

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO CARLOS CHAGAS

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia

AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS NA
INFECÇÃO POR *TOXOPLASMA GONDII* E A PARTICIPAÇÃO DE
VESÍCULAS EXTRACELULARES NO CONTEXTO INFECCIOSO

LUIZ FERNANDO CARDOSO GARCIA

Curitiba
2020



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia

LUIZ FERNANDO CARDOSO GARCIA

Avaliação da Ativação de Células Endoteliais na Infecção por *Toxoplasma gondii* e a Participação de Vesículas Extracelulares no Contexto Infeccioso

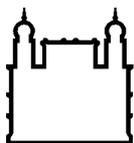
Dissertação apresentada ao Instituto Carlos Chagas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Dra. Letusa Albrecht

Curitiba

2020

ii



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia

Garcia, Luiz Fernando Cardoso.

Avaliação da ativação de células endoteliais na infecção por *Toxoplasma gondii* e a participação de vesículas extracelulares no contexto infeccioso. / Luiz Fernando Cardoso Garcia. - Curitiba, 2020.

85 f.; il.

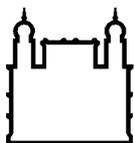
Dissertação (Mestrado) - Instituto Carlos Chagas, Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, 2020.

Orientadora: Letusa Albrecht.

Bibliografia: f. 86-101

1. Toxoplasmose. 2. Endotélio. 3. Alteração gênica. 4. Moléculas de adesão. 5. Exossomas. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia

AUTOR: LUIZ FERNANDO CARDOSO GARCIA

**AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS NA INFECÇÃO POR
TOXOPLASMA GONDII E A PARTICIPAÇÃO DE VESÍCULAS
EXTRACELULARES NO CONTEXTO INFECCIOSO**

ORIENTADORA: Prof. Dra. Letusa Albrecht

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Priscilla Fanini Wowk
Prof. Dr. Marcel Ivan Ramirez Araya
Dra. Thaís Cabral Monica

(Instituto Carlos Chagas-FIOCRUZ/PR)
(Universidade Federal do Paraná-UFPR)
(Instituto Carlos Chagas-FIOCRUZ/PR)

Curitiba, 27 de fevereiro de 2020.

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço aos meus pais que, mesmo a partir de uma origem simples, concederam-me a oportunidade de ingressar no universo da ciência.

Meus mais profundos agradecimentos à minha mentora e orientadora Letusa Albrecht por ter depositado a confiança no trabalho de um humilde estudante de Medicina Veterinária. Você tem o dom de encontrar a luz onde – até – nós mesmos acreditamos haver apenas penumbra.

Agradeço a meu grande amigo Paulo Seytaro Suzuki por me conduzir de volta aos trilhos da ciência quando pensei não ser capaz. O impacto foi muito maior do que pareceu.

Meu muitíssimo agradecimento à minha colega de profissão e amiga Gabriela Ribas Mendes por incansavelmente lembrar o caminho que eu devia tomar todas as vezes que me encontrei em meio ao desânimo.

Meus agradecimentos a meu amigo e colega Bernardo Gabiatti pelas excelentes conversas de corredor ou bancada. Às vezes bastam algumas palavras para voltarmos a acreditar em nossos esforços.

Agradeço imensamente ao Instituto Carlos Chagas e ao seu Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia pela oportunidade, qualidade e estrutura ofertados aos estudantes de pós-graduação.

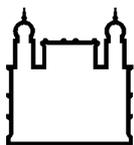
Agradeço à toda equipe do Laboratório de Estudo em Apicomplexa por todo suporte ofertado seja material ou intelectual.

Meus agradecimentos à toda equipe do Laboratório de Regulação da Expressão Gênica por humildemente ceder seu espaço e equipamentos. Sem sua contribuição, esse trabalho perderia, em grande parte, sua qualidade.

Agradeço ao Programa para Desenvolvimento tecnológico em Ferramentas para a Saúde-PDTIS-FIOCRUZ pela oferta do valoroso Sistema de Plataformas e seus técnicos altamente qualificados.

*“E aqueles que foram vistos dançando
foram julgados insanos por aqueles que
não podiam escutar a música”.*

Nietzsche, F.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

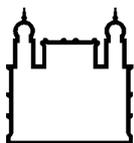
AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS NA INFECÇÃO POR *TOXOPLASMA GONDII* E A PARTICIPAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES NO CONTEXTO INFECCIOSO

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA

Luiz Fernando Cardoso Garcia

Introdução: *Toxoplasma gondii* é um protozoário pertencente ao filo Apicomplexa identificado pela primeira vez em 1908. Ele é capaz de invadir praticamente todas as células nucleadas, dentre elas encontram-se as células endoteliais. Células endoteliais, além de constituir a principal barreira entre os elementos do sangue e os tecidos, também possuem forte vínculo com o sistema imune. Elas respondem a diferentes estímulos como alterações vasculares, agentes infecciosos ou vesículas extracelulares (VEs) secretadas por diferentes células ou mesmo agentes invasores. **Objetivo:** avaliar a ativação e disfunção de células endoteliais humanas no contexto da infecção por *T. gondii*. **Material e Métodos:** foram cultivadas células HBMEC (células endoteliais da microvasculatura cerebral humana) e HUVEC (células endoteliais do cordão umbilical humano) as quais foram infectadas por *T. gondii*. A partir disso, foi avaliada a expressão de genes relacionados à ativação/disfunção endotelial e, a nível proteico, a expressão de ICAM-1 e VCAM-1. VEs isoladas de células endoteliais infectadas com *T. gondii* foram caracterizadas e a carga parasitária de células endoteliais estimuladas com essas VEs foi analisada. Por fim, foi realizada a análise proteômica de VEs produzidas por células endoteliais e por *T. gondii*. **Resultados:** células endoteliais apresentaram taxas de infecção e carga parasitária distintas. Na avaliação transcricional, foi observado um aumento de expressão de *IL6*, *IL8*, *SOCS3*, *MCP1*, *VCAM1* e *VEGF* apenas nas células HUVEC. Células HUVEC infectadas expressaram ICAM-1 e VCAM-1 ao passo que células HBMEC expressaram apenas ICAM-1. Foi observado um aumento na infecção de 14,95% para 22,22% em células HBMEC estimuladas com VEs de *T. gondii*. Quando as mesmas células foram estimuladas com VEs de HBMEC infectadas a taxa de infecção foi reduzida para 5,36%. Na análise proteômica, foi observado que VEs de células HBMEC infectadas apresentaram proteínas relacionada às junções de ancoragem, aderente e célula-substrato. **Discussão:** Enquanto células HUVEC apresentaram um perfil pró-inflamatório, células HBMEC apresentaram uma resposta menos intensa. Além disso, mesmo com uma resposta à infecção mais discreta, células HBMEC apresentaram uma menor taxa de infecção do que células HUVEC e ao serem estimuladas com VEs de células infectadas, houve uma redução na taxa de infecção. **Conclusão:** células endoteliais de diferentes linhagens respondem de forma distinta à infecção por *T. gondii*.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

EVALUATION OF ENDOTHELIAL CELLS ACTIVATION IN THE INFECTION BY *TOXOPLASMA GONDII* AND THE PARTICIPATION OF EXTRACELULAR VESICLES IN THE INFECTIOUS CONTEXT

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

Luiz Fernando Cardoso Garcia

Introduction: *Toxoplasma gondii* is a protozoan belonged to the phylum Apicomplexa which was identified for the first time in 1908. It is capable of invade almost all the nucleated cells, among them, the endothelial cells. Endothelial cells constitute the main barrier between the elements of the blood and tissues, they also have a strong link with the immune system. They respond to different stimulus such like vascular alterations, infectious agents, or extracellular vesicles (EVs) secreted by different cells or even invading agents. **Objective:** to evaluate the activation and disfunction of human endothelial cells in the infectious context caused by *T. gondii*. **Material and methods:** HBMEC (human brain microvascular endothelial cell) and HUVEC (human umbilical vein endothelial cell) were cultivated and infected with *T. gondii*. From that, it was evaluated the gene expression related to the endothelial activation/disfunction and, in protein level, the expression of ICAM-1 and VCAM-1. EVs from infected endothelial cells were characterized and the parasitic burden of endothelial cells when stimulated with EVs from the parasite or from infected cell was evaluated. At last, it was accomplished the proteomic analysis of EV from endothelial cells and *T. gondii*. **Results:** endothelial cells present distinct infection and parasitic burden rate. In the transcriptional evaluation, it was observed an increasing level of *IL6*, *IL8*, *SOCS3*, *MCP1*, *VCAM1* and *VEGF* only in HUVEC. Infected HUVEC expressed, in a protein level, ICAM-1 and VCAM-1 while HBMEC expressed only ICAM-1. It was observed an increase of infection from 14.95% to 22.22% in HBMEC stimulated with *T. gondii* EVs. When the same cells were stimulated with EVs from infected cells, there was a reduction of infection to 5.36%. In the proteomic analysis, it was identified anchoring, adherent and cell-substrate junction proteins in infected HBMEC EVs. **Discussion:** While HUVEC presented a proinflammatory profile, HBMEC presented a less intense response. Moreover, even with a discreet response to the infection, HBMEC presented a lower infection rate comparing to HUVEC and when they were stimulated with EV from infected cells, there were a reduction of the infection rate. **Conclusion:** endothelial cells respond in a distinct way when infected by *T. gondii*.

ÍNDICE

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	1
1.2 O endotélio.....	7
1.3 O sistema imune.....	12
1.3.1 <i>Toxoplasma gondii</i> e o sistema imune hospedeiro	14
1.4 Vesículas extracelulares	16
1.5 Justificativa.....	20
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo Geral	22
2.2 Objetivos Específicos	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Cultivo das Células NHDF.....	23
3.2 Cultivo de células endoteliais da microvasculatura cerebral humana (HBMEC)	23
3.3 Cultivo de células endoteliais do cordão umbilical humano (HUVEC).....	24
3.4 Avaliação de contaminação por <i>Mycoplasma spp.</i>	24
3.5 Cultivo de <i>Toxoplasma gondii</i>	25
3.6 Depleção de soro fetal bovino.....	25
3.7 Isolamento de vesículas extracelulares	26
3.8 Caracterização das vesículas extracelulares.....	27
3.9 Avaliação da expressão gênica de células endoteliais expostas ao <i>T. gondii</i>	28
3.9.1 Extração e avaliação da qualidade do RNA.....	28
3.9.2 Quantificação dos transcritos por qPCR	29
3.10 Ensaio de citotoxicidade de vesículas extracelulares	30
3.11 Ensaio de invasão	30
3.12 Avaliação da infecção por <i>T. gondii</i> e expressão de moléculas de adesão em células endoteliais por citometria de fluxo.....	31

3.13	Avaliação <i>T. gondii</i> por microscopia eletrônica de varredura.....	32
3.14	Avaliação de vesículas extracelulares e taquizoítas de <i>T. gondii</i> por microscopia eletrônica de transmissão.....	33
3.14.1	Preparo de taquizoítas para microscopia eletrônica de transmissão	34
3.15	Preparo de extrato proteico para eletroforese.....	34
3.16	Avaliação do conteúdo proteico em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata	35
3.17	Preparo e avaliação do conteúdo proteico de vesículas extracelulares	36
3.17.1	Excisão do gel e preparo das amostras.....	36
3.17.2	Purificação e eluição de peptídeos	37
3.18	Análises Estatísticas.....	38
4	RESULTADOS	39
4.1	A carga parasitaria em células HUVEC é maior que em células HBMEC	39
4.2	Células endoteliais infectadas com o <i>T. gondii</i> apresentam alterações transcricionais distintas.....	41
4.3	Infecção de células endoteliais por <i>T. gondii</i> promove alteração na expressão de moléculas de adesão na superfície celular de forma independente da expressão transcricional	47
4.4	Caracterização das vesículas extracelulares de <i>T. gondii</i> e de células HBMEC e HUVEC.....	53
4.5	Vesículas extracelulares de células HBMEC infectadas podem dificultar a invasão parasitaria enquanto que vesículas extracelulares de <i>T. gondii</i> favorecem o processo infeccioso.....	56
5	DISCUSSÃO	72
5.1	Células endoteliais apresentam perfis distintos quando infectadas por <i>T. gondii</i>.....	72
5.2	Vesículas extracelulares no contexto infeccioso.....	78
	CONCLUSÕES	85
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

APÊNDICE A – INICIADORES SELECIONADOS PARA QPCR	102
APÊNDICE B – PROTEÍNAS EXCLUSIVAS DE TGVE	104
APÊNDICE C – PROTEÍNAS EXCLUSIVAS DE HBTGVE	105
APÊNDICE D – PROTEÍNAS EXCLUSIVAS DE HUVE	106
APÊNDICE E – PROTEÍNAS EXCLUSIVAS DE HUTGVE	110

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Relação entre presa e predador na era Paleolítica.....	2
Figura 1.2 – Representação esquemática do ciclo de vida de <i>T. gondii</i>	3
Figura 1.3 – Demonstração experimental da função de válvulas venosas.....	8
Figura 1.4 – Mecanismos que estimulam a mudança de <i>T. gondii</i> para taquizoítas ou bradizoítas.	16
Figura 1.5 – Liberação de exossomas e microvesículas.	18
Figura 4.1 – Taxa de infecção por <i>T. gondii</i> e número de taquizoítas intracelulares são diferentes entre células endoteliais.	40
Figura 4.2 – Avaliação da curva padrão para <i>GAPDH</i> e <i>ACTINAB</i> em células endoteliais.....	42
Figura 4.3 – Células HUVEC infectadas por <i>T. gondii</i> apresentam alterações transcricionais relacionadas à inflamação enquanto células HBMEC mantém uma transcrição basal.....	44
Figura 4.4 – Células HUVEC infectadas por <i>T. gondii</i> apresentam um aumento de expressão de <i>VCAM1</i>	45
Figura 4.5 – Células HUVEC infectadas por <i>T. gondii</i> apresentaram um aumento da expressão de <i>VEGF</i> enquanto células HBMEC mantiveram a expressão basal.	46
Figura 4.6 – Células endoteliais infectadas com <i>T. gondii</i> apresentaram uma regulação negativa de genes relacionados à coagulação.....	46
Figura 4.7 – Células HUVEC e HBMEC infectadas por <i>T. gondii</i> mantiveram uma expressão basal de genes relacionados à disfunção endotelial.	47
Figura 4.8 – Células endoteliais estimuladas com PBS ou TNF expressam ICAM-1 em sua superfície.....	48
Figura 4.9 – Células HBMEC incubadas com PBS ou TNF não expressam VCAM-1 em sua superfície enquanto células HUVEC expressam a proteína. ...	49
Figura 4.10 – Na infecção por <i>T. gondii</i> , há um aumento da expressão de ICAM-1 na superfície de células HBMEC e HUVEC independente da proporção de RNAm.	50
Figura 4.11 – Na infecção por <i>T. gondii</i> , há um aumento da expressão de VCAM-1 na superfície de células HUVEC enquanto células HBMEC não expressaram a molécula.....	52

