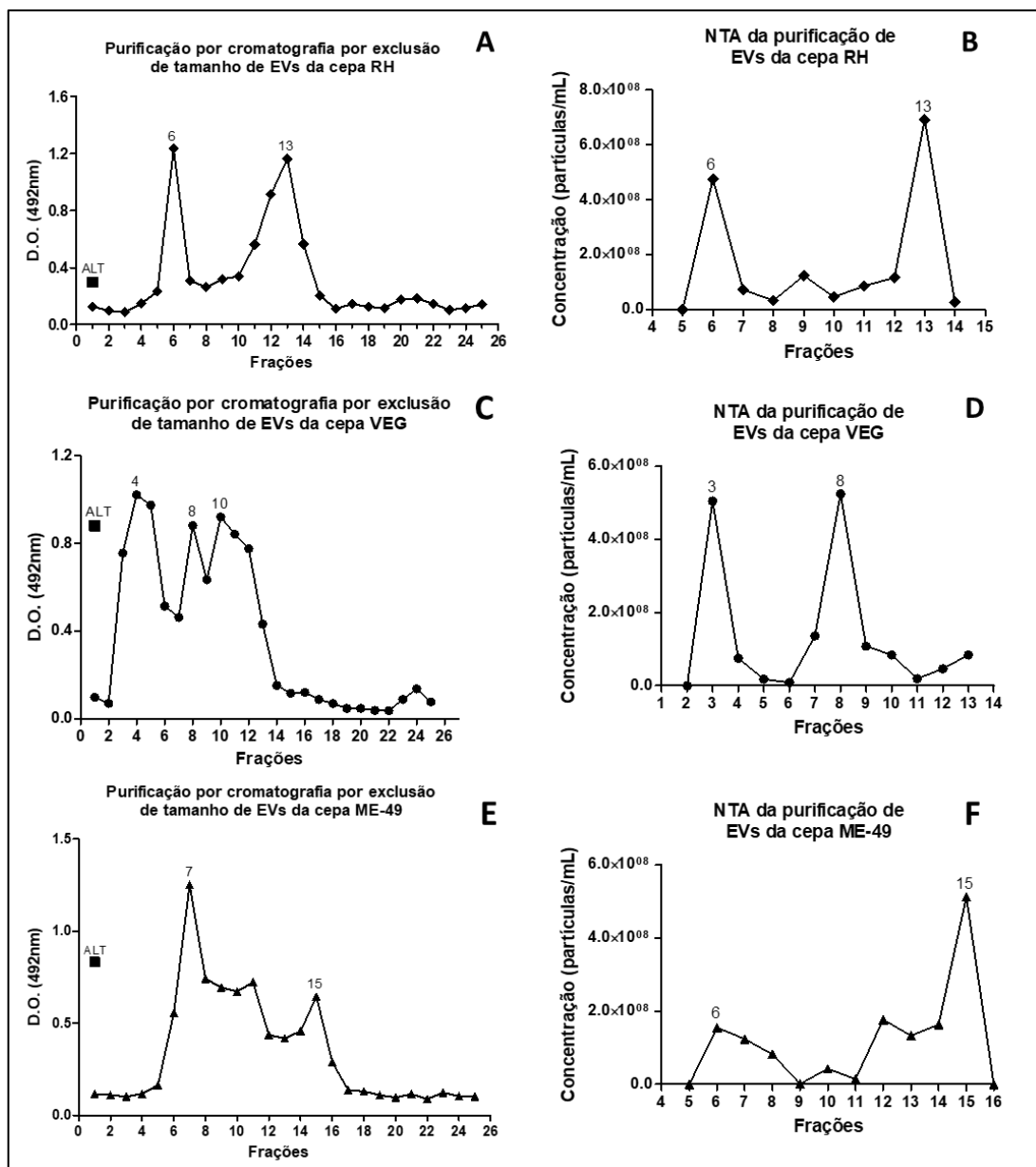


Figura 15. Purificação por cromatografia de exclusão de tamanho e ELISA de EVs liberadas por taquizoítos das cepas RH (A), VEG (C) e ME-49 (E) e concentrações de EVs avaliadas por NTA das cepas RH (B), VEG (D) e ME-49 (F). Os números destacados nos gráficos mostram o intervalo de frações que contém EVs e que foram usadas para NTA e ALT como controle positivo do ELISA. ALT = antígeno lisado de taquizoítos; D.O. = densidade óptica.

A figura 16 mostra a comparação da quantidade de EVs purificadas de cada cepa. Taquizoítos na concentração de $5,2 \times 10^8$ taquizoítos/mL da

cepa RH produziram $1,9 \times 10^8$ partículas/mL, já a cepa VEG, $1,1 \times 10^8$ taquizoítos/mL produziram $2,1 \times 10^8$ partículas/mL, e $5,7 \times 10^8$ taquizoítos/mL da cepa ME-49 produziram $1,9 \times 10^8$ partículas/mL, podendo-se observar que taquizoítos da cepa VEG foram os que mais produziram EVs.

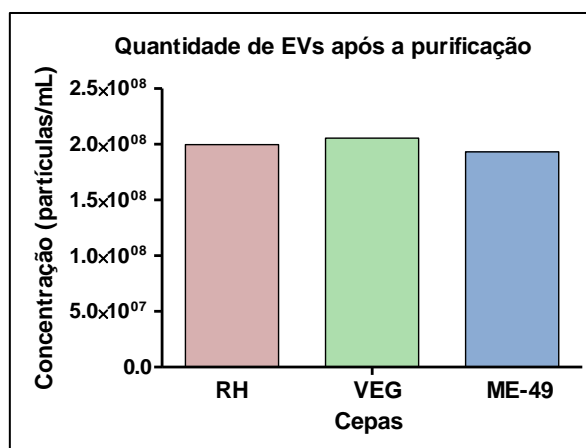


Figura 16. Concentração de EVs dosadas por NTA após a purificação por cromatografia por exclusão de tamanho das cepas RH, VEG e ME-49 de *T. gondii*.

Depois de determinado que 2 horas de incubação produzia mais EVs nas três cepas, os taquizoítos foram, então, analisados por MEV. Na figura 17 pode-se observar que taquizoítos da cepa RH produziram mais EVs do que as outras duas cepas analisadas. A cepa VEG é a segunda que conseguiu produzir grandes quantidades de EVs e a cepa ME-49 foi a que menos produziu EVs.

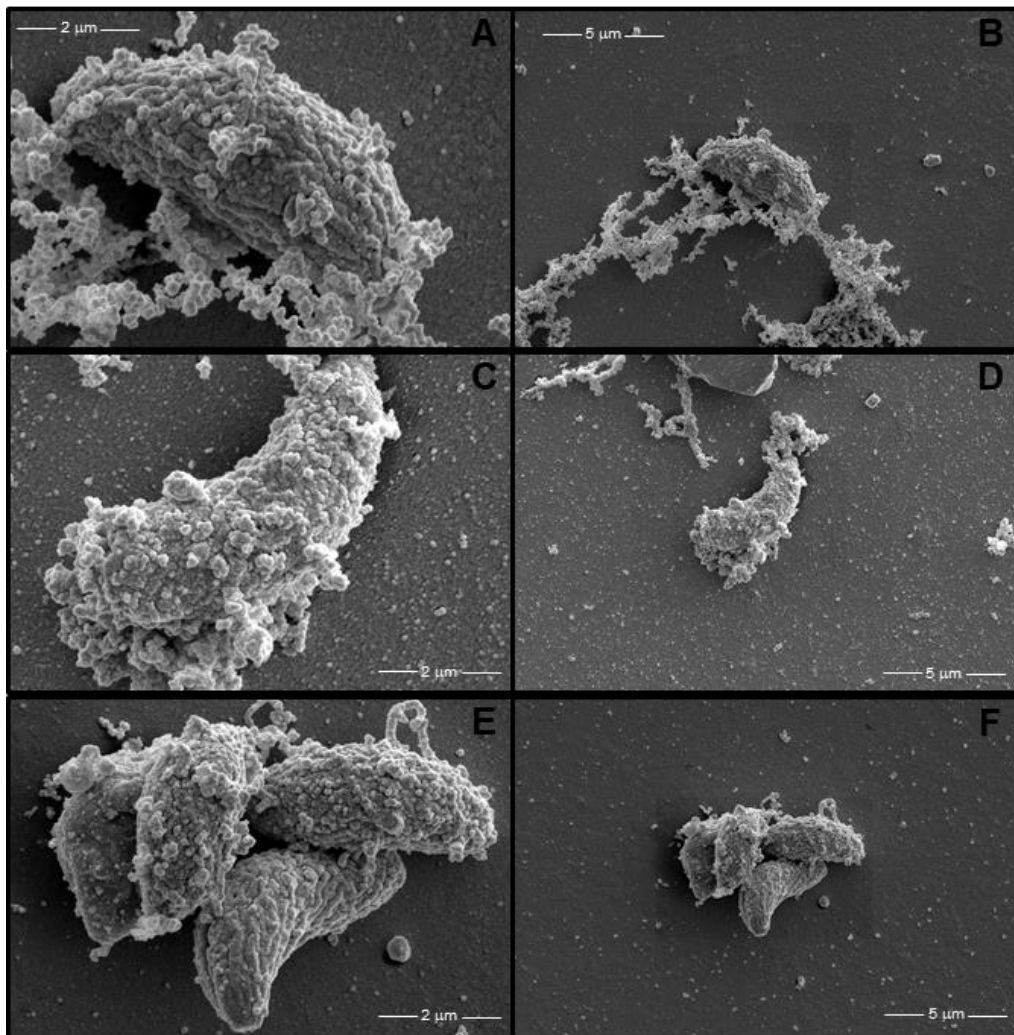


Figura 17. Microscopia eletrônica de varredura de taquizoítos das cepas RH (A e B), VEG (C e D) e ME-49 (E e F) de *T. gondii* mostrando a liberação de numerosas EVs pela membrana plasmática após incubação por 2 horas. Aumento: A, C, E = 75.000 vezes; B, D, F = 25.000 vezes.

Como os resultados da MEV mostraram que taquizoítos da cepa RH produziram mais EVs do que as outras duas cepas de *T. gondii*, estes foram analisados por MET em dois tempos para se observar a liberação de EVs. A figura 18 mostra a formação de corpos multivesiculares no interior dos taquizoítos, tanto no tempo zero, quanto em 24 horas de incubação, porém observa-se maior quantidade de corpos multivesiculares formados depois de 24 horas. Além disso, pode-se observar a liberação de EVs do poro posterior,

anel apical e membrana plasmática dos taquizoítos e o aumento da liberação de EVs com 24 horas de incubação.

