
Resumo

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

Valéria Oliveira Silva; Vera Lucia Pereira-Chioccola (orientadora)

Programa de Pós-Graduação em Ciências. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, Brasil – 2018.

RESUMO

Toxoplasma gondii, protozoário causador da toxoplasmose, é transmitido dos animais para os seres humanos pela ingestão de carne infectada ou por oocistos libertados pelos felinos no ambiente. Nos seres humanos, a infecção é normalmente assintomática, mas em casos em que a infecção primária ocorre durante a gravidez pode ocasionar malformações neonatais. Em pacientes como Aids ocorre a reativação da infecção latente, com episódios de proliferação do parasita, causando a doença sintomática, como a toxoplasmose cerebral ou disseminada. Nas últimas décadas tem se estudado pequenas estruturas secretadas pelas células procarióticas e eucarióticas denominadas de vesículas extracelulares (EVs). Estas pequenas estruturas podem ser isoladas por ultracentrifugação, cromatografia e examinadas por microscopia eletrônica. Elas participam na comunicação entre as células, na transferência de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Além disso, as EVs podem transportar biomarcadores de doenças, macromoléculas biorreativas contribuindo para a patogênese das doenças. Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo estabelecer um protocolo para isolar e caracterizar vesículas extracelulares produzidas e excretadas por taquizoítos da cepa RH de *T. gondii*. Para atingir este objetivo, taquizoítos provenientes de culturas de células VERO foram isolados dos sobrenadantes das culturas e centrifugados em cinco séries de lavagens. A seguir, foram incubados em meio de cultura por 24 horas para secreção das EVs. Então, investigou-se o tamanho e concentração das EVs isoladas por análise de varredura de partículas (NTA) no equipamento NanoSight. Paralelamente, a morfologia e a liberação das EVs também foram investigadas por microscopia eletrônica de transmissão e de varredura. Então, as EVs foram purificadas por cromatografia em gelexclusão em alíquotas de 1 mL (24-32 frações) e imunoselecionadas por ELISA utilizando um “pool” de soros reagente para toxoplasmose. A seguir foi investigado a presença de miRNA nas EVs; e finalmente, foi avaliado o perfil proteico das EVs de *T. gondii* para verificar por testes sorológicos se estas partículas poderiam ser reconhecidas pelo sistema imune hospedeiro. Os resultados mostraram que o protocolo para recuperação das EVs de *T. gondii* foi estabelecido a partir de 1 a 10¹⁰ taquizoítos obtidos de cultura células. As análises realizadas por NTA permitiram determinar que cerca de 1 x 10⁶ taquizoítos secretaram de 4 a 8 x 10⁸ EVs/mL num período de 24 horas de incubação em meio de cultura. Adicionalmente, estas vesículas apresentaram morfologia e tamanho de 165-175 nm de diâmetro, tamanho correspondente as microvesículas. Estes resultados também foram confirmados pela avaliação das imagens fornecidas pelas microscopias eletrônicas de transmissão e varredura. As purificações de miRNA a partir das EVs e posterior corrida eletroforética micro fluídica confirmaram a presença de smallRNA e miRNA nas vesículas. As análises por SDS-PAGE mostram que as proteínas carregadas pelas EVs apresentaram um perfil eletroforético com espectro de 15 a 70 kDa. Soros de camundongos cronicamente infectados (com 2 diferentes cepas de *T. gondii*) e humanos reconheceram distintos padrões eletroforéticos no immunoblotting.

PALAVRAS-CHAVE: Toxoplasma. Toxoplasmose. Cromatografia. Vesículas extracelulares. Microscopia eletrônica e Nanopartículas.

Abstract

Purification and characterization of Extracellular Vesicles from *Toxoplasma gondii* tachyzoites

Valéria Oliveira Silva; Vera Lucia Pereira-Chioccola (orientadora)

Programa de Pós-Graduação em Ciências. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, Brasil – 2018.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii, a protozoan that causes toxoplasmosis, is transmitted from animals to humans through ingestion of infected meat or oocysts released by felines into the environment. In humans, the infection is usually asymptomatic, but in cases where primary infection occurs during pregnancy it can lead to neonatal malformations. In patients such as AIDS, reactivation of latent infection occurs, with episodes of parasite proliferation, causing symptomatic disease, such as cerebral or disseminated toxoplasmosis. In the last decades, small structures secreted by prokaryotic and eukaryotic cells called extracellular vesicles (EVs) were studied. These small structures can be isolated by ultracentrifugation, chromatography and examined by electron microscopy. EVs participate in the communication between cells, transfer of proteins, lipids and nucleic acids. In addition, they can carry disease biomarkers, bioreactive macromolecules contributing to the pathogenesis of diseases. In view of the above, the present study aimed to establish a protocol to isolate and characterize extracellular vesicles produced and excreted by tachyzoites of *T. gondii* RH strain. To achieve this goal, tachyzoites from VERO cell cultures were isolated from the culture supernatants and centrifuged in five sets of washes. Next, they were incubated in culture medium for 24 hours for secretion of the EVs. The size and concentration of the isolated EVs by particle scan analysis (NTA) were investigated on the NanoSight (NTA) equipment. In parallel, the morphology and the release of the EVs were also investigated by transmission and scanning electron microscopy. Then, EVs were purified by gel-exclusion chromatography in 1 ml aliquots (24-32 fractions) and immuno-selected by ELISA using a pool of reagent sera for toxoplasmosis. Next, the presence of miRNA in the EVs was investigated; and finally, the protein profile of *T. gondii* EVs was evaluated and verified by serological tests if these particles could be recognized by the host immune system. The results showed that the protocol for recovery of *T. gondii* EVs was established from 1 to 1010 tachyzoites obtained from cultured cells. Analyzes performed by NTA allowed us to determine that about 1×10^6 tachyzoites secreted 4 to 8×10^8 EVs / mL within 24 hours of incubation in culture medium. Additionally, these vesicles presented morphology and size of 165-175 nm of diameter, corresponding microvesicles size. These results were also confirmed by the evaluation of images provided by transmission and scanning electron microscopy. The miRNA purifications from the EVs and subsequent microfluidic electrophoretic run confirmed the presence of smallRNA and miRNA in the vesicles. SDS-PAGE analyzes show that the proteins carried by the EVs showed an electrophoretic profile with a spectrum of 15 to 70 kDa. Sera from chronically infected mice (with 2 different strains of *T. gondii*) and humans recognized distinct electrophoretic patterns in immunoblotting.

KEYWORDS: Toxoplasma. Toxoplasmosis. Chromatography. Extracellular Vesicles. Electron Microscopy and Nanoparticles.