Figura 4.12 – A taxa de infecção de células endoteliais por <i>T. gondii</i> não se altera com o aumento da expressão de moléculas de adesão.	53
Figura 4.13 – Vesículas extracelulares de <i>T. gondii</i> e de células endoteliais possuem tamanhos distintos.....	54
Figura 4.14 – Células HBMEC infectadas por <i>T. gondii</i> produzem mais vesículas extracelulares e com tamanho diferenciado ao longo da infecção. ..	55
Figura 4.15 – <i>Toxoplasma gondii</i> produz vesículas extracelulares com diferentes tamanhos.	57
Figura 4.16 – VEs oriundas de células infectadas promovem uma redução da infecção de células HBMEC por <i>T. gondii</i> enquanto VEs parasitárias em baixas concentrações favorecem a infecção.....	58
Figura 4.17 – Perfil proteico de VEs de células é diferente após a infecção por <i>T. gondii</i>	59
Figura 4.18 – Perfil proteômico de VEs de células HBMEC é alterado após a infecção das células por <i>T. gondii</i>	60
Figura 4.19 – Perfil proteômico de VEs de células HUVEC é alterado após a infecção das células por <i>T. gondii</i>	63
Figura 4.20 – Proteínas exclusivas de HUVE relacionam-se com processos de endocitose.	66
Figura 4.21 – Células HUVEC não infectadas por <i>T. gondii</i> produzem VEs com proteínas relacionadas à apresentação de antígenos às células T CD8 ⁺ ou NK.	67
Figura 4.22 – VEs de células HUVEC infectadas ou não por <i>T. gondii</i> possuem proteínas relacionadas com a migração leucocitária.	68
Figura 4.23 – VEs de células HUVEC infectadas ou não por <i>T. gondii</i> possuem proteínas relacionadas com a via de sinalização PI3K-AKT.	69
Figura 4.24 – Células HBMEC e HUVEC produzem VEs com um perfil proteômico distinto antes e após a infecção.....	70

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 – Marcadores da ativação e disfunção endotelial.....	11
Tabela 3.1 – Configurações selecionadas para realização da qPCR para detecção de material genético de <i>Mycoplasma</i> spp.	25
Tabela 3.2 – Configurações selecionadas para realização da qPCR.....	29
Tabela 4.1 – Células HBMEC infectadas por <i>T. gondii</i> produzem VEs com perfil proteômico relacionado com sistema imune.....	61
Tabela 4.2 – Células HBMEC infectadas por <i>T. gondii</i> produzem VEs com perfil proteômico diversificado com relação ao local de origem das proteínas.	62
Tabela 4.3 – Células HUVEC infectadas por <i>T. gondii</i> produzem VEs com perfil proteômico diversificado com relação ao local de origem das proteínas.	64
Tabela 4.4 – Células HUVEC infectadas por <i>T. gondii</i> produzem VEs com perfil proteômico diversificado com relação à categoria funcional das proteínas.	65
Tabela 4.5 – Células HBMEC e HUVEC infectadas por <i>T. gondii</i> produzem VEs com diferentes proteínas em comum.....	71

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABC	<i>Avidin-Biotin Complex</i> (complex avidina-biotina)
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> (grupo de diferenciação)
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
CQ	<i>Cycle Quantification</i> (ciclo de quantificação)
DEPC	Dicarbonato de dietila
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (meio <i>Eagle Dulbecco</i> modificado)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent assay</i> (ensaio de imunoabsorbância de enzimas conjugadas)
ET1	<i>Vasoconstrictor Endothelin 1</i> (<i>Endotelina Vasoconstritora 1</i>)
EV	<i>Extracellular Vesicle</i> (vesícula extracelular)
FSC	<i>Foward Scatter</i> (dispersão frontal)
FOXO3	<i>Forkhead Box O3</i> (caixa de forquilha O3)
GO	<i>Gene Ontology</i> (ontologia genética)
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> (proteína fluorescente verde)
GP130r	<i>Glycoprotein 130 receptor</i> (receptor glicoproteína 130)
GTP	Guanosine Triphosphate (trifosfato de guanosina)
HBMEC	<i>Human Brain Microvascular Endothelial Cell</i> (célula endotelial da microvasculatura do cerebral humano)
HBTGVE	Vesícula extracelular de células HBMEC infectadas
HBVE	Vesícula extracelular de células HBMEC
HEGF	<i>Human Endothelial Grow Factor</i> (fator de crescimento endotelial humano)
HFGFB	<i>Human Basic Fibroblast Growth Factor</i> (fator de crescimento de fibroblástico básico humano)
HUTGVE	Vesícula extracelular de células HUVEC infectadas
HUVE	Vesícula extracelular de células HUVEC
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cell</i> (célula endotelial do cordão umbilical humano)
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i> (Molécula de adesão intracelular 1)
IDO	<i>Indoleamine 2,3-dioxygenase</i>
Ig	<i>Immunoglobulin</i> (imunoglobulina)

IGluR	<i>Ligant-Gated Ionotropic Glutamate Receptor</i> (receptor de glutamato ionotrópico bloqueado por ligante)
ILC	<i>Innate Lymphoid Cell</i> (célula linfóide inata)
INOS	<i>Inducible Nitric Oxid Synthase</i> (sintase de óxido nítrico induzível)
JAK	<i>Janus Kinase</i> (<i>Janus</i> quinase)
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas <i>em tandem</i>
MAPK	<i>P38 mitogen-activated protein kinase</i> (proteína quinase ativada por mitógeno P38)
MCP1	<i>Monocyte Chemotactic Protein 1</i> (proteína quimiotática de monócitos 1)
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i> (multiplicidade de infecção)
MTT	<i>3-4,5 dimethylthiazol-2, 5 diphenil tetrazolium bromide</i> (brometo de 3-(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil, 2H-tetrazólico)
NHDF	<i>Normal Human Dermal Fibroblast</i> (fibroblasto de derme humana normal)
NLR	<i>Nod Like Receptor</i> (receptor do tipo Nod)
NMDA	<i>N-Metyl-D-Aspartate</i> (N-metil D-aspartato)
NTA	<i>Nanopartycles TrackingAnalysis</i> (análise de rastreamento de nanopartículas)
<i>p</i>	Probabilidade de Significância
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i> (padrão molecular associado a patógeno)
pH	<i>Hydrogenionic Potential</i> (potencial hidrogeniônico)
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> (tampão fosfato salino)
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i> (receptor de reconhecimento de padrão)
qPCR	<i>Quantitative Polimerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia quantitativa da polimerase)
R3IGF	<i>Insulin-like Growth Factor-1 LongArginine</i> (fator de crescimento similar a insulina, arginina longa)
SAG1	<i>Surface Antigen 1</i> (antígeno de superfície 1)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (dodecil sulfato sódico)
SFB	Soro Fetal Bovino

SOCS3	<i>Suppressor of Cytokine Signaling 3</i> (supressor da sinalização por citocinas 3)
SSC	<i>Side Scatter</i> (dispersão lateral)
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription Proteins</i> (transdutor de sinalização e ativador da transcrição proteica)
T150	Garrafa de Cultivo de 150 cm ²
T25	Garrafa de Cultivo de 25 cm ²
T75	Garrafa de Cultivo de 75 cm ²
TGVE	Vesícula extracelular de <i>Toxoplasma gondii</i>
TLR	<i>Toll Like Receptor</i> (Receptor do tipo <i>Toll</i>)
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (fator de necrose tumoral)
TNFr	<i>Tumor Necrosis Factor receptor</i> (receptor de fator de necrose tumoral)
TPA	Tissue plasminogen activator (ativador de plasminogênio tecidual)
TPBS	<i>Tween Phosphate Buffer Saline</i> (tampão fosfato salino <i>Tween</i>)
VEGF	<i>Vascular Endothelium Growth Factor</i> (fator de crescimento vascular endotelial)
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Protein 1</i> (proteína de adesão de célula vascular 1)
VE	Vesícula Extracelular

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Toxoplasma gondii*

“It is not the strongest of the species that survives, nor the most intelligent that survives. It is the one that is the most adaptable to change”.

Charles Darwin.

Toxoplasma gondii é um protozoário patogênico e zoonótico pertencente ao Filo Apicomplexa (Dubey, 2008). A estimativa do início de sua divergência evolutiva de outros membros do Filo, ocorreu há cerca de 28 milhões de anos em um período intitulado Oligoceno, a terceira época da era Cenozóica (Su *et al.*, 2003). Tal período foi compreendido por uma transição entre a primitiva Era do Eoceno e a Era moderna, caracterizada pelo Mioceno. Neste momento geológico, novas espécies de mamíferos emergiam e, com isso, novas formas de parasitismo (MacFadden, 2006). Tendo em vista seu forte vínculo evolutivo com algas vermelhas, estima-se que *T. gondii* não fosse, necessariamente, um parasito intracelular antes de sua divergência evolutiva, mas microorganismo de vida livre (Coppin *et al.*, 2005). Não obstante, o surgimento de novos potenciais hospedeiro da Era Moderna pode ter contribuído para o desenvolvimento de novos fenótipos parasitários.

Cogita-se a possibilidade de *T. gondii* ter tido seu primeiro vínculo com felídeos ao infectar tigres dente de sabre (*Smilodon spp.* e *Homotherium spp.*) (Figura 1.1). Análises ontológicas e evolutivas demonstram que a presença de determinadas cepas de *T. gondii* na América do Norte corroborariam com tal hipótese (Faith e Surovell, 2009; Minot *et al.*, 2012). Uma vez que *T. gondii* passou a ser albergado por diferentes espécies animais, sua dispersão ao longo de toda a Terra foi facilitada. Estudos genômicos revelaram que uma única linhagem clonal do protozoário foi dispersa ao longo do planeta e, após isso, houve sua diferenciação para as diferentes cepas conhecidas hoje (Sibley e Boothroyd, 1992). Após milhões de anos de evolução, *T. gondii* passou a deter um ciclo de vida complexo. Sua reprodução sexuada ocorre em felídeos, enquanto a fase assexuada ocorre em

praticamente todos os animais de sangue quente incluindo seres humanos (Dubey e Su, 2009).

Figura 1.1 – Relação entre presa e predador na era Paleolítica.



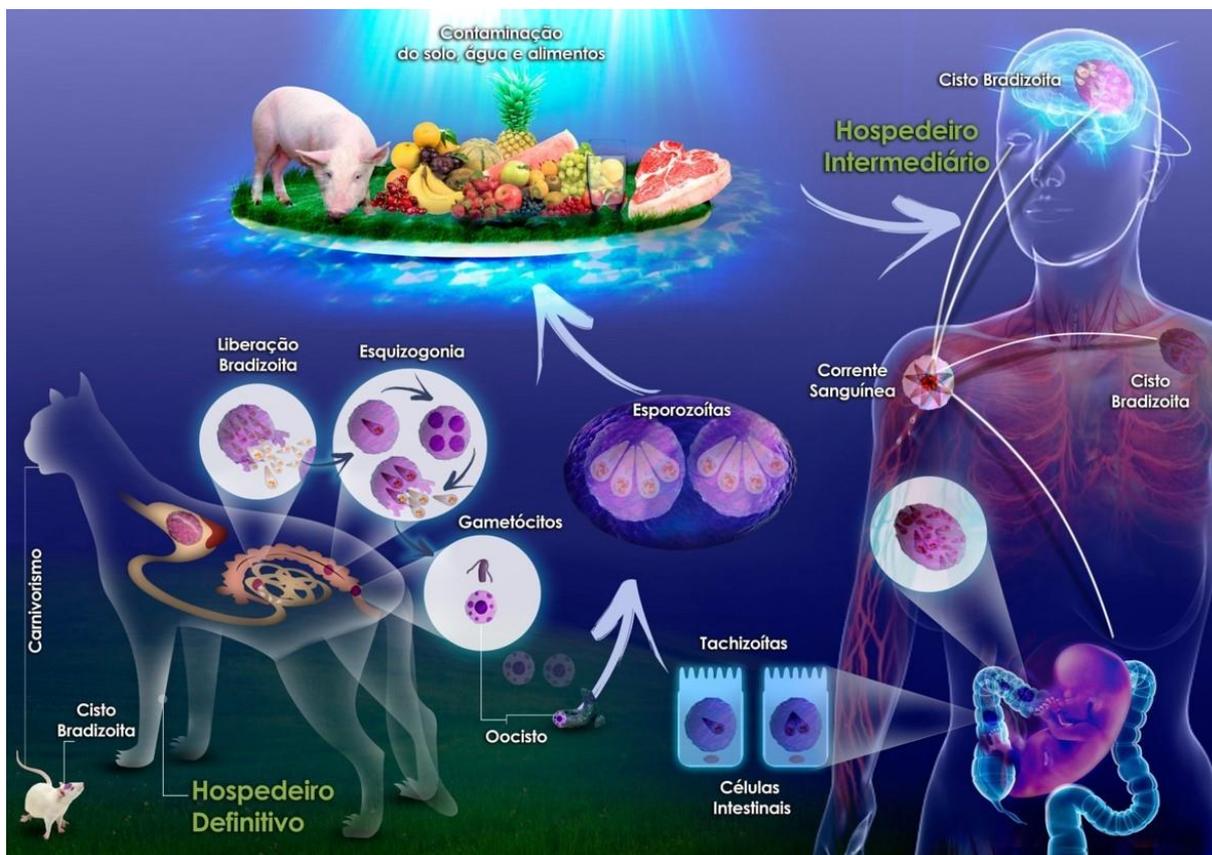
Notas: o ciclo de vida do *T. gondii* pode ter tido seu desenvolvimento inicial na relação entre felídeos paleolíticos e mamíferos predados por eles. Fonte: adaptado de Maurílio Oliveira, 2018.

T. gondii foi isolado pela primeira vez em 1908 por Charles Nicolle e Louis Maceaux. O protozoário foi encontrado em um roedor do gênero *Ctenodactylus gundi* e, por conta disso, foi postulado o nome do parasito (Ferguson, 2009). Em 1937 foi evidenciada pela primeira vez a infecção de diferentes mamíferos, incluindo seres humanos pelo parasito (Sabin e Olitsky, 1937). O ciclo do protozoário permaneceu um mistério ao longo de muitas décadas até que em 1970, Dubey e colaboradores elucidaram o ciclo do *T. gondii* (Dubey, Miller e Frenkel, 1970). A partir disso, estudos sobre a relação parasita/hospedeiro foram amplamente facilitadas.

T. gondii possui um ciclo de vida complexo no qual a reprodução sexuada ocorre em enterócitos felídeos (Figura 1.2). Tal evento ocorre apenas nessa família animal devido à ausência da enzima D6D (delta 6 desaturase) intestinal (Davidson e Haggan, 1990; Genova, Di *et al.*, 2019). D6D é uma desaturase de ácidos graxos

extremamente conservada entre diferentes reinos de seres vivos e é responsável pela conversão de ácido linoleico em ácido gamalinolênico (Kim *et al.*, 2011; Tanomman *et al.*, 2013). Com a ausência da enzima em enterócitos felídeos, esses animais recorrem à uma alimentação estritamente carnívora para a obtenção de ácido gamalinolênico e, assim, ocorre um acúmulo do ácido linoleico obtido pela alimentação no lúmen intestinal. O ácido linoleico acumulado passa a se tornar um dos principais substratos para a reprodução sexuada de *T. gondii* (Davidson e Haggan, 1990; Genova, Di *et al.*, 2019).

Figura 1.2 – Representação esquemática do ciclo de vida de *T. gondii*.



Fonte: imagem gentilmente cedida por Goldenberg S., Nardelli, S. C., Albrecht L., 2020. Ilustração de Wagner Nagib de Souza Birbiere.