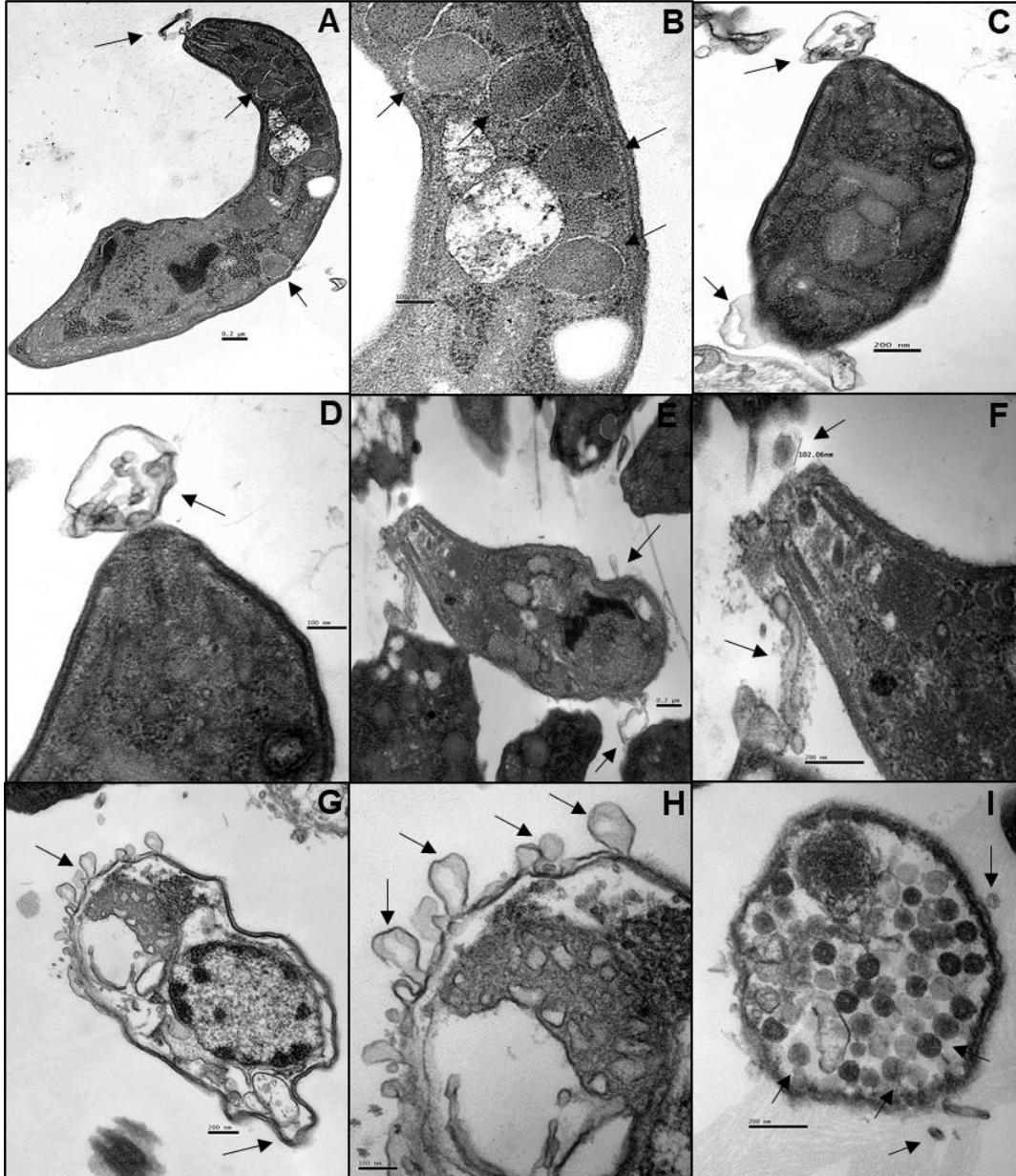


Figura 18. Microscopia eletrônica de transmissão dos taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH em dois tempos de incubação para se observar a liberação de EVs. As setas indicam a liberação de EVs pelo taquizoíto. No tempo 0, (A) e (B) mostram um taquizoíto liberando EVs do anel apical e corpos multivesiculares em seu citoplasma. Em (C) e (D) observa-se a liberação de EVs tanto no poro posterior quanto no anel apical. Depois de 24 horas de incubação, em (E) e (F) observa-se maior produção de vesículas. Em

(G) e (H) observa-se o taquizoítio com a membrana plasmática disforme e com brotamento e liberação de EVs. (I) corte transversal do taquizoítio e pode-se observar corpos multivesiculares em seu citoplasma, além da liberação de EVs da membrana plasmática. Aumento: A, C, E, G = 50.000 vezes; B, D, F, H, I = 120.000 vezes.

4.3. Taquizoítos e EVs produzidas pelas cepas RH, VEG e ME-49 expressam miRNAs encontrados em hospedeiros infectados por *T. gondii*

Os ensaios de expressão gênica foram conduzidos para analisar se os miRNAs miR-155-5p, miR-125b-5p, miR-423-3p, miR-21-5p, miR-29c-3p, miR-9-5p, miR-146a-5p e miR-484, que são expressos tanto em humanos quanto em camundongos, podem também ser expressos por taquizoítos e carregados através de EVs por eles produzidas.

A figura 19 mostra a expressão relativa dos miRNAs tanto em taquizoítos quanto em EVs produzidas por taquizoítos das cepas RH, VEG e ME-49, representados por Quantificação Relativa (QR) da qPCR.

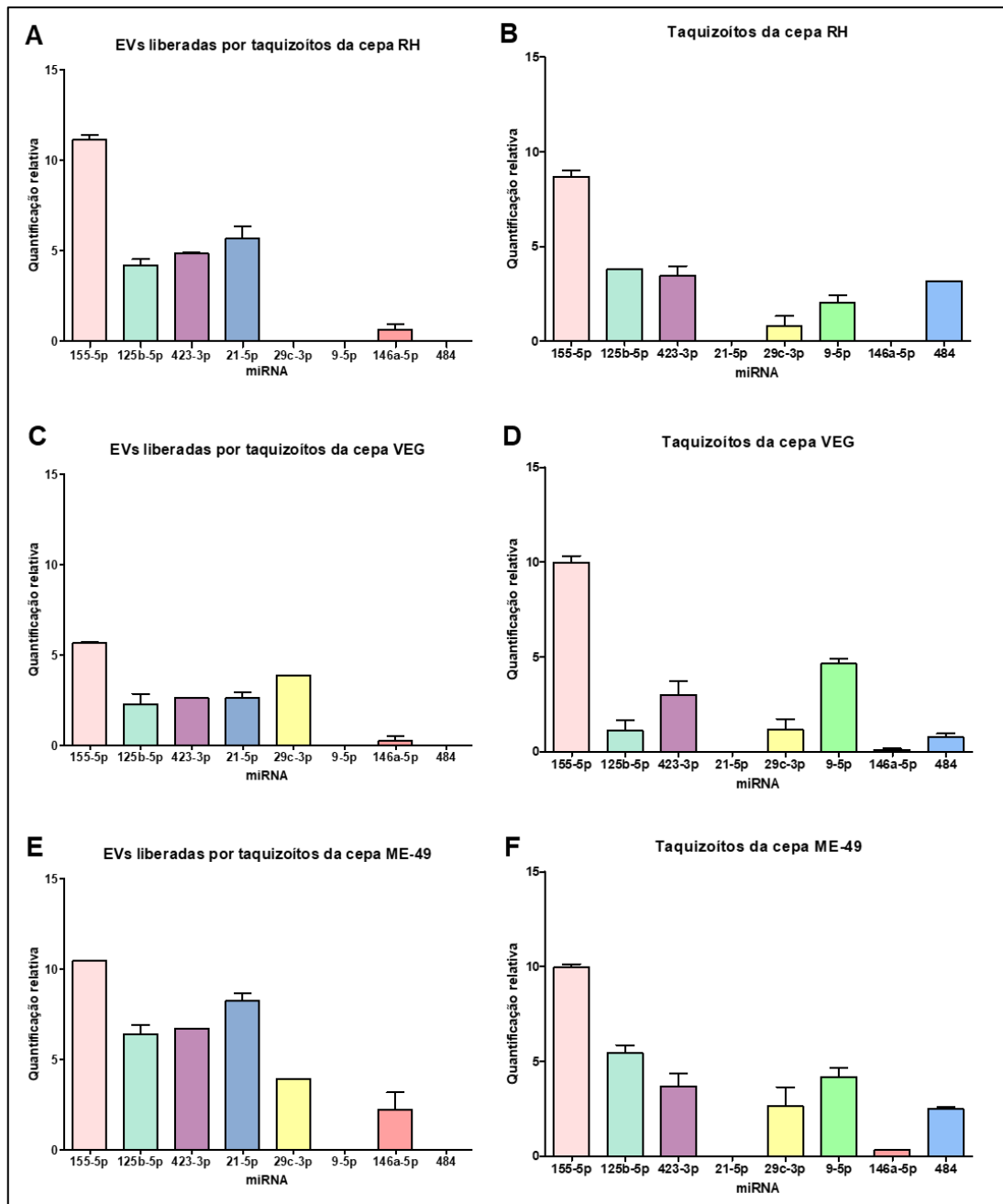


Figura 19. Expressão dos miRNAs miR-155-5p, miR-125b-5p, miR-423-3p, miR-21-5p, miR-29c-3p, miR-9-5p, miR-146a-5p e miR-484 em taquizoitos e EVs produzidas por taquizoitos das cepas RH, VEG e ME-49 de *T. gondii*. (A), (C) e (E) miRNAs expressos por EVs produzidas por taquizoitos das cepas RH, VEG e ME-49, respectivamente. (B), (D) e (F) miRNAs expressos por taquizoitos das cepas RH, VEG e ME-49, respectivamente.

miR-155-5p, miR-125b-5p e miR-423-3p foram expressos tanto em taquizoítos quanto em EVs produzidas para as três cepas analisadas, sendo miR-155-5p o mais expresso em relação aos outros miRNAs. miR-21-5p foi expresso apenas em EVs produzidas por taquizoítos e miR-9-5p foi expresso apenas em taquizoítos. miR-146a-5p, miR-29c-3p e miR-484 foram muito pouco expressos ou não expressos em taquizoítos e EVs (tabela 2).

Tabela 2. Quantificação Relativa da expressão dos miRNAs pesquisados tanto em taquizoitos quanto em EVs produzidas nas três cepas de *T. gondii*.

miRNAs	Taquizoítos			EVs		
	RH	ME-49	VEG	RH	ME-49	VEG
miR-155-5p	8,670	9,970	9,990	11,150	10,450	5,675
miR-125b-5p	3,810	5,430	1,115	4,165	6,380	2,260
miR-423-3p	3,440	3,695	3,005	4,835	6,700	2,605
miR-21-5p	0	0	0	5,645	8,225	2,610
miR-29c-3p	0,780	2,645	1,180	0	3,900	3,860
miR-9-5p	2,025	4,180	4,650	0	0	0
miR-146a-5p	0	0,330	0,120	0,620	2,215	0,245
miR-484	3,175	2,490	0,795	0	0	0

4.4. EVs aumentam a virulência de taquizoítos

Para determinar se EVs são capazes de participar na virulência dos taquizoítos na infecção, foi conduzido um ensaio de virulência. Camundongos foram infectados com taquizoítos da cepa RH, misturados ou não com EVs das três cepas e, em seguida, foram monitoradas as parasitemias e taxas de sobrevivência dos camundongos.

Então, calculou-se o parasitemia dos quatro grupos por qPCR. Depois de 4 dias de infecção, pode-se observar que ainda não havia quantidades altas de taquizoítos nos quatro grupos, mas os grupos que continham EVs da cepa RH ($13,13 \pm 2,229$) e EVs da cepa ME-49 ($10,22 \pm 1,974$) foram os que apresentaram maior parasitemia, com diferença estatística significativa em relação ao grupo de camundongos infectados com a cepa RH (controle)

($1,014 \pm 0,484$) com $p = 0,0007$ e $p = 0,0019$, respectivamente. No quinto dia de infecção, observou-se um aumento significativo no número de taquizoítos nos quatro grupos e, mais uma vez, os grupos contendo EVs da cepa RH ($35,52 \pm 13,14$) e outro contendo EVs da cepa ME-49 ($38,51 \pm 12,18$) apresentaram maior parasitemia. O grupo contendo EVs da cepa VEG foi o que apresentou menor parasitemia nos dois dias analisados ($5,172 \pm 2,686$; $19,68 \pm 4,501$), assim como o grupo de camundongos infectados com a cepa RH (controle) ($1,014 \pm 0,484$; $14,22 \pm 6,658$).

Além disso, quando EVs foram administradas juntamente com taquizoítos, os animais morreram mais rápido, sendo que EVs da cepa RH foram os mais eficientes em aumentar a virulência dos taquizoítos, fazendo com que os camundongos fossem a óbito em 6 dias após a indução da infecção. EVs da cepa VEG e ME-49 fizeram com que os camundongos fossem a óbito depois de 7 dias e os camundongos que receberam apenas os taquizoítos (grupo controle) foram a óbito após de 8 dias de infecção (figura 20).

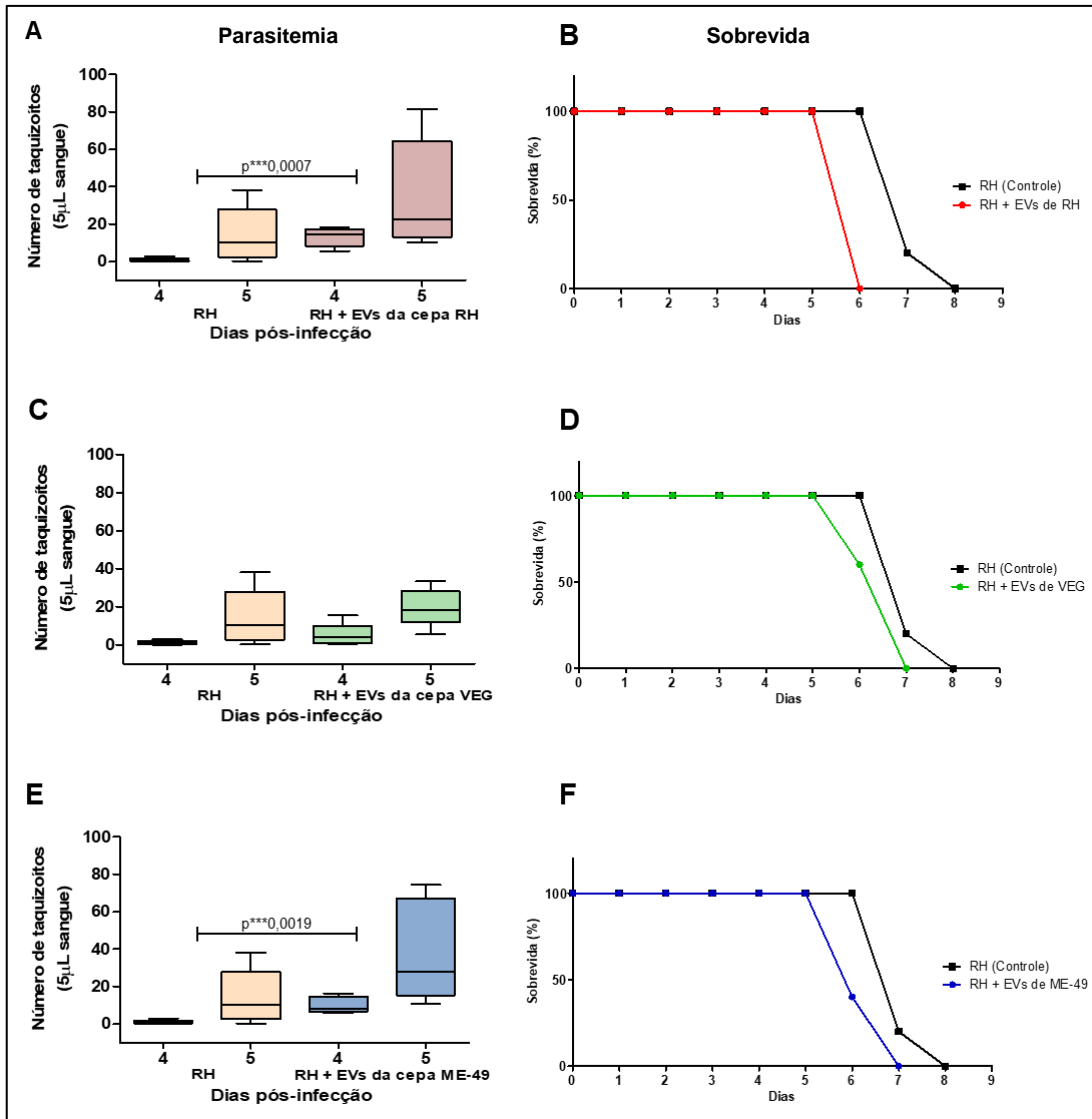


Figura 20. Parasitemia de camundongos infectados com taquizoítos da cepa RH (colunas beges) e camundongos infectados com taquizoítos da cepa RH e EVs das cepas RH (colunas rosas – A), VEG (colunas verdes – C) e ME-49 (colunas azuis – E), e índices de sobrevida de camundongos infectados com taquizoítos da cepa RH (linhas pretas) e camundongos infectados com taquizoítos da cepa RH e EVs das cepas RH (linha vermelha – B), VEG (linha verde – D) e ME-49 (linha azul – F).

A comparação entre o grupo de camundongos que foram infectados com a cepa RH e os que receberam taquizoítos misturados com EVs da cepa RH mostrou diferença estatística no quinto dia de infecção. E a comparação entre o grupo de camundongos que foram infectados com a cepa RH e os que

receberam taquizoítos misturados com EVs da cepa ME-49 mostrou diferença estatística no quarto dia de infecção.

4.5. EVs como biomarcadores no diagnóstico da toxoplasmose

A próxima etapa foi investigar se EVs são capazes de reagir com anticorpos presentes em pacientes com toxoplasmose.

EVs da cepa RH foram mais reagentes com soro de pacientes com toxoplasmose cerebral, porém EVs das três cepas não reagiram com soro de paciente com toxoplasmose assintomática (figura 21).

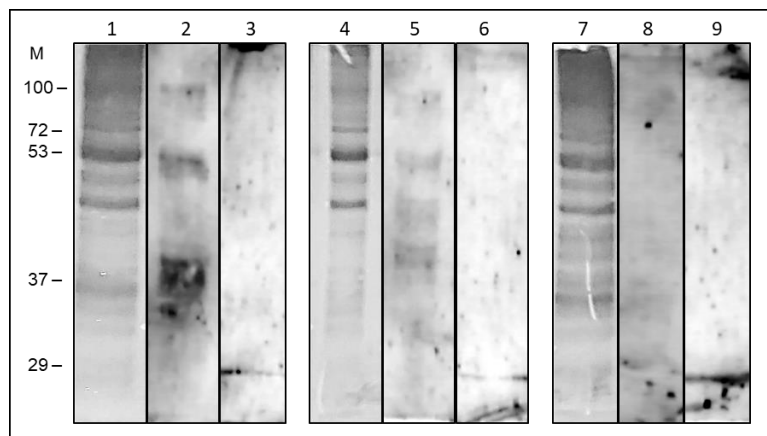


Figura 21. Perfil eletroforético em SDS-PAGE 10% coradas com prata de EVs das cepas RH (1), VEG (4) e ME-49 (7). Estes géis foram transferidos para membranas de nitrocelulose e realizado *Immunoblot* com soro de pacientes com toxoplasmose cerebral (2, 5, 8) e outro com toxoplasmose assintomática (3, 6, 9), incubados com as membranas contendo EVs purificadas da cepa RH (2; 3), VEG (5; 6) e ME-49 (8; 9). M = marcador de peso molecular de proteínas (kD).

Determinado que EVs de taquizoítos da cepa RH foi mais reagente com soros imunes, analisou-se, então, a capacidade de reagir com as formas gestacional e cerebral da toxoplasmose utilizando soro de pacientes infectados e, também, soro de camundongos com toxoplasmose crônica. Os soros humano e murino sem toxoplasmose foram utilizados como controle.

Como observado na figura 22, EVs da cepa RH foram capazes de reagir com soro de humanos e murinos com as diferentes formas da toxoplasmose.

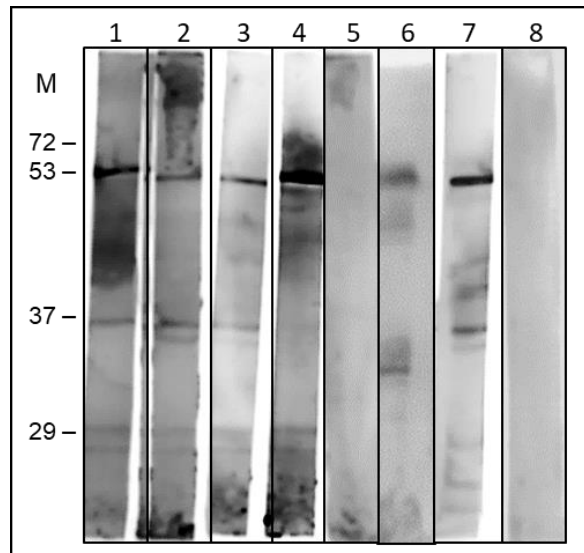


Figura 22. Immunoblot a partir de SDS-PAGE 10% contendo EVs secretadas por taquizoítos da cepa RH e transferidos para membrana de nitrocelulose, que foram incubadas com soros humanos com toxoplasmose gestacional (1 e 2), cerebral (3 e 4), sem toxoplasmose (5), soros murinos infectados com a cepa VEG (6), ME-49 (7) e sem toxoplasmose (8). M = marcador de peso molecular de proteínas (kD).

4.6. EVs estimulam a produção de IL-10, IFN- γ e TNF- α em esplenócitos de camundongos *in vitro*

Após analisar o papel das EVs na virulência e como biomarcadores, a próxima etapa foi investigar se EVs eram capazes de estimular a produção das citocinas IL-10, IFN- γ e TNF- α , importantes no processo inflamatório após a infecção por *T. gondii*.

Então, no ensaio de quantificação das citocinas IL-10, IFN- γ e TNF- α produzidas por esplenócitos de camundongos *in vitro*, após incubação por 24 e 48 horas com EVs produzidas por taquizoítos das três cepas de *T. gondii*, observou-se que a produção de IL-10 e TNF- α de maneira similar nos dois tempos de incubação para EVs produzidas pelas três cepas. Em relação aos controles, LPS estimulou moderadamente a produção de IL-10 e TNF- α , mas

não estimulou a produção de IFN- γ , já ConA foi capaz de estimular a produção das três citocinas (figura 23).