Inicialmente, felídeos ingerem cistos parasitários contidos nos tecidos de diversas espécies predadas por eles. Uma vez ingeridos, a parede dos cistos são lisadas por enzimas proteolíticas e são liberados trofozoítas os quais invadem células do epitélio intestinal assumindo a forma de gamontes (Dubey *et al.*, 1997; Hehl *et al.*, 2015). Assim que se instalam nas células hospedeiras, procede-se uma série de replicações assexuadas e liberação de merozoítas que invadem novos enterócitos até ocorrer a diferenciação para micro e macrogametócitos – formas

capazes de promover a troca de material genético – (Hehl *et al.*, 2015). microgametócitos fertilizam macrogametócitos para originar um zigoto diploide o qual dá origem a um oocisto após a segregação da parede cística. Esses cistos são expulsos nas fezes dos felídeos e sofrem processo de meiose seguida de mitose, também chamada de esporulação, até a formação de dois esporocistos com quatro esporozoítos dentro de um único oocisto (Hill e Dubey, 2002). Os oocistos são altamente resistentes a intempéries ambientais e podem perdurar por mais de um ano em ambientes minimamente favoráveis (Lélu *et al.*, 2012).

A continuidade do ciclo do *T. gondii* se dá pela ingestão acidental de oocistos esporulados por diferentes espécies animais como ratos (Webster, 1994), ovelhas (Moraes *et al.*, 2011), vacas (Dubey, 1992), macacos (Dietz *et al.*, 1997), aves (Zia-Ali *et al.*, 2005) e seres humanos (Hill e Dubey, 2002). Esses animais são caracterizados como hospedeiros intermediários uma vez que não ocorre a gametogênese nessas espécies. Uma vez que a parede do cisto parasitário é lisada por proteases como pepsina, são liberados taquizoítas os quais invadem células intestinais e atingem a corrente sanguínea (Dubey, 2007; Dubey *et al.*, 1997). Nela, eles têm acesso a diversas células nas quais podem se instalar e replicar para a formação de novos taquizoítas (Dubey *et al.*, 1997). Diante de diferentes estímulos por parte do hospedeiro como a alteração do pH local, os taquizoítas diferenciam-se para bradizoítas os quais se replicam lentamente e promovem a formação de cistos teciduais (Bohne, Heesemann e Gross, 1994; Radke *et al.*, 2003; Sasai, Pradipta e Yamamoto, 2018). Esses cistos podem ser ingeridos por felídeos predadores e o ciclo é reiniciado.

A toxoplasmose é o nome dado à doença causada pelo *Toxoplasma gondii*. Ela possui grande relevância na saúde pública devido, entre outros fatores, à sua alta morbidade (Mitsuka-Breganó, Lopes-Mori e Navarro, 2010). Cerca de 30% da população humana mundial encontra-se infectada por *T. gondii* (Robert-Gangneux e Dardé, 2012). Não obstante, esse número pode se aproximar a 80% em regiões endêmicas (Dubey *et al.*, 2012). Em indivíduos saudáveis, a toxoplasmose normalmente é assintomática. Todavia, em indivíduos imunocomprometidos, diversas alterações que vão desde dores de cabeça, aumento de enzimas hepáticas, linfonomegalia, febre alta, pneumonia ou mesmo síndromes envolvendo o sistema nervoso central foram identificadas (Bossi *et al.*, 1998; Carne *et al.*, 2002; Leal *et al.*, 2007).

A infecção aguda caracteriza-se pela invasão de células nucleadas pela forma altamente replicativa do parasito, intitulada taquizoíta, a qual adentra células, replica-se e abandona-as em busca por novas células alvo (Hill e Dubey, 2002). Sob efeito de alterações celulares em resposta à infecção, como alteração de pH, ou simplesmente de forma espontânea, *T. gondii* adota a forma de bradizoíta e inicia o estágio crônico da infecção (Bohne, Heesemann e Gross, 1994; Radke *et al.*, 2003; Sasai, Pradipta e Yamamoto, 2018). Os bradizoítas são pouco replicativos e se desenvolvem em um cisto tecidual o qual consegue proteger o parasita por até mesmo anos (Bohne, Heesemann e Gross, 1994; Radke *et al.*, 2003).

A toxoplasmose congênita ocorre quando a gestante é infectada por *T. gondii* e o parasito consegue ultrapassar a barreira transplacentária, instalando-se, assim, no feto. Os danos provocados pelo protozoário são diversos e entre eles cabe-se ressaltar corionretinite, calcificação intracraniana e hidrocefalia (Maldonado e Read, 2017). A toxoplasmose congênita é considerada um dos maiores males da saúde pública atingindo uma incidência de até 80% em áreas endêmicas (Silva, Da, Vinaud e Castro, De, 2015). A identificação clínica da toxoplasmose congênita é bastante dificultada devido a sinais clínicos inespecíficos que ocorrem em não mais que 30% dos casos (Montoya e Remington, 2008). De acordo com o potencial patogênico ofertado pelo *T. gondii*, foi instaurada, no ano de 2016, pelo Ministério da Saúde a Portaria de número 204/2016 determinando que a toxoplasmose gestacional/congênita passe a ser uma doença de notificação compulsória.

Por conta disso, um acompanhamento pré-natal associado a análises laboratoriais deve ser providenciado frente a suspeitas de toxoplasmose congênita. A principal ferramenta para identificação da toxoplasmose é a sorologia (Wallon *et al.*, 2013). Já é historicamente conhecida a importância da avaliação dos níveis sorológicos de IgG para identificação do período de infecção pelo protozoário (Hedman e Seppälä, 1988). Após o primeiro contato do *T. gondii* com o hospedeiro, níveis detectáveis de IgG podem permanecer por anos (Hedman e Seppälä, 1988). Assim, exsurge o viés dessa análise: a simples identificação de IgG não revela com precisão há quanto tempo houve a infecção propriamente dita. Por isso, em associação à avaliação de IgG, a dosagem de IgM pode fornecer mais informações acerca do estágio da infecção. Três pontos devem ser levados em consideração acerca da relação entre essas classes de anticorpos: 1) Altos níveis de IgM e ausência de IgG denota uma infecção recente; 2) presença de IgM associado a IgG de baixa avidéz demonstra uma infecção ocorrida há cerca de até 4 meses

aproximadamente; 3) presença de IgG de alta avidéz representa uma infecção tardia (Petersen *et al.*, 2005). É notável que, assim como IgG, baixos títulos de IgM podem perdurar ao longo de muitos anos sugerindo cuidados na avaliação de testes sorológicos (Bobić, Šibalić e Djurković-Djaković, 1991).

Enquanto que por um lado a toxoplasmose congênita resulta em graves danos ao feto em desenvolvimento, a neurotoxoplasmose ou toxoplasmose cerebral pode comprometer não apenas fetos em desenvolvimento, mas também indivíduos adultos (Carme *et al.*, 2002). A prevalência da toxoplasmose cerebral é um tema bastante debatido uma vez que não é possível identificar com facilidade cistos de *T. gondii* no cérebro humano. Uma forma de prever uma possível prevalência da neurotoxoplasmose é através de necrópsia. Estudos realizados no México demonstraram que cerca de 10% dos indivíduos infectados por *T. gondii* possuem cistos cerebrais (Alvarado-Esquivel *et al.*, 2015).

A toxoplasmose cerebral caracteriza-se pelo sucesso do *T. gondii* em atingir o sistema nervoso central. Uma vez alocado, o cisto tissular do protozoário no estágio de bradizoíta pode promover alterações celulares que culminam em diferentes afecções ao hospedeiro (Prandovszky *et al.*, 2011). Foi evidenciado que a presença de cistos cerebrais está associada ao recrutamento da proteína C1q do sistema complemento (Xiao *et al.*, 2016). Essa proteína possui papel fundamental no processo de erradicação do protozoário. Porém, sua presença, especialmente em demasia, acaba por interferir na sinapse entre os neurônios, resultando em possíveis desordens neurológicas (Xiao *et al.*, 2016). Outro alvo de estudos para a relação entre o *T. gondii* e o sistema nervoso central é o receptor NMDA (*N-Metyl-D-Aspartate*), pertencente a um subgrupo dos receptores de glutamato ionotrópico bloqueados por ligantes (iGluRs, do inglês, *ligand-gated ionotropic glutamate receptors*). Para completar o processo sináptico, em especial no processo de aprendizado, o glutamato produzido pelos neurônios liga-se a receptores NMDA (Riedel, Platt e Micheau, 2003). Todavia, na infecção por *T. gondii*, há a produção de anticorpos que reconhecem os receptores NMDA, impedindo a devida propagação da sinapse. Essa interação está intimamente associada a doenças neurológicas como Alzheimer e sintomas psicóticos (Li, Ye *et al.*, 2018). Dentre os sintomas psicóticos, os que mais atraem a atenção tanto da comunidade médica como científica são a esquizofrenia e a bipolaridade (Brooks *et al.*, 2015).

Um ponto muito importante a ser ressaltado é que para o *T. gondii* atingir tanto o sistema nervoso central como o feto ele deve transpassar barreiras celulares:

a barreira hematoencefálica e transplacentária, respectivamente. Já é sabido que o protozoário é capaz de transpassar tais barreiras por diferentes métodos como a travessia transcelular, paracelular e, ainda, pela utilização de linfócitos ou monócitos infectados (Baba *et al.*, 2017; Konradt *et al.*, 2016). Não obstante, *T. gondii* ainda pode utilizar as células endoteliais não apenas como nichos de replicação, mas como mecanismo de evasão do sistema imune (Konradt *et al.*, 2016). Por conta disso, importantes questões podem ser levantadas a respeito da magnitude do comprometimento que esse parasito pode causar nessas células e seu impacto no organismo hospedeiro.

1.2 O endotélio

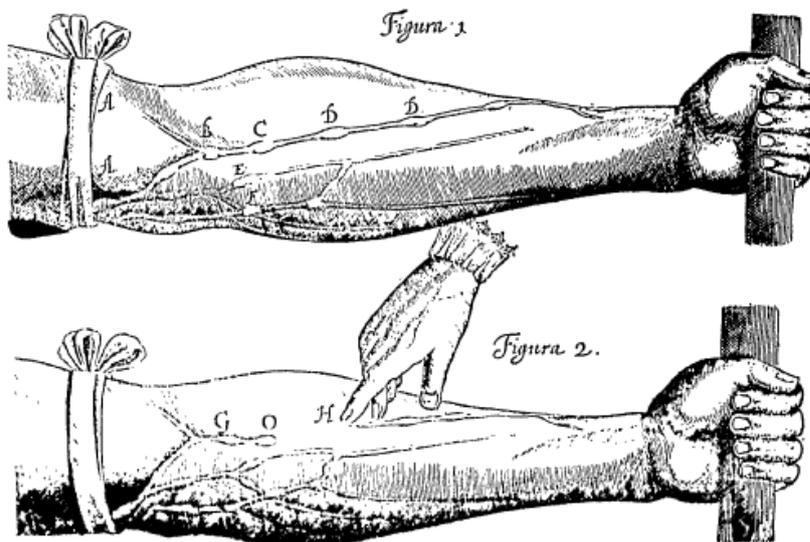
“...I found the task so truly arduous... that I was almost tempted to think... that the movement of the heart was only to be comprehended by God...”

William Harvey, 1628.

Historicamente, o primeiro relato científico completo e rico em detalhes a respeito da circulação sanguínea ocorreu em 1628 por William Harvey na obra “*De Motu Cordis*” (*Anatomical Account of the Motion of the Heart and Blood*) (Harvey, 1628) (Figura 1.3). Tal estudo promoveu uma revolução nos estudos envolvendo anatomia e fisiologia. Todavia, apenas no século XIX que o patologista alemão Friedrich Daniel von Recklinghausen impulsionou derradeiramente os estudos a respeito dos vasos sanguíneos (Recklinghausen, 1898). O estudioso relatou que os vasos sanguíneos não eram apenas uma rede tubos ao longo do organismo, mas um verdadeiro sistema composto por células finamente alinhadas. Além da precisa descrição a respeito dos vasos sanguíneos, von Recklinghausen também estudou as lesões nos vasos sanguíneos causadas por bactérias, doenças como neurofibromatose e introduziu na medicina o termo hemocromatose. Posteriormente, o pesquisador alemão Julius Friedrich Cohnheim, o qual foi aprendiz de Recklinghausen, obteve embasamento suficiente para realizar seus trabalhos (Malkin, 1984). Cohnheim foi o primeiro estudioso a descrever a migração de glóbulos brancos e a formação de pus, inflamação. Muitos outros trabalhos puderam ser desenvolvidos a partir dos estudos supracitados conduzindo-nos, hoje, à

compreensão de que o endotélio é um conjunto celular dotado de uma série de capacidades metabólicas.

Figura 1.3 – Demonstração experimental da função de válvulas venosas.



Fonte: *De Motu Cordis*. William Harvey. 1628.

Até a década de 80, o estudo do tecido endotelial foi bastante dificultado devido à alta complexidade do cultivo das células em ambiente *in vitro*. Controlar o crescimento, interação celular, sua distribuição em um plano unidimensional e as funções inerentes a um tecido especializado foram adversidades enfrentadas até o estabelecimento de protocolos sólidos para o cultivo dessas células (Jaffe *et al.*, 1973).

Células endoteliais originam-se do mesoderma embrionário e são dotadas de uma série de atividades bioquímicas importantes ao organismo (Zovein *et al.*, 2008). Entre elas, ressaltam-se o metabolismo de substâncias vasoativas (Hernanz *et al.*, 2015; Pérez-Cremades *et al.*, 2017), síntese de prostaglandinas (Wilhelms *et al.*, 2014), apresentação de antígenos (Lopes Pinheiro *et al.*, 2016), participação no processo de coagulação sanguínea (Schoergenhofer *et al.*, 2018), entre outras. Além das funções bioquímicas, outra importante atividade das células endoteliais é a participação na formação de barreiras celulares como a hematoencefálica (Helms *et al.*, 2016) e placentária (Blundell *et al.*, 2016). Tais barreiras fornecem uma importante proteção a órgãos privilegiados como o sistema nervoso central e o feto em desenvolvimento.

Ao longo das últimas décadas diversas moléculas intimamente relacionadas com o endotélio têm sido estudadas. Moléculas como, citocinas (Bautista *et al.*, 2005), proteínas solúveis (Sasongko *et al.*, 2014), fatores de crescimento vascular (Waheed *et al.*, 2016), elementos envolvidos na coagulação (Jiang, L. *et al.*, 2016) e estresse oxidativo (Couillard *et al.*, 2005) são comumente interpretados como marcadores endoteliais (Drenjancevic *et al.*, 2018). Essa intitulação se dá devido ao fato de tais moléculas serem preditoras da disfunção ou ativação endotelial. A integridade do endotélio pode ainda ser afetada mediante diferentes situações como, por exemplo, a alteração da expressão gênica de *ET1* (*Vasoconstrictor Endothelin 1*), *VCAM1* (*Vascular Cell Adhesion 1*) e *MCP1* (*Monocyte Chemotactic Protein 1*) frente ao exercício físico (Himburg, Dowd e Friedman, 2019).

Há uma grande quantia de moléculas capazes de modular a expressão gênica endotelial, tal grupo compreende desde moléculas pró-inflamatórias, como prostaglandinas (Wilhelms *et al.*, 2014), até mesmo histonas extracelulares (Pérez-Cremades *et al.*, 2017). As moléculas melhores estabelecidas pelo seu potencial na ativação endotelial são IL-1B (*Interleukin 1 betta*), TNF e LPS (*lipopolissacharidae*) (Jiang, C. *et al.*, 2016; Jiang, Y. *et al.*, 2015; Makó *et al.*, 2010). Enquanto determinadas moléculas foram bem estabelecidas como ativadores endoteliais, a molécula denotada como principal marcador da integridade endotelial é o óxido nítrico (Gross e Wolin, 1995). É evidenciada a importância do óxido nítrico nas mais diversas situações como, por exemplo, gestação (Magness *et al.*, 2000), exercício físico (Himburg, Dowd e Friedman, 2019), doenças cardiometabólicas (Böger *et al.*, 2010) e processos infecciosos (Assis, De *et al.*, 2000; Woodman, Dimier e Bout, 1991).

Alterações endoteliais podem ser ocasionadas por uma série de agentes infecciosos como bactérias (Assis, De *et al.*, 2000), vírus (Calvert *et al.*, 2015), fungos (Liu *et al.*, 2010), helmintos (Debrah *et al.*, 2007) ou protozoários (Knight *et al.*, 2005). Essas alterações podem compreender desde alteração do tônus vascular (Huang, 2000) até disfunções no desenvolvimento vascular em fetos (Dor *et al.*, 2001). No âmbito da infecção viral, o endotélio é capaz de responder de diferentes formas. Em uma situação de infecção pelo vírus da dengue, o endotélio produz IL-8 de forma bastante intensa e entram em processo de apoptose (Avirutnan *et al.*, 1998). Outro grupo de pesquisa demonstrou que pacientes infectados com o vírus-1 da imunodeficiência humana (HIV-1) apresentam altos níveis séricos de fator von

Willebrand (VWF) e ativador de plasminogênio tecidual (TPA) resultantes de uma ativação endotelial (Larrañaga, De *et al.*, 2003).

Na infecção bacteriana é relatado que células endoteliais infectadas por *Chlamydia pneumoniae* são ativadas aumentando a expressão de moléculas de adesão como ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*), VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Protein 1*) ou SELECTINA-E além da proteína quinase ativada por mitógeno P38 (MAPK) p42/p44 (Krüll *et al.*, 1999). Outros estudiosos observaram que na infecção por *Streptococcus pneumoniae* as células endoteliais cerebrais são ativadas e expressam altos níveis de IL8, quimiocinas CXCL1 e CXCL2 em resposta a neuroaminidades bacterianas (Banerjee *et al.*, 2010).

Na infecção por protozoários, há uma grande atenção dada à infecção por *Plasmodium* spp. devido à sua relação com distúrbios como anemia e icterícia (Fabbri *et al.*, 2013). Foi evidenciado que a adesão de eritrócitos infectados por *P. falciparum* ao endotélio promove uma alteração transcricional resultante em apoptose das células endoteliais (Pino *et al.*, 2003). Ao que tange à toxoplasmose, os estudos concentram-se principalmente na forma com que o protozoário ultrapassa essas células para atingir diferentes tecidos como o cérebro (Baba *et al.*, 2017; Konradt *et al.*, 2016). Ainda, foram identificadas alterações transcricionais de células do endotélio cerebral de ratos infectadas por *T. gondii* onde a expressão de uma série de moléculas como MCP1, SELECTINA-E, IL-6, ICAM-1 estavam alteradas (Lachenmaier *et al.*, 2011).

Outro campo amplamente estudado a respeito do endotélio no âmbito infeccioso são as formas com que as células hospedeiras são capazes de eliminar o agente invasor. A eliminação de *T. gondii* em diferentes células ocorre principalmente pela ação de IFNG e TNF produzidas por células do sistema imune (Ibrahim *et al.*, 2009; Scharton-Kersten *et al.*, 1997). A interação dessas moléculas com as células alvo promovem a atividade da indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) e ENOS (Däubener *et al.*, 2001; Dincel e Atmaca, 2015). Uma vez que células endoteliais infectadas passam a ter maior atividade de IDO no catabolismo de triptofano, o protozoário invasor deixa de usufruir desse aminoácido essencial e pode ser eliminado com facilidade (Däubener *et al.*, 2001). No ambiente gestacional, essa atividade deixa de ser expressiva pelo fato de reações inflamatórias serem suprimidas pelo organismo materno, em especial no trimestre final da gestação (Pfaff *et al.*, 2008). Trabalhos evidenciaram a íntima relação entre o desbalanço dos subprodutos da via IDO com quadros de aborto espontâneo (Ban *et al.*, 2013).

Outras moléculas com papel importante na eliminação de taquizoítas em células endoteliais são as espécies reativas de oxigênio originárias de ENOS (*Endothelial Nitric Oxide Synthase*). A atividade da ENOS deve ser encontrada em um fino balanço de expressão, uma vez que a atividade excessiva ou suprimida pode desencadear na disfunção endotelial (Albrecht *et al.*, 2003).

Muito embora a atividade da IDO e a ação de nitritos, ânions superóxidos ou óxido nítrico originários da ENOS possam conter o desenvolvimento parasitário (Däubener *et al.*, 2001; Dincel e Atmaca, 2015), a ação isolada desses elementos não é capaz de promover a contenção total do desenvolvimento parasitário (Woodman, Dimier e Bout, 1991). Essa necessidade por um equilíbrio entre diferentes mecanismos de eliminação parasitária revela que a interação entre *T. gondii* e o endotélio é bastante complexa e necessitada de estudos constantes para que possa ser melhor compreendida. Abaixo encontra-se uma tabela agrupando diferentes marcadores da ativação e disfunção endotelial frente aos mais diversos agentes causais (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 – Marcadores da ativação e disfunção endotelial.

Atividade celular	Marcador	Referências
Inflamação	IL-6	(Lachenmaier <i>et al.</i> , 2011)
	IL-8	(Avirutnan <i>et al.</i> , 1998; Banerjee <i>et al.</i> , 2010)
	IL-12	(Lienenlücke <i>et al.</i> , 2000)
	SOCS3	(Lehmann <i>et al.</i> , 2003)
	MCP1	(Himburg, Dowd e Friedman, 2019; Lachenmaier <i>et al.</i> , 2011)
Moléculas de adesão	TNF	(Fujita <i>et al.</i> , 2011)
	ICAM-1	(Krüll <i>et al.</i> , 1999)
	VCAM-1	(Himburg, Dowd e Friedman, 2019; Krüll <i>et al.</i> , 1999)
Angiogênese	SELECTINA-E	(Krüll <i>et al.</i> , 1999; Lachenmaier <i>et al.</i> , 2011)
	VEGF	(Al-Mohaimen e Ahmed, 2012)
	ANG1	(Hwang <i>et al.</i> , 2009)
Coagulação	ANG2	(Hwang <i>et al.</i> , 2009)
	ADAMTS13	(Dincel e Atmaca, 2016)
Disfunção	VWF	(Larrañaga, De <i>et al.</i> , 2003)
	ENOS	(Albrecht <i>et al.</i> , 2003; Däubener <i>et al.</i> , 2001; Dincel e Atmaca, 2015)

Fonte: do autor, 2020.

1.3 O sistema imune

*“The human mind treats a new idea the way
the body treats a strange protein; it rejects it.”*

Sir Peter Medawar.

A coexistência entre espécies animais e microrganismos já ocorre há milhões de anos. Essa relação pode ser comensal, como por exemplo, a presença de microrganismos no intestino que favorecem a obtenção de nutrientes (Dai *et al.*, 2013; Tamas *et al.*, 2002), como pode ser caracterizada danosa a um dos elementos (Marketon *et al.*, 2005; Mercer *et al.*, 2001). Ao longo da evolução, diferentes espécies animais desenvolveram uma vasta gama de mecanismos de defesa para conter processos infecciosos que culminassem em um agravamento de sua saúde ou mesmo o óbito (Belov *et al.*, 2007). Tais mecanismos compreendem, por exemplo, a secreção de enzimas como lactoferrina em mucosas (Kruzel *et al.*, 2000), presença de um pH hostil a microrganismos potencialmente patogênicos no estômago (Takumi, Jonge, De e Havelaar, 2000) ou a presença de células especializadas na identificação e eliminação de agentes patogênicos (Belov *et al.*, 2007).

Nos vertebrados o sistema imune inato engloba uma série de mecanismos altamente eficientes na eliminação de patógenos, com devida ênfase nas barreiras celulares (Belov *et al.*, 2007). Células como neutrófilos ou macrófagos são capazes de fagocitar diferentes agentes infecciosos (Rosen, Crowley e Heinecke, 2002; Smythies *et al.*, 2005). Enquanto eosinófilos ou mastócitos secretam grânulos capazes de modular a resposta do organismo frente uma ameaça (Erjefält *et al.*, 2001; Magerl *et al.*, 2008). Além da presença de células especializadas, os vertebrados ainda possuem mecanismos comuns ao Filo Arthropoda como a presença de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês *Pattern Recognition Receptor*) que reconhecem eficientemente padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen Associated Molecular Pattern*) (Cuvillier-Hot *et al.*, 2011; Yamashita *et al.*, 2002). Esses receptores podem ser subdivididos em diferentes classes como: TLR (*Toll Like Receptor*); NLR (*Nod Like Receptor*) e RLR (*Rig Like Receptor*) (Bruce *et al.*, 2015). É de grande valia ressaltar que os PRRs, juntamente com as células do sistema imune inato, comunicam-se

intimamente com outro sistema presente apenas nos vertebrados, o sistema imune adaptativo (O'Leary *et al.*, 2006).

Além da atividade celular dos PRRs, outro importante elemento do sistema imune inato é o sistema complemento o qual compreende um grupo com uma série de proteínas séricas (Bruce *et al.*, 2015). A via clássica do sistema complemento compreende o recrutamento da proteína C1q a qual se liga a anticorpos presentes na superfície do patógeno (Jiang, S. *et al.*, 2015). A via alternativa envolve a ativação da proteína C3, considerada a principal proteína do sistema complemento (Sahu e Lambris, 2001). A via das lectinas se assemelha com a via clássica, todavia, ao invés de haver a presença da proteína C1q, envolve a MBL (*Mannose Binding Protein*) (Petersen *et al.*, 2001). Apesar de haver três diferentes vias do sistema complemento que interagem com anticorpos, ligações tioestéricas ou por manose, todas podem dar início à via de ataque à membrana. Essa via é composta por uma série de proteínas em um complexo chamado C5b-9 o qual perfura a membrana do agente invasor, altera sua permeabilidade e promove a eliminação do organismo (Berends *et al.*, 2013). O sistema complemento é ativado rapidamente logo após o contato com o agente infeccioso e a atividade do complemento é capaz de eliminar o agente invasor ou mesmo promover danos ao organismo hospedeiro (Severance *et al.*, 2012).

O sistema imune adaptativo é uma complexa e eficiente rede de interações celulares e moleculares que, junto com o sistema imune inato, promove a defesa de todo o organismo dos vertebrados. Dentre todos os elementos do sistema imune inato, as células T são caracterizadas como principal alicerce desse conjunto (O'Leary *et al.*, 2006). Elas são capazes de reconhecer antígenos apresentados por outras células, estimular células B a secretarem anticorpos, recrutar outras linhagens celulares para locais lesionados ou infectados ou ainda promover a morte celular de células infectadas (Fry *et al.*, 2019; Hue *et al.*, 2006; Motyka *et al.*, 2000). Os principais mecanismos de comunicação celular compreendem pequenas moléculas chamadas citocinas. Notavelmente todas as células do organismo são capazes de secretar diferentes citocinas para comunicar as mais diversas situações, desde a necessidade de coagulação em algum vaso lesionado até o desenvolvimento neuronal embrionário (Hue *et al.*, 2006; Lédée-Bataille *et al.*, 2005). Citocinas pró inflamatórias como IL-6 (*Interleukin 6*), IL-8 (*Interleukin 8*) ou TNF (*Tumor Necrosis Factor*) são secretadas por diferentes células frente a eventos danosos como infecção (Lacour *et al.*, 2001; Serbina *et al.*, 2003). IL-6 e IL-8 agem não apenas

como agentes quimiotáticos para o local de infecção, mas também como elementos na modulação da diferenciação celular (Burke *et al.*, 2008; McGeachy *et al.*, 2007). TNF é uma molécula secretada principalmente por células em apoptose, ela é capaz de se ligar a receptores de TNF (rTNF) de outras células e induzi-las a, também, entrar em processo de morte celular programada (Sedger *et al.*, 2006).

Em contrapartida à produção de moléculas pró inflamatórias, sistemas de controle de expressão são desenvolvidos para não haver a secreção desnecessária de interleucinas. Entre outros elementos, SOCS3 (*Supressor of Cytokine Signaling 3*) possui um importante papel nesse contexto. Uma vez que citocinas pró inflamatórias como IL-6 se ligam a receptores como GP130r (*Glycoprotein 130 receptor*) na membrana celular (Müllberg *et al.*, 2000), a via de sinalização JAK/STAT (*Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription Proteins*) estimula a expressão transcricional de SOCS3, o qual é capaz de inibir o processo de sinalização celular a partir da GP130r (Lehmann *et al.*, 2003). Dessa forma, eventos pró inflamatórios desnecessários ou exacerbados podem ser regulados. É admirável o equilíbrio entre diferentes populações celulares e moléculas para a manutenção da homeostase de um organismo. Além das células do próprio sistema imune, sabe-se que células endoteliais apresentam uma íntima relação com esse sistema (Bautista *et al.*, 2005; Sasongko *et al.*, 2014; Wilhelms *et al.*, 2014).

1.3.1 *Toxoplasma gondii* e o sistema imune hospedeiro

A primeira interação entre o sistema imune hospedeiro e o *T. gondii* ocorre por meio de PRRs como os TLR2 e TLR4 que reconhecem diferentes moléculas parasitárias e iniciam uma cascata de sinalização culminando na secreção de IL-6, IL-12 e TNF por células linfoides inatas (ILC, do inglês: *Innate Lymphoid Cell*) (Beutler *et al.*, 2006; Debierre-grockiego *et al.*, 2007). Em resposta à invasão parasitária, ILCs1 ativadas são capazes de produzir citocinas do tipo Th1 como IFN e TNF, moléculas essenciais no controle da infecção (Klose e Artis, 2016). No entanto, os mecanismos de ativação de ILC1 por *T. gondii* permanecem pouco esclarecidos. Outros grupos celulares como células dendríticas infectadas produzem principalmente IL-1B e TNF, moléculas que juntas promovem um papel protetivo contra a infecção pelo protozoário de forma dependente de IL12 (Klose e Artis, 2016). Observa-se, então, um papel central no controle da infecção por *T. gondii* através da IL-12, a qual ativa e estimula a proliferação de células NK, células T CD4⁺ e T citotóxicas CD8⁺ resultando, principalmente, na produção de grandes quantias

de IFN (Gazzinelli *et al.*, 1993; Hunter *et al.*, 1994). Também foi reportada a produção de IFN por neutrófilos infectados por *T. gondii* por mecanismos independente de TLRs mas ainda pouco esclarecidos (Sturge *et al.*, 2013).

IFN pode agir em diferentes células e resultar no aumento da expressão de INOS (*Inducible Nitric Oxide Synthase*) que possui um papel chave na eliminação de taquizoítas intracelulares principalmente no sistema nervoso central através da inibição da função mitocondrial parasitária (Ibrahim *et al.*, 2009; Scharton-Kersten *et al.*, 1997). Muito embora INOS seja fundamental na eliminação parasitária em tecidos nervosos, a expressão dessa enzima deve ser controlada em tecidos não infectados para evitar quadros de encefalite. Para tal, interleucinas anti-inflamatórias como IL-10 devem ser produzidas por células como T CD4⁺ Foxp3⁺ (Treg) e, assim, promover uma homeostasia a favor do hospedeiro (Oldenhove *et al.*, 2009).