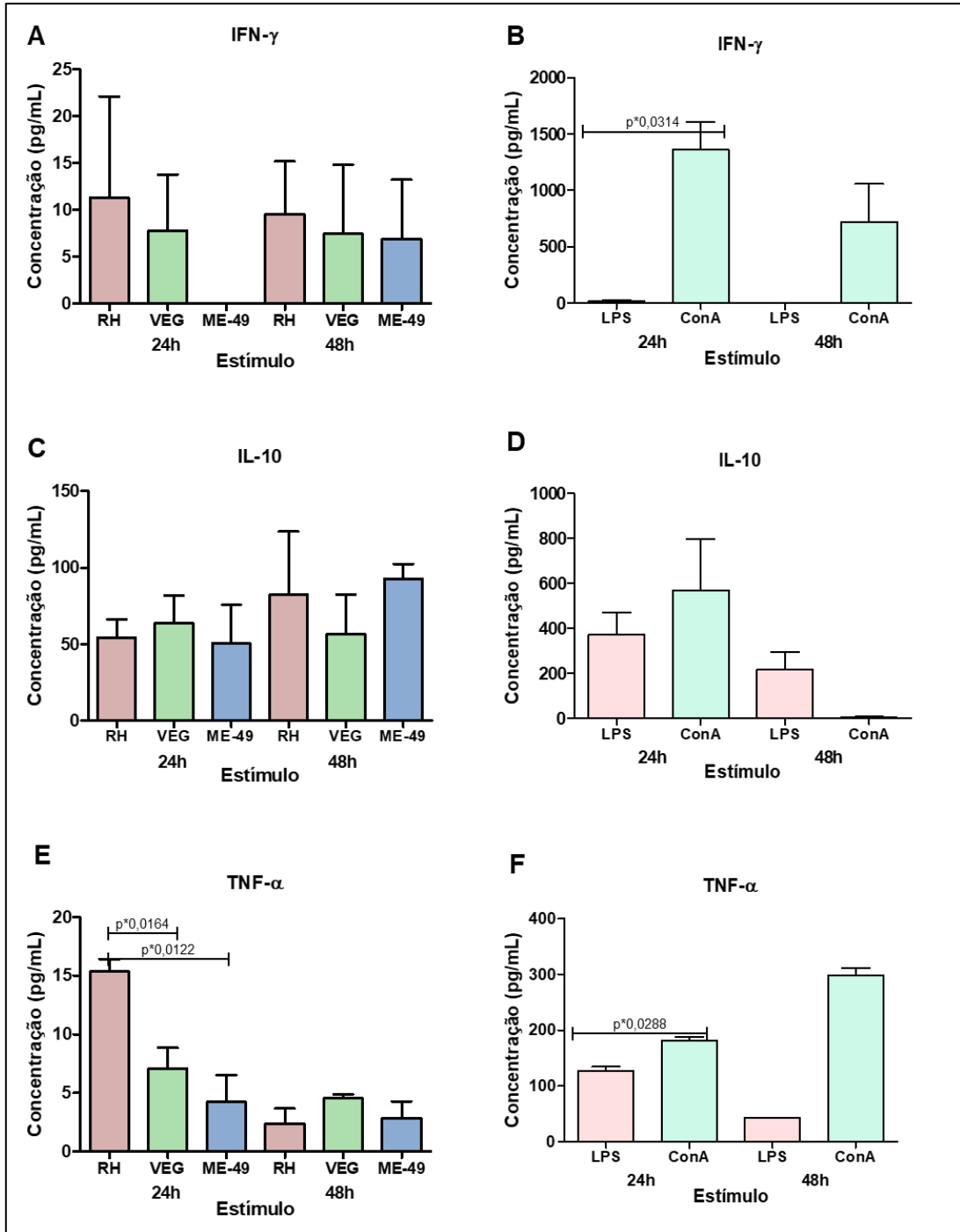


Figura 23. Produção de IFN- γ , IL-10 e TNF- α por esplenócitos de camundongos in vitro após estímulo por EVs das cepas RH, VEG e ME-49. A, C, E = concentrações de IFN- γ , IL-10 e TNF- α respectivamente, após 24 e 48

horas. B, D, F = produção de IFN- γ , IL-10 e TNF- α por esplenócitos de camundongos in vitro após estímulo dos proliferadores LPS e ConA, que foram utilizados como controle da reação.

Esplenócitos estimulados durante 24 horas com EVs das cepas RH e VEG produziram $11,29 \pm 10,83$ pg/mL e $7,733 \pm 6,024$ pg/mL, respectivamente, de IFN- γ , mas EVs da cepa ME-49 não foi capaz de estimular a produção de IFN- γ . Já com estimulação de 48 horas, EVs das cepas RH, VEG e ME-49 produziram $9,511 \pm 5,665$ pg/mL, $7,422 \pm 7,422$ pg/mL e $6,844 \pm 6,384$ pg/mL, respectivamente, de IFN- γ .

IL-10 foi produzida após estímulos de 24 e 48 horas. Após 24 horas, esplenócitos estimulados por EVs das cepas RH, VEG e ME-49 produziram $54,3 \pm 11,92$ pg/mL, $63,93 \pm 17,79$ pg/mL e $50,52 \pm 25,26$ pg/mL, respectivamente, de IL-10. Já em 48 horas, EVs das cepas RH, VEG e ME-49 produziram $82,37 \pm 41,23$ pg/mL, $56,52 \pm 25,93$ pg/mL e $92,82 \pm 9,63$ pg/mL, respectivamente, de IL-10.

Esplenócitos estimulados com EVs da cepa RH, VEG e ME-49, por 24 horas, produziram $15,36 \pm 1,06$ pg/mL, $7,051 \pm 1,799$ pg/mL e $4,205 \pm 2,338$ pg/mL de TNF- α , respectivamente. Houve diferença estatística entre EVs das cepas RH e VEG ($p = 0,0164$) e entre as cepas RH e ME-49 ($p = 0,0122$). Depois de 48 horas de incubação, EVs das cepas RH, VEG e ME-49 produziram baixas concentrações de TNF- α ($2,359 \pm 1,313$ pg/mL, $4,538 \pm 0,3554$ pg/mL, $2,846 \pm 1,429$ pg/mL, respectivamente).

5. Discussão

Durante a coevolução com diferentes hospedeiros, parasitas conseguiram adaptar diferentes estratégias para comunicação, manipulação e, até mesmo, sequestro do sistema imunológico do hospedeiro para conseguir manter homeostase fisiológica e imunológica que os beneficiam na sobrevivência dentro do hospedeiro e, atualmente, já se sabe que EVs têm um papel importante nesses mecanismos de sobrevivência dos parasitas (Długońska e Gatkowska, 2016; Wu et al., 2019).

T. gondii possui a habilidade de manipular as funções celulares do hospedeiro através de diferentes moléculas efetoras, denominadas ESAs, tais como proteínas secretadas por róptrias (ROP16, ROP18), grânulos densos (GRA15, GRA24), proteínas de superfície (SAG) e de micronemas (MIC), das quais EVs são usadas para transportar essas moléculas (Håkansson, Charron e Sibley, 2001; Leuroux et al., 2015; Długońska e Gatkowska, 2016).

Inclusive, EVs medeiam a transferência das moléculas efetoras, em conjunto com ácidos nucleicos e lipídeos, para células do hospedeiro, fazendo com que haja a modulação da expressão gênica, através de miRNA, e a transferência de fatores de virulência, por proteínas imunogênicas, o que ajudam no processo de invasão e replicação do parasita dentro das células do hospedeiro, além de ativar citocinas pró-inflamatórias para recrutar células do sistema imunológico (Marti e Johnson, 2016; Szempruch et al., 2016).

Além disso, *T. gondii* possui diferentes populações clonais as quais são caracterizadas por três cepas predominantes (RH, ME-49 e VEG) e estas possuem diferenças fenotípicas e patogênicas (Howe e Sibley, 1995; Kochanowsky e Koshy, 2018).

Posto isso, o objetivo principal do trabalho foi investigar a relação entre EVs produzidas por taquizoítos das três cepas de *T. gondii* e a infecção no hospedeiro.

A primeira análise foi caracterizar a liberação de EVs de taquizoítos das três cepas após a purificação por cromatografia e concentração após

ELISA. EVs foram analisadas por NTA para investigar a concentração e tamanho de partículas encontradas em cada amostra.

Os dados encontrados mostram que o padrão de liberação de EVs entre as três cepas foi similar, porém taquizoítos de cepa RH liberaram maior concentração de EVs em relação à cepa VEG e parasitas da cepa ME-49 liberaram concentrações menores de EVs. Quando os parasitas foram incubados por 2 horas, estes liberaram maiores concentrações de EVs do que quando incubados durante 24 horas, podendo inferir que EVs foram degradadas dentro das 24 horas de incubação.

Em relação ao tamanho de EVs encontrado nas amostras, os resultados de NTA mostram que a maioria das partículas encontrada nas três cepas apresentou diâmetro entre 100 e 200 nm o que as caracterizam como microvesículas. Sabe-se que microvesículas são formadas por brotamento da membrana plasmática liberando diferentes tamanhos de vesículas no meio extracelular, ou seja, há uma mistura de subpopulações de vesículas (Szempruch et al., 2016).

Imagens capturadas por microscopia eletrônica de varredura corroboram com os achados por NTA, observando-se produção numerosa de EVs pelos taquizoítos das três cepas, porém com alta concentração de EVs liberadas por taquizoítos da cepa RH em relação às outras duas cepas, VEG e ME-49.

Quanto às imagens capturadas por microscopia eletrônica de transmissão, estas mostram o início da formação e, assim, liberação de EVs de taquizoítos da cepa RH em dois períodos diferentes. No tempo inicial de incubação, observou-se a formação de corpos multivesiculares no citoplasma do taquizoíto e liberação de EVs pelo poro posterior e anel apical. Já com 24 horas de incubação, observou-se liberação abundante de EVs, tanto pelo poro posterior e anel apical, como pela membrana plasmática, inclusive pôde-se observar EVs no meio extracelular, além de corpos multivesiculares no citoplasma do taquizoíto.

Estudos recentes ratificam os achados neste estudo, tanto por NTA quanto através de microscopia eletrônica (Ramírez-Flores et al., 2019a; Silva et al., 2018).

EVs são transportadoras de diversas moléculas incluindo proteínas, ácidos nucleicos (DNA, mRNA e miRNA) e lipídeos, os quais serão transferidos para a célula alvo (Szatanek et al., 2017; Kao e Papoutsakis, 2019).

T. gondii desenvolveu diversas estratégias para sobreviver e estabelecer a infecção e uma delas é o transporte e liberação de miRNAs através de EVs nas células hospedeiras, o que leva à regulação da expressão de proteínas (Cai 2016, Li 2020), associados a fatores de virulência do parasita e a invasão do mesmo na célula alvo (Xu 2013), e a alteração da expressão de genes associados ao sistema imunológico do hospedeiro, além de modular miRNAs do próprio hospedeiro (Saçar, Bagei e Allmer, 2014; Cai e Shen, 2016).

Sabendo que o parasita e o hospedeiro compartilham as funções de uma mesma célula, um dos objetivos deste trabalho foi determinar se taquizoítos e EVs que estes produzem são capazes de expressar os mesmos miRNAs que hospedeiros infectados.

Resultados mostraram que miR-155-5p, miR-125b-5p e miR-423-3p foram os mais expressos tanto por taquizoítos quanto por EVs produzidas pelos taquizoítos das três cepas analisadas, já miR-21-5p foi expresso apenas por EVs.

miR-155-5p é um miRNA imunomodulatório responsável por induzir a ativação e diferenciação de macrófagos, aumentando a resposta pró-inflamatória na infecção por *T. gondii*, induzindo a expressão de citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IFN- γ (Cai e Shen, 2016; Jundice et al., 2016).

Estudos mostram que há aumento da expressão de miR-155-5p no cérebro de camundongos infectados com a cepa ME-49, sugerindo que efetores bradozoítos-específicos podem estar envolvidos em regular os níveis desse miRNA como mecanismo de resistência do hospedeiro (Cannella et al., 2015; Cai e Shen, 2016).

Outro estudo mostrou alta expressão desse miRNA em camundongos com infecção crônica quando comparado com aqueles com infecção aguda, podendo ser resultado do aumento de cistos na infecção crônica por *T. gondii* (Zhou et al., 2020).

Já estudos com pacientes com toxoplasmose ocular mostrou que miR-155-5p é supra-regulado (Meira et al; 2014; Maia et al; 2017; Meira-Strejevitch et al., 2020) e apresenta produção de altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1B, TNF- α , TGF- β) (Maia et al; 2017; Meira-Strejevitch et al., 2020). Da Cruz et al. (2020) mostrou que EVs extraídas de soro de pacientes com toxoplasmose cerebral e HIV apresentam alta expressão de miR-155-5p.

A infecção por *T. gondii* induz a expressão de miR-125b-5p e, assim, induz produção de IL-2, IL-10 e IFN- γ (Cai e Shen, 2016). Além disso, a expressão desse miRNA pode inibir a diferenciação de células T naive em células T efetoras, além de auxiliar no desenvolvimento de processos inflamatórios (Wei e Pei, 2010; Cai e Shen, 2016).

Em macrófagos infectados com a cepa RH de *T. gondii*, miR-125b-5p foi infra-regulado (Li S et al., 2019). Pacientes com toxoplasmose assintomática apresentaram supra-regulação de miR-125b-5p (Meira-Strejevitch et al., 2020). Já em EVs de soro de pacientes com toxoplasmose cerebral e HIV e toxoplasmose gestacional apresentaram altas expressões desse miRNA (da Cruz et el., 2020).

Wang et al. (2020) mostrou que miR-423-3p é expresso em resposta à produção da citocina pró-inflamatória TNF- α .

Já miR-21-5p ajuda no processo de resolução da inflamação e a infra-regular a resposta pró-inflamatória induzida pelo estímulo que ativa a expressão desse miRNA (Sheedy, 2015).

Pacientes com toxoplasmose assintomática e pacientes com toxoplasmose cerebral e HIV apresentam altas expressões de miR-21-5p (Meira-Strejevitch et al., 2020, Pereira et al., 2020). Além disso, EVs coletadas de soro de pacientes com toxoplasmose cerebral e HIV também apresentaram alta expressão desse miRNA (da Cruz et al., 2020).

Leishmania donovani é capaz de supra-regular a expressão de miR-21-5p em monócitos para sua sobrevivência (Ghalehnoei et al., 2019). Além disso, miR-21-5p é um biomarcador para detecção de câncer e já foi encontrado em altas concentrações em exossomos isolados de lágrimas de pacientes com câncer de mama metastático (Inubushui et al., 2020).

Dentre os miRNAs analisados neste estudo, miR-146a-5p, miR-29c-3p, miR-9-5p e miR-484 apresentaram baixas expressões, ou mesmo não expressaram, em taquizoítos ou em EVs produzidas.

miR-146a-5p apresentou baixa expressão em EVs das três cepas e, em relação aos taquizoítos, não apresentaram expressão relevante desse miRNA. Sabe-se que miR-146a-5p é um miRNA imunomodulatório, responsável por induzir a ativação e diferenciação de macrófagos, reprimindo a resposta pró-inflamatória na infecção por *T. gondii*, induzindo a produção de IFN- γ a favor da sobrevivência do hospedeiro (Cai e Shen, 2016; Jundice et al., 2016). Estudos mostram que há o aumento da expressão desse miRNA no cérebro de camundongos infectados com a cepa ME-49, mostrando-se importante para a resposta inflamatória em camundongos com toxoplasmose (Cannella et al., 2015; Cai e Shen, 2016).

miR-29c-3p apresentou baixa expressão tanto em taquizoítos, quanto em EVs, porém a cepa RH não apresentou expressão desse miRNA. Esse miRNA participa na regulação de Th1 e IFN- γ na resposta imune inata e adaptativa, ainda mais, a supressão da expressão de miR-29c-3p causa o aumento da expressão de IFN- γ (Ma et al., 2011; Steiner et al., 2011). É descrito como um dos reguladores de neurogênese na retina, já que os alvos são genes regulatórios presentes na retina, no sistema nervoso central, além de participar em outros processos neurogênicos em outras partes do cérebro (Escobar et al., 2014; Amado et al., 2015). Estudo com pacientes com toxoplasmose ocular mostrou alta expressão de miR-29c-3p (Meira-Strejevitch et al., 2020). Já em EVs de soro de pacientes com toxoplasmose apresentou infra-expressão desse miRNA (da Cruz et al., 2020).

miR-9-5p foi expresso apenas em taquizoítos das três cepas. Esse miRNA é responsável por promover a ativação de macrófagos e suprimir a resposta anti-inflamatória (Essandoh et al., 2016).

miR-484 apresentou baixa expressão em taquizoítos das três cepas, mas não houve expressão em EVs. miR-484 é responsável por regular TGF- β e NF- κ B para induzir carcinogênese hepatocelular, é encontrado em lesões pré-cancerosas no fígado e, em camundongos, infra-regulação desse miRNA ajudou na diminuição da progressão de lesões pré-cancerosas e tumorigênese (Yang et al., 2016; Wang, He e Zhou, 2018).

Apesar de se ter estudos desses miRNAs em hospedeiros humanos e murinos, ainda não se sabe a função desses miRNAs em *T. gondii*.

Além de miRNAs, EVs transportam proteínas e muitas delas são fatores de virulência, como adesinas, proteases e toxinas, que regulam a virulência do parasita na infecção do hospedeiro conseguindo evadir a resposta imune inata (Barteneva, Maltsev e Vorobjev, 2013; Yifat, Meta e Neta, 2017).

Virulência de *T. gondii* vem sendo definida pelo número de taquizoítos necessários para eventualmente matar um camundongo, sendo que a cepa RH é considerada altamente virulenta, pois não necessita de muitos parasitas para desenvolver a infecção, já as outras duas cepas, VEG e ME-49, são consideradas menos virulentas, necessitando cargas parasitárias maiores para matar o animal (Melo, Jensen e Saeij, 2011; Dubremetz e Lebrun, 2012).

Os resultados encontrados no ensaio de virulência com camundongos evidenciaram o papel de EVs, especialmente oriundas de taquizoítos da cepa RH, no favorecimento da infecção por *T. gondii* nos animais e o consequente aumento da carga parasitária.

Os grupos de camundongos que receberam EVs das cepas RH, ME-49 e VEG observou-se um aumento significativo na parasitemia. Ademais, a taxa de sobrevivência dos animais mostrou que aqueles que receberam apenas taquizoítos da cepa RH morreram no oitavo dia após a infecção, já aqueles que, além dos taquizoítos da cepa RH, receberam EVs, morreram dentro de 6-7 dias após a infecção, o que sugere que EVs auxiliam os

taquizoítos no processo de infecção, aumentando a virulência dos mesmos, e fazem com que os animais morram mais rápido.

O resultado do presente estudo corrobora com um estudo feito com EVs de *Trypanosoma cruzi*, o qual mostrou que EVs foram capazes de aumentar o número de parasitas dentro da célula infectada e o consequente aumento do número de células infectadas *in vitro*, além de observar o aumento da parasitemia *in vivo* quando em contato com EVs de *T. cruzi* administradas junto com o parasita nos camundongos (Cestari et al., 2012). Experimentos feitos com macrófagos *in vitro* e com camundongos *in vivo* demonstram que os fatores de virulência transportados por EVs de *Leishmania* sp. são de grande importância no processo infeccioso e no desenvolvimento de patologias relacionadas à leishmaniose (Dong, Filho e Olivier, 2019).

Os parasitas desenvolveram mecanismos capazes de evadir a resposta imune inata e adaptativa através de alterações de suas proteínas de superfície e EVs são ricas em proteínas imunogênicas (ESAs) capazes de modular a resposta imune do hospedeiro tornando possível a detecção dessas moléculas como possíveis biomarcadores da doença (Szempruch et al., 2016; Anand et al., 2019).

Neste estudo, análises com proteínas de EVs das cepas RH, ME-49 e VEG apresentaram perfil eletroforético similares em SDS-PAGE e, quando em contato com soro de pacientes com toxoplasmose, EVs das cepas VEG e ME-49 foram pouco reagentes, porém EVs da cepa RH foram reagentes com soro de pacientes infectados, tanto pacientes com toxoplasmose gestacional, quanto pacientes com toxoplasmose cerebral. No entanto, quando em contato com soro de pacientes assintomáticos, nenhuma cepa apresentou reatividade.

Resultados similares foram encontrados em estudos utilizando TgESAs como antígenos para diagnóstico de toxoplasmose cerebral em pacientes com HIV (Meira et al., 2008; Meira et al., 2011). Esses achados podem indicar o papel de EVs no transporte de proteínas como ESAs e sua importância no diagnóstico da toxoplasmose.

Testes também foram feitos com soro de camundongos com infecção crônica e EVs da cepa RH também foram reativos para soro de camundongos infectados tanto pela cepa VEG quanto pela cepa ME-49. Resultados similares foram encontrados por Silva et al. (2018).

Entende-se que a diversidade de proteínas transportadas por EVs indicam que *T. gondii* é dependente de diferentes moléculas efectoras, além de diferentes epítomos, para modular as funções das células do hospedeiro (Długońska and Gatkowska, 2016; Wowk et al., 2017), por isso foi possível encontrar interação de EVs de *T. gondii* tanto com soro de camundongos quanto com soro de humanos infectados.

Por fim, EVs são usadas como meio de comunicação entre o parasita e as células do hospedeiro, especialmente entre as células pertencentes ao sistema imune, conseguindo modular a resposta imunológica, como por exemplo, induzindo a produção de diferentes citocinas, que podem promover a sobrevivência e multiplicação do parasita dentro de células hospedeiras, ou mesmo resultar na proteção do hospedeiro contra a infecção parasitária (Szempruch et al., 2016; Wu et al., 2019).

Neste estudo investigou-se se EVs de taquizoítos das três cepas de *T. gondii* conseguem estimular a resposta imunológica celular de esplenócitos provenientes de camundongos. Observou-se que a produção das citocinas IL-10 e TNF- α foi similar tanto em 24 horas quanto em 48 horas. Contudo, esplenócitos que foram estimulados com EVs de taquizoítos da cepa RH produziram estatisticamente mais TNF- α do que aqueles estimulados por EVs das cepas VEG e ME-49.

TNF- α é uma citocina pró-inflamatória importante no início da resposta imune contra *T. gondii*, já que promove a ativação de macrófagos e inibe a replicação do parasita, em conjunto com IFN- γ , e participa no processo de estabelecimento da infecção crônica (Jeffers et al., 2018). Já IL-10 é uma citocina anti-inflamatória envolvida na supressão da resposta imune durante a infecção parasitária, agindo como antagonista no mecanismo das citocinas pró-inflamatórias (Jankovic, Kugler e Sher, 2010).

Em relação à produção de IFN- γ , resultados mostram que EVs da cepa RH foram os que mais estimularam a produção da citocina nos dois períodos analisados, EVs da cepa VEG produziu quantidades similares nos dois períodos, mas com EVs da cepa ME-49 houve estímulo em apenas um período de incubação.

É interessante notar a relação da alta estimulação da produção de IFN- γ por EVs da cepa RH e a ausência da expressão do miR-29c-3p por essa cepa, que, como já descrito anteriormente, a supressão da expressão desse miRNA causa o aumento da expressão de IFN- γ (Ma et al., 2011; Steiner et al., 2011).

Sabe-se que IFN- γ é uma citocina pró-inflamatória importante na patogênese da toxoplasmose, já que células do sistema imune do hospedeiro produz esta citocina para controlar e eliminar o parasita (Jeffers et al., 2018). Estudos mostram que pacientes com toxoplasmose ocular e toxoplasmose cerebral produzem baixas concentrações de IFN- γ em relação aos pacientes com infecção crônica assintomática (Meira et al., 2014; Hernández-de-los-Ríos et al., 2019).