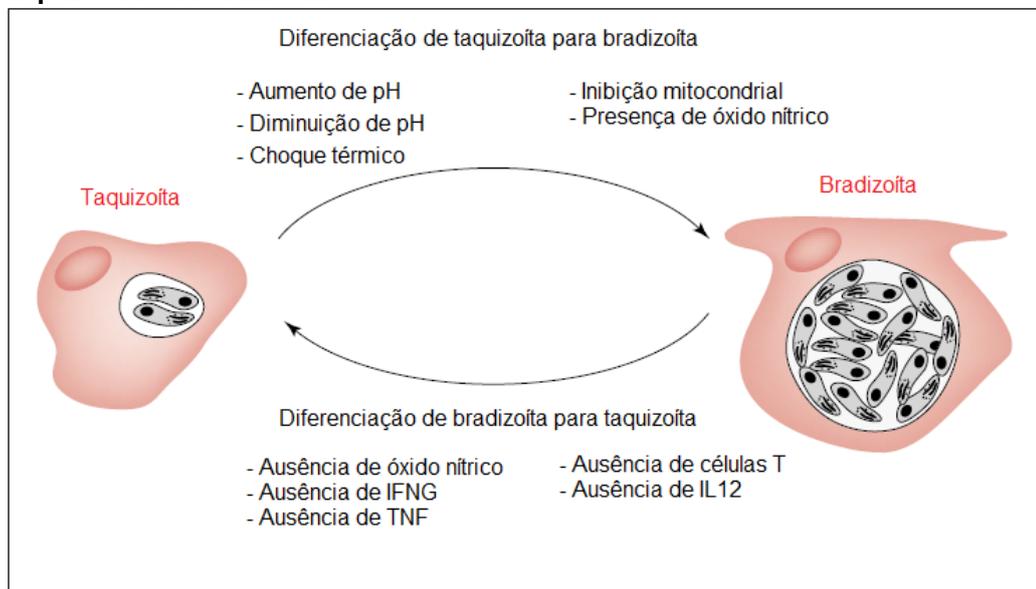
Apesar desse contexto homeostático ser o melhor para o hospedeiro, a infecção por *T. gondii* promove a redução local na produção de IL-2 e, assim, inibição de células Treg que resulta em um aumento de resposta do tipo Th1 (Oldenhove *et al.*, 2009). Células infectadas por *T. gondii* e que recebem a sinalização através de IFN ativam a expressão de centenas de genes. Dentre eles, os mais intimamente envolvidos com a eliminação de taquizoítas são os das GTPases (do inglês: *Guanosine Triphosphate*), em especial p47 e p65 (Taylor *et al.*, 2004). A ação antiparasitária das GTPases nos vacúolos parasitóforos contendo taquizoítas ainda é pouco conhecida apesar de trabalhos terem revelado que GTPases p47 possuem um papel protetivo mais intenso até mesmo do que INOS (Scharton-Kersten *et al.*, 1997). As GTPases p65, também conhecidas como GBPs (*guanylate-binding protein*) possuem papel protetivo também reconhecido pela literatura embora sua atividade específica no vacúolo parasitóforo permanece desconhecida (Yamamoto *et al.*, 2011). Outro mecanismo clássico para eliminação de taquizoítas são através do direcionamento do vacúolo parasitóforo a endolisossomos ou pela acidificação direta do próprio vacúolo. É interessante observar que ambas as vias eliminam os taquizoítas mantendo a arquitetura do vacúolo parasitóforo (Clough *et al.*, 2016).

O sistema complemento contém elementos importantes para a eliminação de agentes invasores. Assim com diversos organismos parasitários, *T. gondii* ativa diferentes vias do complemento (Luo *et al.*, 2011). Porém, o parasito é capaz recrutar tanto proteína de ligação ao C4b quanto o fator H para a superfície e impedir a formação do complexo C5b-9. O resultado desse recrutamento é a

resistência do *T. gondii* à eliminação pelo sistema complemento (Sikorski, Commodaro e Grigg, 2020). Não obstante, uma vez instalado no sistema nervoso central, uma série de alterações no sistema complemento podem promover afecções neurológicas seja pela proteína C1q ou por C3 (Li, Ye *et al.*, 2019; Xiao *et al.*, 2016).

A diferenciação de *T. gondii* das formas de taquizoítas para bradizoíta e vice-versa relaciona-se intimamente com o sistema imune. Duas situações permitem uma nova diferenciação de bradizoítas para taquizoítas: a primeira é pela recorrente liberação de poucos bradizoítas a partir dos cistos parasitários os quais poderão se diferenciar em taquizoítas até mesmo em indivíduos saudáveis.

Figura 1.4 – Mecanismos que estimulam a mudança de *T. gondii* para taquizoítas ou bradizoítas.



Notas: IFNG: interferon *gamma*; IL: interleucina; TNF: fator de necrose tumoral. Fonte: adaptado de Lyons *et al.*, 2002.

A outra é pela alteração local que passa a favorecer o parasita como ausência de células T ou IL-12 (Figura 1.4) (Skariah, McIntyre e Mordue, 2010). Todavia, pouco é conhecido com plenitude sobre o ambiente *in vivo* que favorece a retomada à forma de taquizoítas ou a maneira precisa com que o protozoário percebe as alterações ambientais.

1.4 Vesículas extracelulares

“Science is wonderfully equipped to answer the question “how?” but it gets terribly confused when you ask the question “why?”

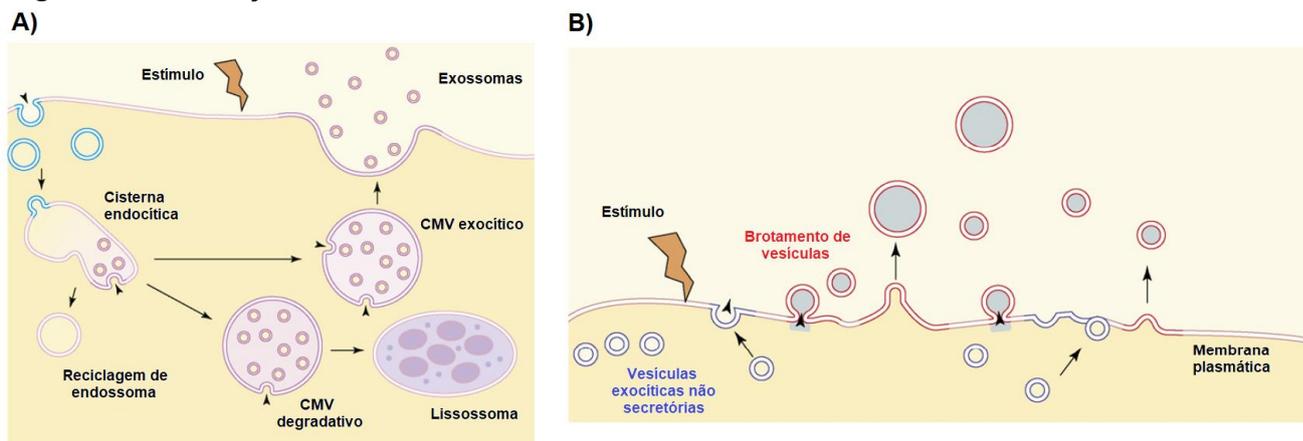
Erwin Chargaff, 1946.

Os primeiros vislumbres de vesículas extracelulares retoma ao ano de 1946 quando Erwin Chargaff, um bioquímico austríaco refugiado da ditadura nazista, com o auxílio de Randolph West observaram que o precipitado obtido a partir da ultracentrifugação de plasma sanguíneo possuía propriedades procoagulantes. Chargaff evidenciou através de microscopia eletrônica de transmissão a presença de pequenas estruturas com uma dupla membrana (Chargaff e Randolph, 1946). Apenas em 1974 quando foi observada a liberação de pequenas partículas a partir da glândula tireóide de morcegos durante a hibernação, os estudos a respeito das vesículas extracelulares (VEs) se intensificaram (Nunez, Wallis e Gershon, 1974). A partir desse ponto foram evidenciadas VEs a partir dos mais diversos organismos e até mesmo a partir de células tumorais. A relação mais íntima entre VEs e o sistema imune foi observada em 1996 por um grupo de pesquisadores franceses. Eles evidenciaram que linfócitos do tipo B liberavam VEs capazes de apresentar antígenos (Théry *et al.*, 2018). A partir desse ponto, a relação entre as VEs e o sistema imune tem se tornado objeto valoroso de estudo por uma série de grupos de pesquisa.

Por convenção, vesícula extracelular é um termo genérico para descrever partículas constituídas por uma dupla camada lipídica sem a capacidade replicativa. Elas podem ser divididas em subgrupos de acordo com diversas características. O principal fator de diferenciação entre exossomas e microvesículas é, dentre outros, o tamanho (Cocucci e Meldolesi, 2015). Em geral, exossomas possuem um tamanho médio entre 30 e 150 nm (Lobb *et al.*, 2015), enquanto que microvesículas atingem um tamanho entre 100 e 350 nm (Cocucci, Racchetti e Meldolesi, 2009). Em adição, a liberação de exossomas ocorre, basicamente, por um processo de fusão de corpos multivesiculares com a membrana plasmática, enquanto que a liberação de microvesículas ocorre pelo brotamento da membrana plasmática (Cocucci, Racchetti e Meldolesi, 2009) (Figura 1.5 A e B). VEs podem conter proteínas, lipídios, DNA, RNA, metabólitos e até mesmo organelas em seu interior ou em sua membrana (Lázaro-Ibáñez *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2008).

Embora haja uma diferenciação entre os diferentes subtipos de VEs, há muitas discussões na literatura a respeito dos marcadores ideais para a diferenciação plena dessas partículas. Por conta das dificuldades encontradas por diversos grupos de pesquisa em isolar, caracterizar, armazenar e aplicar em ensaios as VEs, diferentes revisões são constantemente desenvolvidas para facilitar e padronizar os procedimentos de estudos com VEs (Cocucci, Racchetti e Meldolesi, 2009; Ramirez *et al.*, 2018; Théry *et al.*, 2018; Wauben, 2015).

Figura 1.5 – Liberação de exossomas e microvesículas.



Nota: Demonstração esquemática da liberação de exossomas (A) e microvesículas (B). CMV: corpo multivesicular. Fonte: adaptado de Cocucci, Rachetti e Meldolesi, 2009.

Dentro do contexto de infecção, as vesículas extracelulares podem favorecer tanto o agente invasor como o organismo hospedeiro. Uma vez sabendo que diversos organismos, sejam eles procaríotos ou eucaríotos, são capazes de produzir VEs, um vasto universo de interações celulares pode ser elucidado. No âmbito bacteriano, já foi evidenciada a presença de enzimas relacionadas com a resistência bacteriana em VEs produzidas por *Staphylococcus aureus* (Lee *et al.*, 2013). Outros estudos realizados em 2017 revelaram a presença de RNA nas VEs bacterianas. Diferente do que se cogitava, esse RNA não é codificante, mas possui propriedades para adentrar o núcleo de células hospedeiras e alterar seus padrões transcricionais (Choi *et al.*, 2017).

Além de bactérias, protozoários também são capazes de modular o processo infeccioso através de VEs. *Trypanosoma cruzi* é capaz de invadir células e uma vez no interior delas, ele produz vesículas intracelulares contendo tRNA. Essas vesículas são externalizadas e captadas por células adjacentes as quais apresentarão alterações em seu padrão transcricional (Garcia-silva *et al.*, 2020). De forma similar à interação entre *T. cruzi* e células hospedeiras, *Plasmodium falciparum* também demonstra uma interação celular através de VEs. Eritrócitos

infectados por *P. falciparum* secretam VEs com uma série de proteínas da própria célula ou oriundas do parasito. Uma vez que essas VEs são captadas por outros eritrócitos infectados, pode ser observada a modulação na mudança de estágio do protozoário infectante para a forma sexuada (Regev-Rudzki *et al.*, 2013).

No âmbito da toxoplasmose, foi observado que células dendríticas infectadas por *T. gondii* passam a liberar VEs que promovem uma intensa resposta sistêmica do tipo Th1 (Aline *et al.*, 2004). Tal estudo fortaleceu a proposta do desenvolvimento de vacinas baseadas em vesículas extracelulares (Beauvillain *et al.*, 2009). Não apenas células dendríticas, mas outras células também respondem à infecção de forma bastante característica. Fibroblastos humanos infectados por *T. gondii* são capazes de liberar exossomas com um perfil diferenciado de RNA incluindo miRNAs expressos somente pelo parasita ao passo que células L6 de camundongos têm seu ciclo celular alterado quando estimuladas por VEs de células infectadas (Kim *et al.*, 2016; Pope e Lässer, 2013). Assim como as células hospedeiras, o parasito também é capaz de liberar VEs com potencial de modular a resposta imune do hospedeiro, induzindo a produção de IL-12, TNF e IFN por macrófagos estimulados (Li, Yawen, Xiu, *et al.*, 2018).

O conteúdo proteico das VEs tanto de *T. gondii* como de fibroblastos humanos infectados já foi devidamente descrito. Observa-se uma grande quantidade de proteínas de taquizoítas em VEs de células infectadas (Wowk *et al.*, 2017). Todavia, se tais proteínas foram inoculadas nas VEs hospedeiras pelos parasitos, se são produto da degradação parasitária ou um mecanismo diferenciado de apresentação de antígeno e ativação de células circunvizinhas permanece sob discussão. Apesar de estudos com VEs relacionadas a *T. gondii* já englobarem diferentes tipos celulares, a forma com que células respondem a VEs ainda permanece desconhecida. Um tipo celular que possui importante papel nesse contexto é o endotélio. Estudos avaliaram o perfil proteico de células endoteliais estimuladas com TNF e uma série de proteínas como fatores de transcrição BTF3,IDO, endonucleases, subunidades de proteossomas e proteínas ribossomais foram identificadas exclusivamente em VEs de células ativadas por TNF (Peterson *et al.*, 2008). Alterações em VEs de células endoteliais frente a um ambiente infeccioso por *T. gondii* permanece um mistério.

1.5 Justificativa

É notável que desde o primeiro vislumbre do endotélio, adotado como uma trama de tubos os quais conduzem o sangue pelo corpo, estudos acerca dessas células venham despertando atenção da comunidade científica ao longo de mais de uma centena de anos. Um conjunto de células que foram inicialmente categorizadas apenas como uma barreira passiva entre os elementos do sangue e os tecidos adjacentes, hoje são caracterizadas como importantes sinalizadores de adversidades as quais vão desde alterações metabólicas como diabetes até processos infecciosos.

T. gondii é um protozoário intracelular obrigatório o qual utiliza de mecanismos de invasão celular associados à evasão do sistema imune que dificultam uma devida resposta inflamatória. Uma vez que oocistos de *T. gondii* são ingeridos por um hospedeiro intermediário, os taquizoítas transpassam o epitélio intestinal e adentram o sistema circulatório. Nesse ambiente, o parasito tem contato com o endotélio e pode infectá-lo ou transpassá-lo enquanto as células endoteliais podem sofrer alterações metabólicas ou mesmo estruturais frente ao processo infeccioso.

Pelo fato de o tecido endotelial estar intimamente atrelado à permeabilidade vascular, angiogênese, coagulação, expressão de moléculas de adesão ou inflamatórias, questionamentos podem ser levantados quando essas células são infectadas. Uma vez que o *T. gondii* pode infectar células endoteliais, questões acerca da capacidade do parasito em alterar o estado de homeostase do endotélio são levantadas. Além do próprio parasito, vesículas extracelulares produzidas por este ou em decorrência da infecção também poderiam interagir com o endotélio, ocasionando possíveis alterações.