Estudo com TgESAs mostrou que estes foram capazes de inibir a produção tanto de IFN- γ quanto de TNF- α de macrófagos (Leroux et al., 2015). Recentemente, estudos com EVs liberadas por taquizoítos da cepa RH estimularam a produção de IL-10, TNF- α e iNOS em macrófagos de camundongos (Silva et al., 2018). Já Li Y et al. (2018a) demonstrou que exossomos de *T. gondii* induzem a produção de IL-12, IFN- γ e TNF- α em macrófagos, deduzindo que exossomos podem estimular a ativação de macrófagos através da produção de citocinas pró-inflamatórias.

Estudos com EVs de *L. donovani* demonstrou que EVs foram capazes de inibir a produção citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α , e promover a produção da citocina imunoregulatória IL-10, o que facilitou a infecção em camundongos inoculados com EVs e parasitas, já que IL-10 induzida por EVs pode contribuir na supressão da resposta imune inicial e permitir a sobrevivência do parasita no local de infecção (Silverman et al., 2010; Barbosa et al., 2018).

Já as EVs de *T. cruzi* são capazes de induzir diferentes concentrações de iNOS, IL-6, TNF- α e IFN- γ em esplenócitos, além de IL-10, responsável por modular a resposta inflamatória, evitando danos teciduais, na fase crônica da doença de Chagas (Nogueira et al., 2015).

Assim como *Leishmania* sp e *T. cruzi*, EVs de *Neospora caninum* se mostraram capazes de manipular o sistema imunológico do hospedeiro através da produção elevada de IL-10, promovendo sua sobrevivência em células hospedeiras, além de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , TNF- α e IL-6, que são citocinas que participam na proteção contra a infecção por *N. caninum* (Li S et al., 2018).

Esses dados corroboram com os achados no ensaio de virulência e sugere que EVs produzidas por taquizoítos, principalmente da cepa RH, transportam fatores de virulência e são capazes de causar um desequilíbrio na resposta imune celular do hospedeiro, promovendo a sobrevivência do parasita.

De modo geral, este estudo demonstrou a caracterização de EVs produzidas por taquizoítos de *T. gondii* das cepas RH, VEG e ME-49, além da participação de EVs das três cepas na interação do parasita e células do hospedeiro, participando na infecção, através do transporte de fatores de virulência, e na modulação de respostas do sistema imune humoral e celular do hospedeiro. E pode-se relacionar com outros estudos que descrevem a mesma participação de EVs produzidas por outros patógenos.

6. Conclusão

- As três cepas de *T. gondii* foram adaptadas à cultura de células VERO e estabeleceu-se duas horas para a produção de EVs a partir de 1×10^8 taquizoítos;
- EVs foram eficazmente concentradas e purificadas por cromatografia de exclusão de tamanho e ELISA;
- Análises por NTA mostraram que houve maior produção de EVs em duas horas de incubação e a cepa RH é a que produz mais EVs, além da maioria das vesículas encontradas serem caracterizadas como microvesículas com tamanho de 100-200 nm;
- MEV mostrou que taquizoítos da cepa RH foram os que mais produziram EVs, seguido da cepa VEG e por último a cepa ME-49, e análises por MET mostraram a liberação de EVs por taquizoítos da cepa RH pela membrana plasmática;
- Ensaio de expressão gênica mostraram que taquizoítos e EVs por eles produzidas podem expressar miR-155-5p, miR-125b-5p e miR-423-3p, que são encontrados em humanos e murinos infectados;
- Ensaio de virulência comprovaram a participação de EVs na virulência dos taquizoítos, aumentando a parasitemia e diminuindo a sobrevivência dos animais;
- EVs da cepa RH foram capazes de reagir com soro de pacientes com toxoplasmose cerebral e gestacional, além de reagir com soro de camundongos com toxoplasmose crônica, o que os configura como potenciais biomarcadores da doença;
- EVs foram capazes de estimular a produção das citocinas IL-10, IFN- γ e TNF- α , de esplenócitos de camundongos *in vitro*.

7. Referências bibliográficas

Acuña SM, Floeter-Winter LM, Muxel SM. MicroRNAs: Biological Regulators in Pathogen–Host Interactions. *Cells*. 2020; 9:113.

Aguirre AA, Longcore T, Barbieri M, Dabritz H, Hill D, Klein PN et al. The One Health Approach to Toxoplasmosis: Epidemiology, Control, and Prevention Strategies. *EcoHealth*. 2019; 16:378–390.

Ajioka JW, Fitzpatrick JM, Reitter CP. *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 2001; 01:00220-4a.

Ajzenberg D. 1995–2015: it is time to celebrate 20 years of (intensive) genotyping of *Toxoplasma gondii* strains. *Future Microbiol*. 2015; 10(5):689–691.

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

Akers JC, Ramakrishnan V, Kim R, Phillips S, Kaimal V, Mao Y et al. miRNA contents of cerebrospinal fluid extracellular vesicles in glioblastoma patients. *J Neurooncol*. 2015; 123(2):205–216.

Amado T, Schmolka N, Metwally H, Silva-Santos B, Gomes AQ. Cross-regulation between cytokine and microRNA pathways in T cells. *Eur. J. Immunol*. 2015; 45:1584–1595.

Amouei A, Sarvi S, Sharif M, Aghayan SA, Javidnia J, Mizani A et al. A systematic review of *Toxoplasma gondii* genotypes and feline: Geographical distribution trends. *Transbound Emerg Dis*. 2019; 00:1–19.

Anand S, Samuel M, Kumar S, Mathivanan S. Ticket to a bubble ride: Cargo sorting into exosomes and extracellular vesicles. *Elsevier Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2019; 1867(12):e140203.

Barbosa FMC, Dupin TV, Toledo MS, Reis NFC, Ribeiro K, Cronemberger-Andrade A et al. Extracellular Vesicles Released by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Promote Disease Progression and Induce the Production of Different Cytokines in Macrophages and B-1 Cells. *Cells. Front. Microbiol.* 2018; 9:3056.

Barteneva NS, Maltsev N, Vorobjev IA. Microvesicles and intercellular communication in the context of parasitism. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* 2013; 3(49).

Bayer-Santos E, Marini MM, da Silveira FF. Non-coding RNAs in Host-Pathogen Interactions: Subversion of Mammalian Cell Functions by Protozoan Parasites. *Front. Microbiol.* 2017; 8:474.

Betancourt ED, Hamid B, Fabian BT, Klotz C, Hartmann S, Seeber F. From Entry to Early Dissemination—*Toxoplasma gondii*'s Initial Encounter with Its Host. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019; 9:46.

Bhatnagar S, Shinagawa K, Castellino FJ, Schorey JS. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood.* 2007; 110(9).

BRASIL. Boletim Epidemiológico nº 01 – Investigação de casos e surtos de Toxoplasmose Aguda no Município de São Paulo, 2019. Divisão de Vigilância Epidemiológica. Coordenadoria de Vigilância em Saúde-COVISA. Secretaria Municipal da Saúde de São Paulo-SMS/SP. 2019.

BRASIL. Relatório de investigação epidemiológica. Investigação de Surto de Toxoplasmose em Santa Maria/RS. Centro Estadual de Vigilância em Saúde/RS. Secretaria da Saúde do Governo do Estado do Rio Grande do Sul. 2018.

Cai Y, Shen J. Modulation of host immune responses to *Toxoplasma gondii* by microRNAs. *Parasite Immunology.* 2017; 39:e12417.

Cannella D, Brenier-Pinchart M, Braun L, Van Rooyen JM, Bougdour A, Bastien O et al. miR-146a and miR-155 delineate a microRNA fingerprint

associated with *Toxoplasma* persistence in the host brain. *Cell Rep.* 2014; 6(5):928–937.

Carrillo GL, Ballard VA, Glausen T, Boone Z, Teamer J, Hinkson CL et al. *Toxoplasma* infection induces microglia-neuron contact and the loss of perisomatic inhibitory synapses. *Glia.* 2020; 00:1–19.

Carruthers VB. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Tropica.* 2002; 81:111–122.

Cerutti A, Blanchard N, Besteiro S. The Bradyzoite: A Key Developmental Stage for the Persistence and Pathogenesis of Toxoplasmosis. *Pathogens.* 2020; 9:234.

Cesbron-Delauw MF, Capron A. Excreted/secreted antigens of *Toxoplasma gondii* - their origin and role in the host-parasite interaction. *Research in Immunology.* 1993; 144(1):41-44.

Cestari I, Ansa-Addo E, Deolindo P, Inal JM, Ramirez MI. *Trypanosoma cruzi* Immune Evasion Mediated by Host Cell-Derived Microvesicles. 2012; 188:1942-1952.

Chegeni TN, Sarvi S, Amouei A, Moosazadeh M, Hosseininejad Z, Aghayan SA, Daryani A. Relationship between toxoplasmosis and obsessive-compulsive disorder: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019; 13(4):e0007306.

Coakley G, Maizels RM, Buck AH. Exosomes and Other Extracellular Vesicles: The New Communicators in Parasite Infections. *Trends in Parasitology.* 2015; 31(10).

Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends in Cell Biology.* 2009; 19(2).

Colombo FA, Vidal JE, de Oliveira ACP, Hernandez 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. *Journal of Clinical Microbiology.* 2005; 43(10):5044–5047.

Contu R, Latronico MVG, Condorelli G. Circulating MicroRNAs as Potential Biomarkers of Coronary Artery Disease. *Circulation Research*. 2010; 107(5):573-574.

Costa-Silva TA, Borges MM, Galhardo CS, Pereira-Chiocola VL. Immunization with excreted/secreted proteins in AS/n mice activating cellular and humoral response against *Toxoplasma gondii* infection. *Acta Tropica*. 2012; 124:203– 209.

da Costa MA, Pinto-Ferreira F, de Almeida RPA, Martins FDC, Pires AL, Mareze M et al. Artisan fresh cheese from raw cow's milk as a possible route of transmission in a toxoplasmosis outbreak, in Brazil. *Zoonoses Public Health*. 2019; 00:1–8.

da Cruz AB, Maia MM, Pereira IS, Taniwaki NN, Namiyama GM, Telles JPM et al. Human extracellular vesicles and correlation with two clinical forms of toxoplasmosis. *PLoS ONE*. 2020; 15(3):e0229602.

de Souza W, Barrias ES. Membrane-bound extracellular vesicles secreted by parasitic protozoa: cellular structures involved in the communication between cells. *Parasitol Res*. 2020; 119:2005–2023.

Deolindo P, Evans-Osses I, Ramirez MI. Microvesicles and exosomes as vehicles between protozoan and host cell communication. *Biochemical Society Transactions*. 2013; 41:252–257.

Diana J, Vincent C, Peyron F, Picot S, Schmitt D, Persat F. *Toxoplasma gondii* regulates recruitment and migration of human dendritic cells via different soluble secreted factors. *Clinical and Experimental Immunology*. 2005; 141:475–484.

Djurković-Djaković O, Dupouy-Camet J, Van der Giessen J, Dubey JP. Toxoplasmosis: Overview from a One Health perspective. *Food and Waterborne Parasitology*. 2019; 12:e00054.

Długońska H, Gatkowska J. Exosomes in the context of *Toxoplasma gondii* – host communication. *Annals of Parasitology*. 2016; 62(3):169–174.

Dong G, Filho AL, Olivier M. Modulation of Host-Pathogen Communication by Extracellular Vesicles (EVs) of the Protozoan Parasite *Leishmania*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019; 9:100.

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; 139:1375–1424.

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; 00:267–299.

Dubremetz JF, Lebrun M. Virulence factors of *Toxoplasma gondii*. *Microbes and Infection.* 2012; 14:1403-1410.

Dupont CD, Christian DA, Hunter CA. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. *Semin Immunopathol.* 2012; 34:793–813.

Escobar TM, Kanellopoulou C, David G, Kugler², Gokhul Kilaru¹, Cuong K, Nguyen¹, Vijayaraj Nagarajan et al. miR-155 activates cytokine gene expression in Th17 cells by regulating the DNA-binding protein Jarid2 to relieve Polycomb-mediated repression. *Immunity.* 2014 June 19; 40(6): 865–879.

Essandoh K, Li Y, Huo Z, Fan C. MiRNA-Mediated Macrophage Polarization and Its Potential Role in the Regulation of Inflammatory Response. *Shock.* 2016; 46(2):122–131.

Fisch D, Clough B, Frickel E. Human immunity to *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* 2019; 15(12):e1008097.

Fu Y, Yi Z, Wu X, Li J, Xu F. Circulating microRNAs in patients with active pulmonary tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49:4246–4251.

Galvani AT, Christ APG, Padula JA, Barbosa MRF, Araújo RS, Sato MIZ, Razzolini MTP. Real-time PCR detection of *Toxoplasma gondii* in surface water samples in São Paulo, Brazil. *Parasitol Res.* 2019; 118:631–640.

- Ghalehnoei H, Bagheri A, Fakhar M, Mishan MA. Circulatory microRNAs: promising non-invasive prognostic and diagnostic biomarkers for parasitic infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020; 39:395–402.
- Gilbert RE, Freeman K, Lago EG, Bahia-Oliveira LMG, Tan HK, Wallon M et al. Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008; 2:e277.
- Håkansson S, Charron AJ, Sibley LD. *Toxoplasma* evacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. *EMBO J*. 2001; 20(12):3132-3144.
- Halonen SK, Weiss LM. Toxoplasmosis. *Handb Clin Neurol*. 2013; 114:125–145.
- Hernández-de-los-Ríos A, Murillo-Leon M, Mantilla-Muriel LE, Arenas AF, Vargas-Montes M, Cardona N et al. Influence of Two Major *Toxoplasma gondii* Virulence Factors (ROP16 and ROP18) on the Immune Response of Peripheral Blood Mononuclear Cells to Human Toxoplasmosis Infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2019; 9:413.
- Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* Comprises Three Clonal Lineages: Correlation of Parasite Genotype with Human Disease. *The Journal of Infectious Diseases*. 1995; 172:1561-6.
- Hu R, He J, Elsheikha HM, Zhang F, Zou Y, Zhao G et al. Differential Brain MicroRNA Expression Profiles After Acute and Chronic Infection of Mice with *Toxoplasma gondii* Oocysts. *Front. Microbiol*. 2018; 9:2316.
- Ingram WM, Goodrich LM, Robey EA, Eisen MB. Mice Infected with Low-Virulence Strains of *Toxoplasma gondii* Lose Their Innate Aversion to Cat Urine, Even after Extensive Parasite Clearance. *PLoS ONE*. 2013, 8(9):e75246.
- Inubushi S, Kawaguchi H, Mizumoto S, Kuniyama T, Baba M, Kitayama Y et al. Oncogenic miRNAs Identified in Tear Exosomes from Metastatic Breast Cancer Patients. *Anticancer Research*. 2020; 40:3091-3096.

- Jankovic D, Kugler DG, Sher A. IL-10 production by CD4+ effector T cells: a mechanism for self-regulation. *Mucosal Immunol.* 2010; 3(3):239–246.
- Jeffers V, Tampaki Z, Kim K, Sullivan Jr WJ. A latent ability to persist: differentiation in *Toxoplasma gondii*. *Cell. Mol. Life Sci.* 2018; 75:2355–2373.
- Judice CC, Bourgard C, Kayano ACAV, Albrecht L, Costa FTM. MicroRNAs in the Host-Apicomplexan Parasites Interactions: A Review of Immunopathological Aspects. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2016; 6:5.
- Jun L, Yang G, Zhisu L. The utility of serum exosomal microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2019; 111:1221–1227.
- Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science.* 2020; 367:eaau6977.
- Kao C, Papoutsakis ET. Extracellular vesicles: exosomes, microparticles, their parts, and their targets to enable their biomanufacturing and clinical applications. *Current Opinion in Biotechnology.* 2019; 60C:89–98.
- Kaparos N, Favrat B, D'Acremont V. Fièvre, adénopathie: une situation clinique de toxoplasmose aiguë chez une patiente immunocompétente [Fever and lymphadenopathy: acute toxoplasmosis in an immunocompetent patient]. *Rev Med Suisse.* 2014;10(452):2264-2270.
- Khan IA, Hwang S, Moretto M. *Toxoplasma gondii*: CD8 T Cells Cry for CD4 Help. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019; 9:136.
- Kim K. The Epigenome, Cell Cycle, and Development in *Toxoplasma*. *Annual Review of Microbiology.* 2018; 72(1):479-499.
- Kochanowsky JA, Koshy AA. *Toxoplasma gondii*. *Current Biology.* 2018; 28:R770–R771.
- Kuipers ME, Hokke CH, Smits HH, Hoen ENMN. Pathogen-Derived Extracellular Vesicle-Associated Molecules That Affect the Host Immune System: An Overview. *Front. Microbiol.* 2018; 9:2182.

- Lehmann T, Marcet PL, Graham DH, Dahl ER, Dubey JP. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. Proc Natl Acad Sci USA. 2006; 103(30):11423-8.
- Leroux L, Dasanayake D, Rommereim LM, Fox BA, Bzik DJ, Jardim A, Dzierszinski FS. Secreted *Toxoplasma gondii* molecules interfere with expression of MHC-II in interferon gamma-activated macrophages. International Journal for Parasitology. 2015; 45(5):319-332.
- Li S, Gong P, Tai L, Li X, Wang X, Zhao C et al. Extracellular Vesicles Secreted by *Neospora caninum* are Recognized by Toll-Like Receptor 2 and Modulate Host Cell Innate Immunity Through the MAPK Signaling Pathway. Front. Immunol. 2018; 9:1633.
- Li S, Yang J, Wang L, Du F, Zhao J, Fang R. Expression profile of microRNAs in porcine alveolar macrophages after *Toxoplasma gondii* infection. Parasites & Vectors. 2019; 12:65.
- Li Y, Liu Y, Xiu F, Wang J, Cong H, He S et al. Characterization of exosomes derived from *Toxoplasma gondii* and their functions in modulating immune responses. International Journal of Nanomedicine. 2018a; 13:467–477.
- Li Y, Xiu F, Mou Z, Xue Z, Du H, Zhou C et al. Exosomes derived from *Toxoplasma gondii* stimulate an inflammatory response through JNK signaling pathway. Nanomedicine (Lond.). 2018b; 13(10):1157–1168.
- Lima TS, Lodoen MB. Mechanisms of Human Innate Immune Evasion by *Toxoplasma gondii*. Front. Cell. Infect. Microbiol. 2019; 9:103.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-2\Delta\Delta C_T}$ Method. Methods. 2001; 25:402–408.
- Lüder CGK, Rahman T. Impact of the host on *Toxoplasma* stage differentiation. Microbial Cell. 2017; 4(7).

Luo J, Wan J, Tang Z, Shen S. Identification of novel antigens for serum IgG diagnosis of human toxoplasmosis. *Experimental Parasitology*. 2019; 204:e107722.

Ma F, Xu S, Liu X, Zhang Q, Xu X, Liu M et al. The microRNA miR-29 controls innate and adaptive immune responses to intracellular bacterial infection by targeting interferon- γ . *Nature Immunology*. 2011; 12(90).

Maia MM, Meira-Strejevitch CS, Pereira-Chiocola VL, de Hippólito DDC, Silva VO, Brandão de Mattos CC et al. Evaluation of gene expression levels for cytokines in ocular toxoplasmosis. *Parasite Immunol*. 2017; 39(10).

Malta JMAS, Cabral CM, da Nóbrega AA, Leal e Leite P, Alves RMS, de Almeida SML et al. Surto de toxoplasmose no município de Gouveia, Minas Gerais. *J. Health Biol Sci*. 2019; 7(3):233-241.

Mantel P, Marti M. The role of extracellular vesicles in *Plasmodium* and other protozoan parasites. *Cell Microbiol*. 2014; 16(3):344–354.

Marti M, Johnson PJ. Emerging roles for extracellular vesicles in parasitic infections. *Current Opinion in Microbiology*. 2016; 32:66–70.

Martinez VO, Lima FWM, Carvalho CF, Menezes-Filho JA. *Toxoplasma gondii* infection and behavioral outcomes in humans: a systematic review. *Parasitology Research*. 2018; 117:3059–3065.

Meira CS, Costa-Silva TA, Vidal JE, Ferreira IMR, 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. *Journal of Medical Microbiology*. 2008; 57:845–850.

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. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2011; 71:279–285.

Meira CS, Pereira-Chiocola VL, Vidal JE, de Mattos CC, Motoie G, Costa-Silva TA et al. Cerebral and ocular toxoplasmosis related with IFN- γ , TNF- α , and IL-10 levels. *Front Microbiol.* 2014; 5:492.

Meira-Strejevitch CS, Pereira IS, Hippólito DDC, Maia MM, da Cruz AB, Gava R et al. Ocular toxoplasmosis associated with up-regulation of miR-155-5p/miR-29c-3p and down-regulation of miR-21-5p/miR-125b-5p. *Cytokine.* 2020; 127:e154990.

Melchor SJ, Ewald SE. Disease Tolerance in *Toxoplasma* Infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019; 9:185.

Melo MB, Jensen KDC, Saeij JPJ. *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response. *Trends Parasitol.* 2011; 27(11):487–495.

Mesquita RT, Ziegler ÂP, Hiramoto RM, Vidal JE, Pereira-Chiocola VL. Real-time quantitative PCR in cerebral toxoplasmosis diagnosis of Brazilian human immunodeficiency virus-infected patients. *J Med Microbiol.* 2010; 59(6):641-647.

Minuzzi CE, Portella LP, Braunig P, Sangioni LA, Ludwig A, Ramos LS et al. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from placental tissues of pregnant women who received toxoplasmosis treatment during an outbreak in southern Brazil. *PLoS ONE.* 2020; 15(1): e0228442.

Montoya JG, Remington JS. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin Infect Dis.* 2008; 47:554–66.

Nogueira PM, Ribeiro K, Silveira ACO, Campos JH, Martins-Filho OA, Bela SR et al. Vesicles from different *Trypanosoma cruzi* strains trigger differential innate and chronic immune responses. *Journal of Extracellular Vesicles.* 2015; 4:28734.

Ozer J, Ratner M, Shaw M, Bailey W, Schomaker S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology.* 2008; 245:194–205.