A ativação endotelial é uma importante área de estudo no ramo das ciências biológicas. Ao incluir na avaliação *T. gondii* e partículas celulares ou parasitárias (VEs), diversos questionamentos podem surgir, como: será que VEs parasitárias favorecem ou processo infeccioso?; será que VEs de células infectadas pode promover um efeito protetivo em células não infectadas?. Outro ponto de grande importância, mas negligenciado ao longo de muitos anos é que células endoteliais adjacentes a diferentes tecidos são capazes de responder de forma completamente distinta a diferentes estímulos. Portanto, realizar a comparação entre células endoteliais do cordão umbilical e da microvasculatura cerebral no contexto

infeccioso por *T. gondii* fornece informações de grande valia para a compreensão da interação parasita/hospedeiro, eventuais agravamentos, alterações celulares e possibilidades terapêuticas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a ativação de células endoteliais humanas quando infectadas pelo protozoário *Toxoplasma gondii*.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a alteração transcricional de células HBMEC e HUVEC infectadas por *Toxoplasma gondii*;
- Quantificar a carga parasitária em células HBMEC e HUVEC;
- Caracterizar vesículas extracelulares oriundas de taquizoítas e células endoteliais infectadas ou não;
- Quantificar a carga parasitária em células endoteliais expostas a vesículas extracelulares oriundas de taquizoítas ou de células infectadas;
- Avaliar o perfil proteico de vesículas extracelulares de células endoteliais infectadas por *T. gondii*;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultivo das Células NHDF

Células da linhagem fibroblástica da derme humana (NHDF, do inglês: *Normal Human Dermal Fibroblast*) (Lonza Group, Suíça, Cat. nº CC2509) foram utilizadas no desenvolvimento desse estudo. As células foram mantidas em garrafas de cultivo de 75 cm² (T75) com 10 mL de meio DMEM (*Dulbecco Modified Eagle Medium*) (Gibco™, Inglaterra) *high glucose* com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco™, Inglaterra), 2 mM de L-glutamina (Gibco™, Inglaterra), 50 U de penicilina/mL (Gibco™, Inglaterra) e 50 µg de estreptomicina/mL (Gibco™, Inglaterra), a 37°C e 5% CO₂ atmosférico. Uma vez que as células atingiam uma confluência de 90%, equivalente a aproximadamente 1,4 x 10⁶ células por garrafa, eram removidas das garrafas com a adição de 2,5 mL de tripsina (5 mg/mL) (Sigma-Aldrich™, EUA) + EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) (2 mg/mL) (Sigma-Aldrich™, EUA) e transferidas para uma nova garrafa T75 em uma concentração final de 1,4 x 10⁵ células. A confluência era atingida em torno de sete dias de cultivo. A troca do meio ocorria a cada dois dias. As células eram mantidas por um número máximo de seis passagens após o descongelamento (Wowk *et al.*, 2017).

3.2 Cultivo de células endoteliais da microvasculatura cerebral humana (HBMEC)

Células endoteliais imortalizadas de linhagem HBMEC (do inglês: *Human Brain Microvascular Endothelial Cells*) foram gentilmente cedidas pelo Dr. Fabio Costa (Universidade Estadual de Campinas, Brasil) para o desenvolvimento desse estudo. As células foram imortalizadas pela adição de um plasmídeo contendo um vírus símio 40 com antígeno T grande (Stins *et al.*, 1997) e posteriormente caracterizadas (Nikolskaia *et al.*, 2008). As células foram mantidas em garrafas T75 com 10 mL de meio DMEM suplementado com 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina, 50 U de penicilina/mL e 50 µg de estreptomicina/mL, a 37°C e 5% CO₂ atmosférico. Uma vez que as células atingiam uma confluência de 90%, equivalente a aproximadamente 1,4 x 10⁶ células, estas eram removidas das garrafas com a adição de 2,5 mL de tripsina (5 mg/mL) + EDTA (2 mg/mL) e 3,0 x 10⁵ células eram

transferidas para uma nova garrafa T75. A confluência era atingida em torno de sete dias de cultivo. A troca do meio ocorria a cada dois dias. Com o objetivo de não alterar as características inerentes a células endoteliais, as células eram subcultivadas no máximo seis vezes após o descongelamento (BROWN; MORRIS; O'NEIL, 2009).

3.3 Cultivo de células endoteliais do cordão umbilical humano (HUVEC)

Células de linhagem primária HUVEC (do inglês: *Human Umbilical Vein Endothelial Cell*) (Cat. nº C2519A) foram utilizadas no desenvolvimento desse estudo. As células foram mantidas em garrafas T75 com 10 mL de meio EBM™-2 (*Endothelium Cell Growth Medium*) (Lonza, Suíça) suplementado com 4% de SFB, 0,02% de Hidrocortisona (Lonza, Suíça), 0,2% de HFGFB (*Human Basic Fibroblast Growth Factor*) (Lonza, Suíça), 0,05% de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) (Lonza, Suíça), 0,05% de R3IGF (*Insulin-like Growth Factor-1 LongArginine*) (Lonza, Suíça), 0,05% de ácido ascórbico (Lonza, Suíça), 0,05% de HEGF (*Human Epidermal Growth Factor*) (Lonza, Suíça) e 0,05% de GA-1000 (*Gentamicin Sulfate-Amphotericin*) (Lonza, Suíça), a 37°C e 5% CO₂ atmosférico (Li, Yang et al., 2019). O processo de repique celular foi realizado de forma idêntica ao das células HBMEC.

3.4 Avaliação de contaminação por *Mycoplasma spp.*

Periodicamente, foi realizada a avaliação de contaminação de células NHDF, HBMEC e HUVEC por *Mycoplasma spp.*. Inicialmente foi coletado 1 mL do sobrenadante de DMEM ou EBM™-2 utilizados no cultivo das células. Após isso, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 30 segundos e 200 µL do sobrenadante era coletado e incubado a 70°C por 10 minutos. Sequencialmente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 5 minutos e 100 µL do sobrenadante foi incluído em um novo microtubo. A validação da presença de *Mycoplasma spp.* nas amostras foi realizada através de PCR quantitativa (qPCR). Para a reação foram utilizados 1 µL da amostra obtida, oligonucleotídeos senso e anti senso específicos para *Mycoplasma spp.* na concentração final de 300 nM, 3,33 µL de 2x SYBR™

Select Master Mix (Applied Biosystems, EUA) e água 18,2 mΩ/cm³ até completar um volume final de 10 µL (Tabela 3.1) (Uphoff e Drexler, 2002).

Tabela 3.1 – Configurações selecionadas para realização da qPCR para detecção de material genético de *Mycoplasma* spp.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (seg.)
Pré aquecimento	95	300
Desnaturação	95	30
Anelamento	55	30
Extensão	60	30
<i>Melting peak</i> fase 1	95	10
<i>Melting peak</i> fase 2	65	30
<i>Melting peak</i> fase 3	97	Contínuo

Fonte: do autor, 2020.

3.5 Cultivo de *Toxoplasma gondii*

Taquizoítas de *T. gondii*, cepa ME-49 mutantes expressando a proteína verde fluorescente (GFP, do inglês *Green Fluorescent Protein*) (Gubbels *et al.*, 2003) foram gentilmente cedidos pela Dra Érica dos Santos Martins Duarte (Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil). Os parasitos foram mantidos em placas de cultivo de seis poços com células NHDF em confluência mínima de 90% em meio DMEM *high glucose* com 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina, 50 U de penicilina/mL e 50 µg de estreptomicina/mL, a 37°C, 5% CO₂ atmosférico e com troca de meio a cada dois dias. Ao inocular 7,0 x 10⁶ parasitos em 1,4 x 10⁶ células NHDF, equivalente a uma MOI-5 (do inglês: *multiplicity of infection* 5), a lise das células com a liberação dos taquizoítas em sobrenadante ocorria em torno de cinco dias e os mesmos eram mantidos em novas células NHDF confluentes em placas de seis poços, utilizados em experimentos ou congelados. A fim de obter uma taxa metabólica regular, todos os parasitos recentemente descongelados a partir do estoque foram cultivados em células NHDF ao menos uma vez anteriormente a qualquer experimento (Cañedo-solares *et al.*, 2013).

3.6 Depleção de soro fetal bovino

Com o intuito de remover as vesículas extracelulares presentes no soro fetal bovino utilizado na suplementação dos meios de cultivo DMEM e EBM™-2, o

mesmo foi fracionado em alíquotas de 50 ml. Após isso, o soro foi submetido a um processo de ultracentrifugação em ultracentrífuga *Himac CP90WX (Hitachi, Japão)* a 100.000 x *g* a 4°C por 18 horas. O sobrenadante resultante foi coletado, filtrado em membrana de 0,22 µm e armazenado a -20°C até o uso (Liao *et al.*, 2017).

3.7 Isolamento de vesículas extracelulares

Inicialmente, taquizoítas de *T. gondii* foram mantidos em células NHDF conforme procedimento anteriormente citado. No momento em que ocorria a lise das células e liberação dos parasitos no meio, os taquizoítas livres eram coletados e submetidos a um processo de lavagem com 10 mL de PBS e centrifugados a 1.000 x *g* por dez minutos três vezes para remoção de debris celulares e parasitos mortos. Após isso, 1,0 x 10⁹ taquizoítos foram cultivados em garrafas T75 com 10 mL de DMEM com SFB condicionado a 37°C e 5% CO₂ atmosférico ao longo de duas horas. Uma vez transcorrido esse tempo, o meio de cultivo contendo taquizoítas foi submetido a uma centrifugação a 1.000 x *g* por dez minutos para remoção dos parasitos. Na sequência, esse material foi filtrado em membrana de 0,45 µm e iniciava-se o processo de purificação das vesículas extracelulares (VEs) a partir do sobrenadante coletado. O método selecionado para o isolamento das vesículas extracelulares foi a ultracentrifugação diferencial, a qual baseou-se em cinco ciclos de centrifugação em ordem ascendente de rotação. O primeiro ciclo foi composto por uma centrifugação a 300 x *g* por dez minutos. O segundo resumiu-se a 2.000 x *g* por dez minutos. O terceiro compreendeu 10.000 x *g* por dez minutos. O quarto foi composto por uma centrifugação a 100.000 x *g* por 70 minutos enquanto o quinto ciclo foi uma repetição do quarto ciclo, 100.000 x *g* por 70 minutos, realizado para a obtenção de um precipitado enriquecido de vesículas extracelulares. Todas as centrifugações foram realizadas a 4°C. Do ciclo um ao três, o sobrenadante foi resgatado e transferido para um novo tubo estéril, enquanto que nos ciclos quatro e cinco, foram resgatados os precipitados. Os tubos utilizados para ultracentrifugação foram tratados com dicarbonato de dietila (DEPC) próprios para o desenvolvimento dessa atividade. O precipitado coletado ao fim do quinto ciclo foi ressuspenso em alíquotas de 50 µl de PBS estéril e desprovido de Ca⁺⁺ e armazenado sob refrigeração para a utilização em até, no máximo, sete dias (Li, Yawen, Xiu, *et al.*, 2018; Wowk *et al.*, 2017).

A purificação das vesículas extracelulares de células não infectadas foi realizada a partir do cultivo das células HBMEC e HUVEC em garrafas T150 sob as condições já citadas anteriormente. Uma vez que a confluência se aproximava de 90%, o sobrenadante era coletado, as células eram lavadas duas vezes com PBS estéril e, então era adicionado meio de cultivo com SFB condicionado. Após isso, as células foram mantidas em estufa a 37°C e com 5% CO₂ atmosférico ao longo de duas horas. Com o término desse período, o sobrenadante foi coletado, filtrado em membrana de 0,45 µm e submetido ao processo de ultracentrifugação diferencial já citado anteriormente (Cocucci, Racchetti e Meldolesi, 2009).

O isolamento das vesículas extracelulares de células infectadas foi realizado a partir do cultivo das células HBMEC e HUVEC em garrafas T150. Uma vez que a confluência de 90% era atingida, foram introduzidos na cultura 1,4 x 10⁷ taquizoítos, equivalente a uma MOI-5. Com o objetivo de remover os parasitos ainda livres e vesículas extracelulares produzidas por esses, uma hora após a infecção o sobrenadante foi removido e as células lavadas três vezes com PBS estéril. Após a lavagem, foi adicionado o meio de cultivo com SFB depletado e as células foram mantidas em estufa a 37°C, contendo 5% CO₂ atmosférico ao longo de duas horas. Ao fim desse período, o sobrenadante foi coletado, filtrado em membrana de 0,45 µm e submetido ao processo de ultracentrifugação diferencial, citado anteriormente, ao passo que uma nova alíquota de meio de cultivo com SFB depletado de VEs foi adicionado à mesma cultura de células (Wowk *et al.*, 2017).

3.8 Caracterização das vesículas extracelulares

As vesículas extracelulares obtidas a partir do protocolo acima descrito foram diluídas em uma concentração 1:10 de forma a se obter um volume final de 500 µl. A suspensão de vesículas extracelulares foi então coletada por uma seringa estéril de 1 mL alocada em uma bomba de infusão que injetou o material a uma velocidade de 50 (~5,2 µl/min) em um sistema *NanoSight* (Malvern, Reino Unido) LM14 com módulo de laser de 532 nm. A captura de imagens foi configurada para três capturas ao longo de 60 segundos. Entre a troca de amostras, o sistema de infusão foi copiosamente lavado com água 18,2 mΩcm³ até ser observado o máximo de uma partícula/frame pelo sistema 3.0 SCMOS. Os resultados foram obtidos no formato de planilhas e receberam o tratamento estatístico de acordo com sua natureza. Ao

menos três repetições foram realizadas para cada avaliação (Li, Yawen, Xiu, *et al.*, 2018; Wowk *et al.*, 2017).

3.9 Avaliação da expressão gênica de células endoteliais expostas ao *T. gondii*

Células HBMEC e HUVEC foram semeadas em placas de 24 poços na proporção de $2,0 \times 10^4$ por poço – equivalente a 50% de confluência – e incubadas em meio de cultivo DMEM e EBM™-2, respectivamente, a 37°C e 5% CO₂ atmosférico por 24 horas. Ao fim desse período, taquizoítas mantidos em células NHDF foram inoculados nas células HBMEC e HUVEC (MOI-5) (Baba *et al.*, 2017; Konradt *et al.*, 2016; Lachenmaier *et al.*, 2011). Ao término da inoculação de parasitos ou vesículas extracelulares, as placas foram incubadas em estufa pelos períodos de 1, 2, 4, 8, 16 e 24 horas. Ao atingir o período de tempo estipulado, o RNA das células foi extraído pela utilização do kit comercial *RNeasy*® (Qiagen, Holanda) e armazenado a -80°C. Objetivando manter a confiabilidade dos resultados, esse ensaio foi realizado em três réplicas biológicas.

3.9.1 Extração e avaliação da qualidade do RNA

A quantificação e avaliação de integridade do RNA extraído foram realizadas pela associação da amostra a um reagente fluorescente e quantificado por um aparelho fluorômetro *Qubit*® 2,0 (*Thermo Fischer Scientific*, EUA) em comprimento entre 630 e 680 nm. A integridade do material obtido foi avaliada por um espectrofotômetro *Nanodrop*™ One (*Thermo Fischer Scientific*, EUA). Para a avaliação de integridade do material, foi coletado 1 µl de água $18,2 \text{ m}\Omega/\text{cm}^3$ com o RNA de interesse e cuidadosamente posto no pedestal analítico do espectrofotômetro. A amostra foi caracterizada como livre de contaminantes, como sais ou peptídeos, quando a proporção A260/A280 e A260/230 estavam de acordo com os valores especificados pelo manual do fabricante (~2.0 e entre 2,0 e 2,2 respectivamente). Uma vez que se obteve o RNA total das células HBMEC e HUVEC, foi realizada a transcrição de cerca de 100 ng para cDNA com a utilização da *SuperScript*™ II Reverse Transcriptase (*Thermo Fischer*, EUA), seguindo instruções do fabricante. O produto final foi armazenado a 4°C até a utilização em etapas subsequentes.

3.9.2 Quantificação dos transcritos por qPCR

A reação de qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reacton*) consistiu de iniciadores senso e anti senso, na concentração final de 300 nM cada, 5 µl de 2x SYBR™ Select Master Mix (Applied Biosystems, EUA), 1 ηg de amostra de cDNA e água 18,2 mΩ/cm³ para completar 10 µl de solução. Todas as reações foram realizadas em placas de 96 poços (Roche Life Science, Suíça) e analisadas no aparelho de qPCR Lightcycler® 96 (Roche Life Science, Suíça). As configurações dos ciclos de qPCR foram desenvolvidas conforme recomendações do fabricante do SYBR™ Select Master Mix (Applied Biosystems, EUA) e do equipamento de qPCR. Optamos pela utilização de 50 ciclos para a análise de todos os genes. Objetivando uniformizar a análise de todos os genes, a temperatura de anelamento selecionada para todos os oligonucleotídeos foi 60°C (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 – Configurações selecionadas para realização da qPCR.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (seg.)
Pré aquecimento	95	600
Desnaturação	95	10
Anelamento	60	15
Extensão	60	15
<i>Melting peak</i> fase 1	95	10
<i>Melting peak</i> fase 2	65	60
<i>Melting peak</i> fase 3	97	Contínuo

Fonte: do autor, 2020.

A normalização e padronização da qPCR foi baseada em uma curva de *GAPDH* ($R^2 \cong 1,0$), onde os resultados obtidos foram quantificados de forma relativa a esse controle com o emprego do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. *ACTINAB* também foi selecionado como gene de referência. Em todas as placas, reações controles para os genes *GAPDH* e *ACTINAB*, bem como controles negativos para cada par de oligonucleotídeos amplificados, foram realizados. Objetivando avaliar a reprodutibilidade dos resultados, foi avaliado o material genético obtido a partir de três réplicas biológicas, onde três réplicas técnicas foram avaliadas por gene de interesse, em placas de 96 poços (Baba *et al.*, 2017; Frentzou *et al.*, 2012). Todos os genes avaliados nesse estudo estão categorizados no apêndice A.

3.10 Ensaio de citotoxicidade de vesículas extracelulares

Células HBMEC foram semeadas em placas de 96 poços em uma densidade de $4,0 \times 10^3$ células por poço (equivalente a ~50% de confluência). As células foram mantidas por 24 horas com 100 μ l de meio DMEM por poço, a 37°C e 5% CO₂ atmosférico. Transcorrido esse tempo, o meio de cultivo foi substituído por um novo meio com metade da concentração original de SFB e vesículas extracelulares obtidas de taquizoítas por procedimento anteriormente citado nas concentrações de 5, 10, 20 e 40 μ g/mL. Assim que realizada a troca do meio, as células em contato com as vesículas extracelulares foram incubadas a 37°C e 5% CO₂ atmosférico por mais 24 horas. Transcorrido esse período, o meio de cultivo foi removido e 100 μ l de solução de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-diphenyl tetrazolium bromide) na concentração de 5 g/mL foi adicionada por poço e a placa foi incubada por mais quatro horas protegida da luz. Após isso, a solução de MTT foi removida e foram adicionados 100 μ l de isopropanol em cada poço e a placa foi conduzida a um *shaker* para homogeneização da solução por cinco minutos. Ao fim desse período, a placa foi conduzida a um leitor de placa por absorvância *Synergy H1 Hybrid Reader* (BioTek Instruments, Inc., EUA) e a leitura foi realizada em comprimento de onda de 550 nm (Meerloo, Kaspers e Cloos, 2011).

3.11 Ensaio de invasão

Células HBMEC e HUVEC foram semeadas em placas de 24 poços com uma lamínula estéril alocada no fundo dos poços em uma densidade de $2,0 \times 10^4$ células por poço (equivalente a ~50% de confluência). As placas, contendo as células, foram mantidas por 24 horas com 1 mL de meio DMEM (HBMEC) e EBM™-2 (HUVEC) por poço, a 37°C e 5% CO₂ atmosférico. Após isso, células foram submetidas ou não a um pré-tratamento com uma concentração de VEs relativas àquelas secretadas por $1,0 \times 10^5$ taquizoítas (7,4 ng). Como controle negativo foram utilizadas VEs de células endoteliais infectadas ou não na mesma concentração. O controle positivo consistiu-se na utilização de TNF (Cat. PHC3016, *Thermo Fisher Scientific*, EUA) na concentração final de 10 ng/mL e o controle negativo foi dado pela adição de PBS.

Sequencialmente, $1,0 \times 10^5$ taquizoítas de *T. gondii*, cepa ME-49, anteriormente mantidos em células NHDF, foram inoculados nas células (MOI-5). Uma vez transcorrida uma hora e o processo de infecção já estivesse estabelecido,

as células foram lavadas com 1 mL de PBS três vezes. Na sequência, essas células foram fixadas com 200 µl de solução metanol/acetona 1:1 ao longo de 15 minutos, lavadas novamente três vezes com 1 mL de PBS e bloqueadas com 1 mL de PBS/BSA 1% (*Bovine Serum Albumine*) (AMRESCO, EUA) por quatro horas. Ao término do bloqueio, as células foram lavadas três vezes com 1 mL de PBS e o anticorpo primário IgG anti SAG1 (*Surface Antigen 1*) 1:200, produzido em camundongo, foi aplicado nas células por uma hora, (anticorpo gentilmente cedido pelo Dr. Tiago Mineo, Universidade Federal de Uberlândia). Transcorrido esse período, as células eram lavadas três vezes com PBS e foi aplicado o anticorpo secundário anti IgG de camundongo 1:600 produzido em cabra e conjugado a *Alexa Fluor*® 488 (*Thermo Fisher Scientific*, EUA) por 45 minutos. Juntamente com o anticorpo secundário, foi aplicado 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (*Sigma Aldrich*, EUA) na concentração final de 10 µM e T-1824 (Azul Evans) (*Sigma Aldrich*, EUA) na concentração final de 0,1%. Ao término da incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS e uma quarta vez com água deionizada. Ainda com os poços preenchidos por água, as lamínulas foram cuidadosamente removidas e alocadas em lâminas de microscopia previamente higienizadas. Para aderência da lamínula na lâmina, foram aplicados 10 µl de propil 3,4,5-trihidroxi-benzoato, removeu-se a água e o propil 3,4,5-trihidroxi-benzoato residuais com lenço de papel anti estática *Kimwipe*® (*Sigma Aldrich*, EUA) e o conjunto de lamínula com lâmina foi selado com verniz. As imagens foram avaliadas através de um microscópio invertido de deconvolução, modelo *Leica DMI6000* (*Leica Geosystem*, Alemanha). Objetivando manter a confiabilidade dos resultados, esse ensaio foi realizado em três réplicas biológicas (Li, Yawen, Xiu, *et al.*, 2018; Umezu *et al.*, 2013).

3.12 Avaliação da infecção por *T. gondii* e expressão de moléculas de adesão em células endoteliais por citometria de fluxo

Células HBMEC e HUVEC foram semeadas em garrafas T25 na proporção de $5,0 \times 10^5$ células por garrafa em meio de cultivo DMEM e EBM™-2 respectivamente e incubadas a 37°C e com 5% CO₂ atmosférico ao longo de 24 horas. Após o período de incubação, as células foram infectadas por $2,0 \times 10^6$ taquizoítas de *T. gondii* ME-49 GFP (MOI-5). Como controle positivo de ativação endotelial, foi utilizado TNF (Cat. PHC3016, *Thermo Fisher Scientific*, EUA) na concentração final de 10 ng/mL. O controle negativo foi dado pela adição de PBS. Após aguardar 24

horas, as células foram lavadas três vezes com PBS estéril, desaderidas das garrafas de cultivo pela utilização de 2 mL de EDTA (1,5 mM). Após isso, as células foram centrifugadas a 300 x g por 10 minutos, ressuspendidas em 600 µl de PBS e distribuídas igualmente em uma placa de 96 poços, com fundo convexo e previamente incubada com 200 µl de PBS + SFB 1% a 37°C por pelo menos uma hora. Na sequência, essas células foram incubadas por uma hora com anticorpo monoclonal anti-ICAM-1 produzido em camundongo (Cat. SAB4700326-100UG, *Sigma Aldrich*, EUA) ou anti-VCAM-1 monoclonal produzido em camundongo e conjugado a alofococianina (APC) (Cat. SAB4700522-100TST, *Sigma Aldrich*, EUA). Ambos anticorpos foram utilizados em uma concentração de 1:1000. O controle isotípico foi um anticorpo monoclonal IgG1κ produzido em camundongo (cat. 17-4714-42, *eBioscience*, USA) e conjugado a APC na concentração de 1:1000. Transcorrida uma hora, as células foram lavadas três vezes com PBS. As células marcadas com anti-ICAM-1 foram então incubadas por 45 minutos com anticorpo secundário anti-camundongo produzido em coelho, conjugado a *Alexa Fluor*® 633 (cat. A21063, *Thermo Fischer Scientific*, USA) na concentração 1:600. As células incubadas com anticorpo que reconhece VCAM-1 foram incubadas apenas com PBS. Posteriormente, as células foram lavadas três vezes com PBS, ressuspendidas em PBS + EDTA 1,5 mM e conduzidas para avaliação em um citômetro de fluxo FACSCanto II (*Becton Dickinson*, EUA). Os filtros *band pass* utilizados para GFP, APC e *Alexa Fluor*® 633 foram 530/30 e 660/20 respectivamente. APC e *Alexa Fluor*® 633 foram captados pelo mesmo filtro. Os dados obtidos foram analisados e tratados através do *software FLOWJo* v. 10.6.1 (*Becton Dickinson*, EUA) (Duan *et al.*, 2013).

3.13 Avaliação *T. gondii* por microscopia eletrônica de varredura

Taquizoítas foram mantidos em células NHDF cultivadas em garrafas T75 com meio DMEM a 37°C e 5% CO₂ atmosférico até o momento de lise das mesmas. Uma vez que tal evento ocorresse, o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 900 x g por cinco minutos para precipitação dos taquizoítas. Esses foram lavados duas vezes em 10 mL de PBS e ressuspendidos em solução de fixação composta por aldeído glutárico (3%) diluído em solução tampão de cacodilato de sódio 0,1 mol, pH 7,0. As peças foram então lavadas em diversos ciclos de troca de solução tampão e pós fixadas em tetróxido de ósmio 1% ao longo de uma hora. As peças foram

lavadas mais uma vez em solução tampão e transferidas para cestas permeáveis. A desidratação foi composta pela imersão em solução de etanol 50%, 70%, 80%, 95% e 100% e, após a última imersão, o etanol foi substituído por CO₂ líquido. O processo de metalização das amostras foi composto pelo emprego de aspersão de partículas de ouro (Silva *et al.*, 2018).

3.14 Avaliação de vesículas extracelulares e taquizoítas de *T. gondii* por microscopia eletrônica de transmissão

Vesículas extracelulares coletadas a partir de taquizoítas de *T. gondii* ou de células HBMEC ou HUVEC foram obtidas através de protocolo de centrifugação diferencial descrito acima (item 3.7). Uma vez suspensas em PBS, as vesículas foram conduzidas ao preparo para identificação por microscopia eletrônica.

Lâminas de vidro foram mergulhadas em *Formvar* 0,5% + clorofórmio por 10 segundos para formação de uma fina membrana. A lâmina foi então cuidadosamente mergulhada em um Becker com 20 mL de água para o desprendimento da membrana, a qual permanecia flutuante sob a água. Grades metálicas foram então posicionadas na membrana ainda sob a água. O conjunto composto pela membrana e grade foi retirado com o auxílio de um recorte de filme de parafina plástica e deixado em uma placa de Petri para secar ao longo de 10 minutos. Transcorrido esse tempo, a neutralização da eletricidade estática foi realizada com o auxílio de um ionizador antiestético tipo pistola *Zerostat* (*Milty*, Inglaterra). Após isso, 50 µl de PBS contendo as vesículas extracelulares foram aplicados sobre as grades, as quais foram deixadas para secar ao longo de 1 hora protegidas em placas de Petri devidamente fechadas. Ao fim desse período, o excesso de PBS foi removido com o auxílio de uma toalha de papel posicionado cuidadosamente ao lado da grade. Uma vez que as grades se encontravam secas, iniciava-se a contrastação negativa das amostras a qual iniciava-se com uma nova neutralização da eletricidade estática. Após isso, 1 mL de acetato de uranila foi filtrado em membrana de 0,22 µl e cuidadosamente aplicado em um filtro de papel até compor uma pequena gota com circunferência similar ao das grades metálicas. As grades foram então cuidadosamente posicionadas sobre as gotas de acetato de uranila e aguarda-se 20 minutos com a estrutura protegida da luz. Assim que terminasse esse tempo, as grades foram cuidadosamente secas por um papel e guardadas para análises posteriores. As amostras foram avaliadas em microscópio

eletrônico de transmissão, modelo *JEM-1400Plus* (JEOL, USA) (Li, Yawen, Xiu, *et al.*, 2018; Wowk *et al.*, 2017).

3.14.1 Preparo de taquizoítas para microscopia eletrônica de transmissão

Taquizoítas foram mantidos em células NHDF cultivadas em garrafas T75 com DMEM a 37°C e 5% CO₂ atmosférico até o momento de lise das mesmas. Uma vez que tal evento ocorresse, o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 900 x g por cinco minutos para precipitação dos taquizoítas. Esses foram então lavados duas vezes em 10 mL de PBS e ressuspensos em solução de fixação composta por aldeído glutárico (3%) diluído em solução tampão de cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,0. As peças foram então lavadas em diversos ciclos de troca de solução tampão e pós fixadas em tetróxido de ósmio 1% ao longo de uma hora. As peças foram então lavadas mais uma vez em solução tampão e transferidas para cestas permeáveis. A desidratação foi composta pela imersão em solução de etanol 50%, 70%, 80%, 95% e 100%. Após isso, as amostras foram emblocadas em solução de resina/acetona 1:1, a qual foi trocada após oito horas e incubada a 60°C por dois dias. Uma vez transcorrido esse período, foram realizados cortes ultrafinos os quais foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo (Melo, Attias e Souza, De, 2000).

3.15 Preparo de extrato proteico para eletroforese

Extrato total proteico de *T. gondii*, células HBMEC e HUVEC e de vesículas extracelulares tanto de taquizoítas como de células foi obtido a partir da cultura das células ou parasitos. Para a obtenção de extrato total proteico de *T. gondii*, 1,0 x 10⁸ taquizoítas foram cultivados em garrafas T150 com células NHDF nas condições já citadas anteriormente. Uma vez que as células encontravam-se lisadas e os parasitos livres no sobrenadante, o meio com taquizoítas era coletado, centrifugado a 900 x g por cinco minutos e o precipitado composto pelos parasitos era lavado três vezes com 10 mL de PBS e ressuspensos em tampão de lise composto por: Tris HCl 0,25 molar pH 6,8; 40% de glicerol; 8% de sódio dodecil sulfato (SDS); 5% de 2-betamercaptoetanol; 0,04% de azul de bromofenol. O extrato total proteico de vesículas extracelulares de *T. gondii* e de células foi obtido a partir da última etapa da ultracentrifugação em procedimento já citado anteriormente. Todavia, o

precipitado enriquecido não foi ressuspensionado em PBS, mas sim diretamente em tampão de lise.

O extrato proteico de células foi obtido a partir de $2,0 \times 10^8$ células HBMEC e HUVEC cultivadas em garrafas T150 em condições já citadas anteriormente. As células foram desaderidas da superfície das garrafas pela aplicação de 5 mL de EDTA 1,5 mM, aguardavam-se 15 minutos. Uma vez transcorrido esse tempo, o sobrenadante contendo as células foi centrifugado a $300 \times g$ por cinco minutos. O precipitado foi então lavado três vezes com 10 mL de PBS. Após a última lavagem o precipitado foi ressuspensionado em 50 μ l de tampão de lise.