- Pappas G, Roussos N, Falagas ME. Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *International Journal for Parasitology*. 2009; 39:1385–1394.
- Paris L. Toxoplasmosis. *Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases*. 2020; 10:803-813.
- Pavesio CEN, Chiappino ML, Setzer PY, Nichols BA. *Toxoplasma gondii*: differentiation and death of bradyzoites. *Parasitol Res*. 1992; 78:1-9.
- Pereira IS, Maia MM, da Cruz AB, Telles JPM, Vidal JE, Gava R, Meira-Strejevitch CS, Pereira-Chiocola VL. Plasma extracellular microRNAs are related to AIDS/cerebral toxoplasmosis co-infection. *Parasite Immunol*. 2020; 42(4):e12696.
- Pereira KS, Franco RMB, Leal DAG. Transmission of Toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*) by Foods. *Advances in Food and Nutrition Research*. 2010; 60:1-19.
- Pereira-Chiocola VL, Vidal JE, Su C. *Toxoplasma gondii* infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients. *Future Microbiol*. 2009; 4(10):1363-79.
- Pifer R, Yarovinsky F. Innate responses to *Toxoplasma gondii* in mice and humans. *Trends in Parasitology*. 2011; 27(9).
- Pinto-Ferreira F, Mitsuka-Breganó R, Monica TC, Martins FDC, de Matos RLN, Mareze M et al. Investigation and environmental analysis of samples from outbreak of toxoplasmosis at research institution in Londrina, Paraná, Brazil, 2016. *Braz. J. Vet. Parasitol*. 2019; 28(3):518-521.
- Ramírez-Flores CJ, Cruz-Mirón R, Mondragón-Castelán ME, González-Pozos S, Ríos-Castro E, Mondragón-Flores R. Proteomic and structural characterization of self-assembled vesicles from excretion/secretion products of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Proteomics*. 2019a; 208:103490.

- Ramírez-Flores CJ, Cruz-Mirón R, Arroyo R, Mondragón-Castelán ME, Nopal-Guerrero T, González-Pozos S et al. Characterization of metalloproteases and serine proteases of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and their effect on epithelial cells. *Parasitol Res.* 2019b; 118:289–306.
- Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* 2013; 200(4):373–383.
- Reynoso R, Laufer N, Hackl M, Skalicky S, Monteforte R, Turk G et al. MicroRNAs differentially present in the plasma of HIV elite controllers reduce HIV infection in vitro. *Sci. Rep.* 2014; 4:5915.
- Robert-Gangneux F, Dardé ML. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews.* 2012; 25(2):264–296.
- Saadatnia G, Golkar M. A review on human toxoplasmosis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases.* 2012; 44:805–814.
- Saadatnia G, Mohamed Z, Ghaffarifar F, Osman E, Moghadam ZK, Noordin M. *Toxoplasma gondii* excretory secretory antigenic proteins of diagnostic potential. *APMIS.* 2012; 120:47–55.
- Saçar MD, Bagei C, Allmer J. Computational Prediction of MicroRNAs from *Toxoplasma gondii* Potentially Regulating the Hosts' Gene Expression. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2014; 12:228–238.
- Saeij JPJ, Boyle JP, Boothroyd JC. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends in Parasitology.* 2005; 21(10).
- Sasai M, Pradipta A, Yamamoto M. Host immune responses to *Toxoplasma gondii*. *International Immunology.* 2018; 30(3):113–119.
- Sasai M, Yamamoto M. Innate, adaptive, and cell-autonomous immunity against *Toxoplasma gondii* infection. *Experimental & Molecular Medicine.* 2019; 51:156.

Shapiro K, Bahia-Oliveira L, Dixon B, Dumètre A, de Wit LA, VanWormer E, Villena I. Environmental transmission of *Toxoplasma gondii*: Oocysts in water, soil and food. *Food and Waterborne Parasitology*. 2019; 12:e00049.

Sheedy FJ. Turning 21: induction of miR-21 as a key switch in the inflammatory response. *Front Immunol*. 2015; 6:19.

Sibley LD, Khan A, Ajioka JW, Rosenthal BM. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. *Phil. Trans. R. Soc. B*. 2009; 364:2749–2761.

Silva VO, Maia MM, Torrecilhas AC, Taniwaki NN, Namiyama GM, Oliveira KO et al. Extracellular vesicles isolated from *Toxoplasma gondii* induce host immune response. *Parasite Immunology*. 2018; 40:e12571.

Silverman JM, Clos J, Horakova E, Wang AY, Wiesgigl M, Kelly I et al. *Leishmania* Exosomes Modulate Innate and Adaptive Immune Responses through Effects on Monocytes and Dendritic Cells. *J Immunol*. 2010; 185(9):5011-5022.

Souza W, Martins-Duarte ES, Lemgruber L, Attias M, Vommaro RC. Organização estrutural do taquizoíto de *Toxoplasma gondii*. *Scientia Medica*. 2010; 20(1):131-143.

Steiner DF, Thomas MF, Hu JK, Yang Z, Babiarz JE, Allen CDC et al. MicroRNA-29 Regulates T-Box Transcription Factors and Interferon- γ Production in Helper T Cells. *Immunity*. 2011; 35(2):169–181.

Szatanek R, Baj-Krzyworzeka M, Zimoch J, Lekka M, Siedlar M, Baran J. The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization. *Int. J. Mol. Sci*. 2017; 18:1153.

Szempruch AJ, Dennison L, Kieft R, Harrington JM, Hajduk SL. Sending a message: extracellular vesicles of pathogenic protozoan parasites. *Nat Rev Microbiol*. 2016; 14(11):669-675.

Tai Y, Chu P, Lee B, Chen K, Yang C, Kuo W, Shen T. Basics and applications of tumor-derived extracellular vesicles. *Journal of Biomedical Science*. 2019; 26:35.

Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines, *Journal of Extracellular Vesicles*. 2018; 7(1):e1535750.

Torrecilhas AC, Schumacher RI, Alves MJM, Colli W. Vesicles as carriers of virulence factors in parasitic protozoan diseases. *Microbes and Infection*. 2012; 14(15):1465-1474.

Tu V, Yakubu R, Weiss LM. Observations on Bradyzoite Biology. *Microbes Infect*. 2018; 20(9-10):466–476.

Van der Pol E, Coumans FAW, Grootemaat AE, Gardiner C, Sargent IL, Harrison P, Sturk A et al. Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission electron microscopy, flow cytometry, nanoparticle tracking analysis, and resistive pulse sensing. *J. Thromb. Haemost*. 2014; 12:182–1192.

VanWormer E, Fritz H, Shapiro K, Mazet JAK, Conrad PS. Molecules to modeling: *Toxoplasma gondii* oocysts at the human–animal–environment interface. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2013; 36(3): 217–231.

Wang J, Zhang N, Li T, He J, Elsheikha HM, Zhu X. Advances in the Development of Anti-*Toxoplasma gondii* Vaccines: Challenges, Opportunities, and Perspectives. *Trends in Parasitology*. 2019; 35(3).

Wang R, He L, Zhou S. The role of gene sculptor microRNAs in human precancerous lesions. *OncoTargets and Therapy*. 2018; 11:5667–5675.

Wang S, Zhang Z, Wang Y, Gadahi JA, Xie Q, Xu L et al. *Toxoplasma gondii* excretory/secretory antigens (TgESAs) suppress pro-inflammatory cytokine secretion by inhibiting TLR-induced NF- κ B activation in LPS-stimulated murine macrophages. *Oncotarget*. 2017; 8(51):88351-88359.

Wang X, Dong Y, Fang T, Wang X, Chen L, Zheng C et al. Circulating MicroRNA-423-3p Improves the Prediction of Coronary Artery Disease in a General Population. *Circ J*. 2020; 84:1155–1162.

Wei B, Pei G. microRNAs: critical regulators in Th17 cells and players in diseases. *Cellular & Molecular Immunology*. 2010; 7:175–181.

Wowk PF, Maria Luisa Zardo*, Halisson Tesseroli Miot, Samuel Goldenberg, Paulo Costa Carvalho and Patricia Alves Morking. Proteomic profiling of extracellular vesicles secreted from *Toxoplasma gondii*. *Proteomics* 17, 15–16, 2017, 1600477

Wu Z, Wang L, Li J, Wang L, Wu Z, Sun X. Extracellular Vesicle-Mediated Communication Within Host-Parasite Interactions. *Front. Immunol*. 2019; 9:3066.

Xia L, Corbett AL, Taatizadeh E, Tasnim N, Little JP, Garnis C et al. Challenges and opportunities in exosome research — Perspectives from biology, engineering, and cancer therapy. *APL Bioeng*. 2019; 3:e011503.

Xiao J, Yolken RH. Strain hypothesis of *Toxoplasma gondii* infection on the outcome of human diseases. *Acta Physiol (Oxf)*. 2015; 213(4):828–845.

Xu MJ, Zhou DH, Huang SY, Zhao FR, Nisbet AJ, Lin RQ, Song HQ, Zhu XQ. Comparative characterization of microRNA profiles of different genotypes of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*. 2013; 140:1111–1118.

Yang Y, Lin X, Lu X, Luo G, Zeng T, Tang J et al. Interferon–microRNA signalling drives liver precancerous lesion formation and hepatocarcinogenesis. *Gut*. 2016; 65(7):1186–1201.

Yifat O, Meta H, Neta R. Pathogen-derived extracellular vesicles coordinate social behaviour and host manipulation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2017; 67:83-90.

Zeiner GM, Boothroyd JC. Use of two novel approaches to discriminate between closely related host microRNAs that are manipulated by *Toxoplasma gondii* during infection. *RNA*. 2010; 16:1268–1274.

Zeiner GM, Norman KL, Thomson JM, Hammond SM, Boothroyd JC. *Toxoplasma gondii* Infection Specifically Increases the Levels of Key Host MicroRNAs. PLoS ONE. 2010; 5(1):e8742.

Zhang K, Lin G, Han Y, Jinming L. Serological diagnosis of toxoplasmosis and standardization. Clinica Chimica Acta. 2016; 461:83–89.

Zhang Y, Lai BS, Juhas M, Zhang Y. *Toxoplasma gondii* secretory proteins and their role in invasion and pathogenesis. Microbiological Research. 2019; 227:e126293.

Zhou C, Ai Z, Huang C, Guo J, Cong H, He S, Zhu X. miRNA and circRNA expression patterns in mouse brain during toxoplasmosis development. BMC Genomics. 2020; 21:46.

Zhu W, Li J, Pappoe F, Shen J, Yu L. Strategies Developed by *Toxoplasma gondii* to Survive in the Host. Front. Microbiol. 2019; 10:899.

ANEXO 1 – Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Adolfo Lutz (CEUA-IAL)



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CEUA-IAL



ANEXO E

São Paulo, 30 de agosto de 2018.

Protocolo 01/2018.

Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Adolfo Lutz (CEUA-IAL)

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado “**Estudo das vesículas extracelulares de *Toxoplasma gondii* e a correlação com o sistema imune de hospedeiros infectados**”, sob a responsabilidade da **Dra. Vera Lúcia Pereira Chioccola**, funcionária do Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz - Central, que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, com o decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação (CONCEA). Este Projeto foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Adolfo Lutz (CEUA-IAL) na **81ª** reunião realizada em **21/08/2018**.

Informamos que devem ser encaminhados relatórios **ANUAIS** à CEUA-IAL, no intuito de acompanharmos os procedimentos realizados segundo os aspectos éticos e sanitários, os quais permitirão a elaboração de relatórios anuais por esta CEUA-IAL, que são encaminhados ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), conforme a Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008.

Vigência do Projeto	21/08/2018 a 01/05/2020
Espécie	Camundongos isogênicos
Linhagem	A/SN
Nº de animais	87
Idade	8 a 10 semanas
Peso	Aproximadamente 20 gramas
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério do Instituto Adolfo Lutz

Atenciosamente,

Dra. Raquel dos Anjos Fazioli
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-IAL)
Instituto Adolfo Lutz

RAF/raf

Endereço: Avenida Doutor Arnaldo, nº 351 - 11º Andar – Salas 1102
Pacaembu - São Paulo – SP – CEP: 01246-000
Tel: (11) 3068-2887 – e-mail: ceua@ial.sp.gov.br

ANEXO 2 – Comitê de Ética Humana CONEP-IAL/SES e CEP/Plataforma Brasil

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: Documento 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 consubstanciado 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 consubstanciado 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 CEPIAL 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