Taquizoítas, células ou vesículas extracelulares foram adicionados à solução de lise por ciclos de pipetagem e agitação a 4°C até resultar em uma solução de aspecto viscoso. A solução foi fervida em bloco térmico a 94°C por cinco minutos e passou por dois ciclos de sonicação a 5 dB por 15 segundos. O produto resultante foi submetido a uma centrifugação a $13.000 \times g$ a 4°C por cinco minutos e o novo sobrenadante foi associado a um reagente fluorescente e quantificado através de um fluorômetro *Qubit® 2,0 (Thermo Fischer Scientific, EUA)* em comprimento de onda entre 485 e 590 nm. Após a quantificação, 0,04% de azul de bromofenol foi adicionado à amostra (Li, Yawen, Xiu, *et al.*, 2018).

3.16 Avaliação do conteúdo proteico em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata

Cerca de 10 μ g de extrato proteico em tampão de lise contendo 0,04% de azul de bromofenol (tampão de amostra) foi adicionado por poço em gel de poliacrilamida 12%, com as dimensões de 8,6 x 6,7 cm. O volume do material aplicado foi corrigido com tampão de amostra com o objetivo de uniformizar o processo de migração das amostras ao longo dos géis preparativo e resolvidor. Um marcador de peso molecular *PageRuler™ 26616 (Thermo Fischer Scientific, USA)* foi utilizado para avaliar comparativamente o peso das proteínas contidas nos extratos proteicos. A eletroforese foi realizada ao longo de 120 minutos sob configuração constante de 10 V/cm no gel preparativo e 15 V/cm no gel resolvidor em cuba vertical *Mini-Protean Tetra Cell (Bio Rad, EUA)*. Uma vez que a transferência fosse concluída, o gel era fixado em solução de fixação, a qual era composta por 25 mL de etanol absoluto, 6 mL de ácido acético e 25 μ l de formaldeído 26,5% em 18,75 mL de água $18,2 \text{ m}\Omega/\text{cm}^3$ ao longo de ao menos 30 minutos a 4°C. Após isso, o gel foi

lavado em solução de etanol 50% por 5, 10 e 15 minutos consecutivamente para ser sensibilizado em solução composta por 10 mg de tiosulfato de sódio em 50 mL de água 18,2 mΩ/cm³ ao longo de dois minutos. Uma vez sensibilizado, o gel foi imerso em solução composta por 100 mg de nitrato de prata e 25 µl formaldeído 26,5% em 50 mL de água 18,2 mΩ/cm³ por 30 minutos. Assim que transcorresse esse período, o gel foi conduzido à solução de revelação composta por 1,5 g de carbonato de sódio, 1 mL de solução de sensibilização e 25 µl de formaldeído 26,5% em 48,75 mL de água 18,2 mΩ/cm³ e agitado até a visualização das bandas de proteínas. A interrupção da reação foi realizada com a adição da solução de fixação. Após isso, o gel foi armazenado em água (Peterson *et al.*, 2008; Wowk *et al.*, 2017).

3.17 Preparo e avaliação do conteúdo proteico de vesículas extracelulares

O extrato total proteico de vesículas extracelulares de células ou taquizoítas foi obtido conforme anteriormente descrito. Cerca de 50 µg do extrato proteico foi adicionado por poço em gel de poliacrilamida 12%, com as dimensões de 8,6 x 6,7 cm. O volume do material aplicado foi corrigido com tampão de amostra com o objetivo de uniformizar o processo de migração das amostras ao longo dos géis preparativo e resolvidor. A eletroforese foi realizada ao longo de 40 minutos sob configuração constante de 10 V/cm no gel preparativo e resolvidor em cuba vertical *Mini-Protean Tetra Cell (Bio Rad, EUA)*. Assim que a o material proteico avançasse ao longo de 2 centímetros no gel resolvidor a eletroforese era interrompida. Com o intuito de avaliar o processo de migração das proteínas ao longo do gel e facilitar o processo de excisão, o mesmo foi corado com nitrato de prata conforme descrito acima (item 3.16) (Wowk *et al.*, 2017).

3.17.1 Excisão do gel e preparo das amostras

O gel contendo as amostras foi descorado com solução de Tiosulfato de Sódio 100 mM e Ferricianeto de Potássio 30 mM na proporção 1:1 e incubado por 10 minutos a 25°C sob agitação de 800 rpm. Após isso, foi adicionada a solução ABC (*avidin biotin complex*) 50 mM às amostras que foram incubadas novamente por 10 minutos a 25°C sob agitação de 800 rpm. O procedimento foi repetido até a completa descoloração das amostras. Após isso as amostras foram desidratadas em etanol absoluto a 25°C sob agitação de 800 rpm e concentradas em equipamento *SpeedVac Savant™ SPD131DDA (Thermo Scientific, USA)* por sete minutos com

pressão de vácuo de 0,1 vol/unid. Uma vez que as amostras se encontravam concentradas foi adicionado tampão de redução composto por solução de DTT 10 mM em ABC 50 mM e a mistura foi incubada por 60 minutos a 60°C sob agitação de 800 rpm. Após isso o sobrenadante foi removido, adicionado tampão de alquilação composto por solução de iodoacetamina 55 mM em ABC 50 mM e as amostras foram incubadas por 45 minutos a 25°C sob agitação de 800 rpm em ambiente protegido da luz. Uma vez transcorrido esse período, o sobrenadante foi retirado, foi adicionado tampão de digestão, o qual era composto por solução aquosa de ABC 50 mM e as amostras foram incubadas por 20 minutos a 25°C sob agitação de 800 rpm. Sequencialmente, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram novamente desidratadas com etanol absoluto e incubadas por 10 minutos a 25°C sob agitação de 800 rpm. As etapas de adição de tampão de digestão e desidratação foram repetidas uma segunda vez e, posteriormente, concentradas em equipamento *SpeedVac* (*Thermo Scientific*, USA) por sete minutos com pressão de vácuo de 0,1 vol/unid. Após isso, foi adicionada solução de tripsina 12,5 ng/μl diluída em solução ABC 50 mM e as amostras foram incubadas por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, foi adicionado tampão de digestão e incubado a 37°C por 18 horas. Sequencialmente foi adicionada solução de extração composta por água, TFA 3% e acetonitrila 30% e as amostras foram incubadas por 10 minutos a 25°C sob agitação de 800 rpm. O sobrenadante foi retirado e a etapa repetida. Após isso, foi adicionada acetonitrila e as amostras foram incubadas por 10 minutos a 25°C sob agitação de 800 rpm. O sobrenadante foi retirado e a etapa repetida. Posteriormente, as amostras foram concentradas em equipamento *SpeedVac* (*Thermo Scientific*, USA) por sete minutos com pressão de vácuo de 0,1 vol/unid. (Wowk *et al.*, 2017).

3.17.2 Purificação e eluição de peptídeos

Antes da purificação, *Stage Tips* foram acoplados a um adaptador e tubo de lavagem e centrifugados a 1.000 x *g* por 10 minutos com 100 μl de metanol (grau LC-MS). Após isso, os *Stage Tips* foram equilibrados duas vezes com 100 μl de solução A composta por água e ácido fórmico 0,1% e centrifugados a 1.000 x *g* por 2 minutos. Sequencialmente, a solução A foi retirada, foram adicionados 200 μl de amostra nos *Stage Tips* e centrifugados a 1.000 x *g* por 5 minutos. Para a eluição dos peptídeos, foram adicionados 20 μl de solução E (ácido fórmico 0,1% e ACN 40%) e as amostras foram centrifugadas a 1.000 x *g* por 1 minuto. O processo foi repetido uma segunda vez. Após isso, as amostras foram concentradas em

equipamento *SpeedVac* (*Thermo Scientific*, USA) por sete minutos com pressão de vácuo de 0,1 vol/unid. e diluídas em solução AD (ácido fórmico 0,1%, DMSO 5% e ACN 5%). As amostras foram analisadas em equipamento de cromatografia líquida *Thermo Scientific Easy-nLC* (*Thermo Scientific*, EUA) acoplado a um espectrômetro de massas *LTQ-Orbitrap XL ETD* (*Thermo Scientific*, EUA). Todo o protocolo de preparo e análise de peptídeos por espectrometria de massas foi obtido a partir da Plataforma de Espectrometria de Massas-ICC/FIOCRUZ. Os dados resultantes foram tratados com o auxílio do software *Perseus 1.6.10.43* (*Max-Planck Institute of Biochemistry*, Alemanha) (Wowk *et al.*, 2017).

3.18 Análises Estatísticas

A avaliação estatística dos resultados foi realizada conforme os dados obtidos a partir de cada experimento. Análise de variância (ANOVA) seguida de Teste de Tukey foram aplicadas para análises múltiplas não pareadas e consideradas com distribuição de *Gauss* normal (paramétricas). Teste t foi utilizado para realização da comparação de médias entre duas variáveis não pareadas e paramétricas. Os mapas de calor, foram construídos com a aplicação de um espaço métrico entre as medidas, utilizando a distância Euclidiana. Os agrupamentos amostrais foram construídos a partir da distribuição de Pearson, utilizando para isso os *Softwares RStudio 3.5.3* (*RStudio inc.*, EUA) e *Perseus 1.6.10.43* (*Max-Planck Institute of Biochemistry*, Alemanha). A análise de enriquecimento de ontologia genética foi realizada pela utilização da plataforma *ShinyGO v0.61* (*Ge-Lab*, EUA).

A discriminação dos testes estatísticos selecionados encontra-se na legenda das respectivas figuras. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do *Software GraphPad Prism 8.0* (*GraphPad Software, Inc.*, EUA). Assumiu-se como estatisticamente significativas, análises com o valor-*p* – probabilidade de significância ou nível descritivo – igual ou inferior a 0,05.

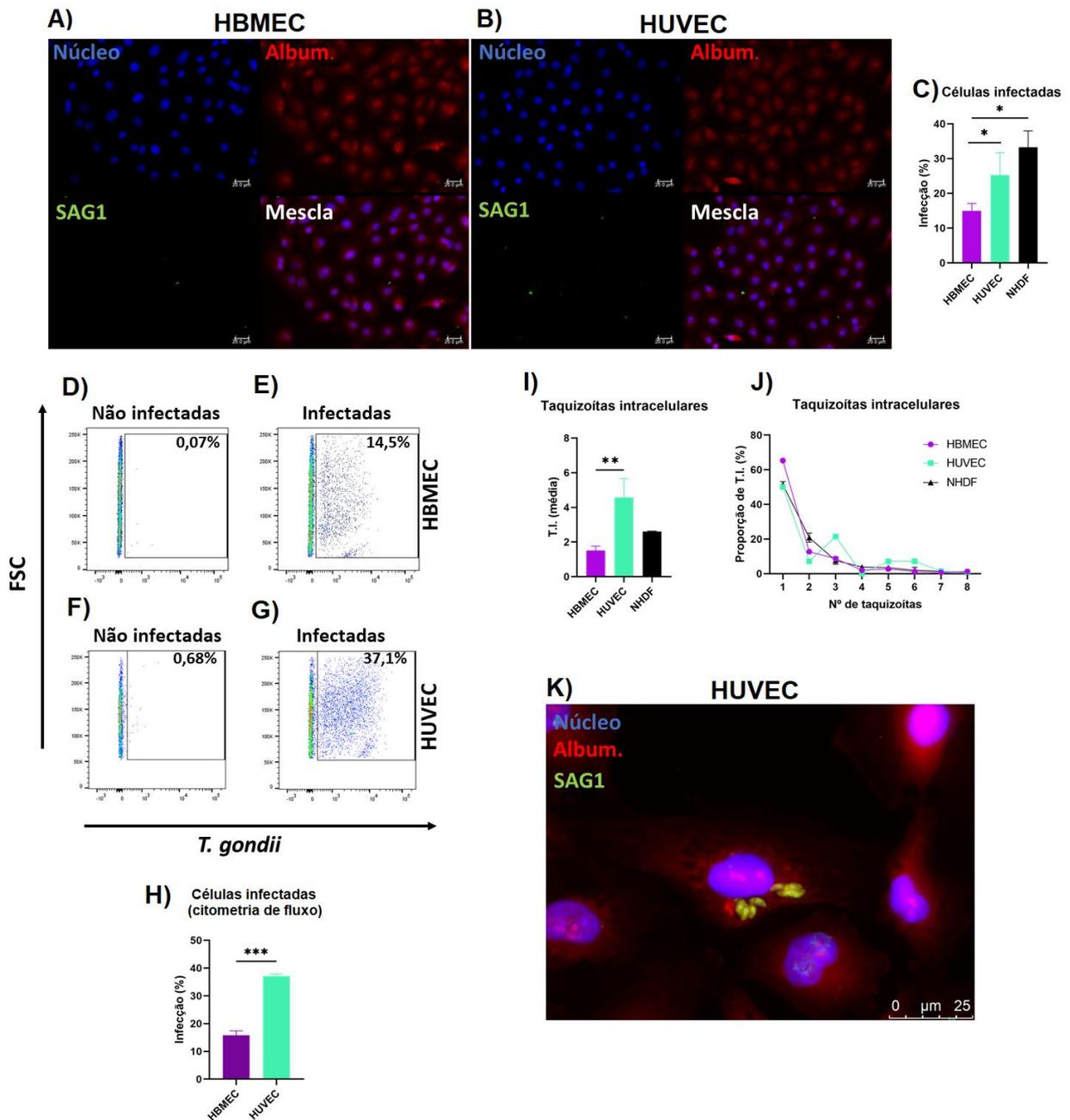
4 RESULTADOS

4.1 A carga parasitaria em células HUVEC é maior que em células HBMEC

T. gondii é capaz de invadir e replicar-se na maior parte das células eucarióticas. Neste trabalho foi avaliado o potencial de infecção do parasito em células endoteliais HUVEC e HBMEC. Células NHDF são caracterizadas como padrão ouro para o cultivo desses parasitos e, por conta disso, foram utilizadas como controle positivo desse experimento.

Através de microscopia de fluorescência foi possível quantificar os taquizoítas intracelulares em células HBMEC e HUVEC (Figura 4.1 A e B). Os resultados encontrados demonstram uma diferença na invasão dos taquizoítas ao comparar células HBMEC e NHDF (ANOVA/Tukey, $p < 0,0159$) e células HBMEC com HUVEC (ANOVA/Tukey, $p = 0,0528$) (Figura 4.1 C). Muito embora o padrão ouro para a avaliação da infecção seja por microscopia, também foi realizada essa avaliação por citometria de fluxo. Para essa técnica foi possível categorizar as células infectadas daquelas não infectada através da GFP expressa nos taquizoítas. Os resultados obtidos por citometria de fluxo (Figura 4.1 D-G) também revelam que células HUVEC e HBMEC apresentam uma diferença na infecção por *T. gondii* (Teste t, $p < 0,001$) (Figura 4.1H). Sequencialmente, a capacidade de uma única célula em albergar parasitos foi avaliada. Foi observado que células HUVEC albergam a maior proporção de parasitos por célula, quando comparado a HBMEC, (ANOVA/Tukey, $p = 0,0075$). No entanto, essa diferença não foi observada quando comparado a células NHDF (ANOVA/Tukey, $p = 0,0639$) (Figura 4.1 I e J). Células HUVEC foram observadas com até oito taquizoítas em uma única célula (Figura 4.1 K).

Figura 4.1 – Taxa de infecção por *T. gondii* e número de taquizoítas intracelulares são diferentes entre células endoteliais.



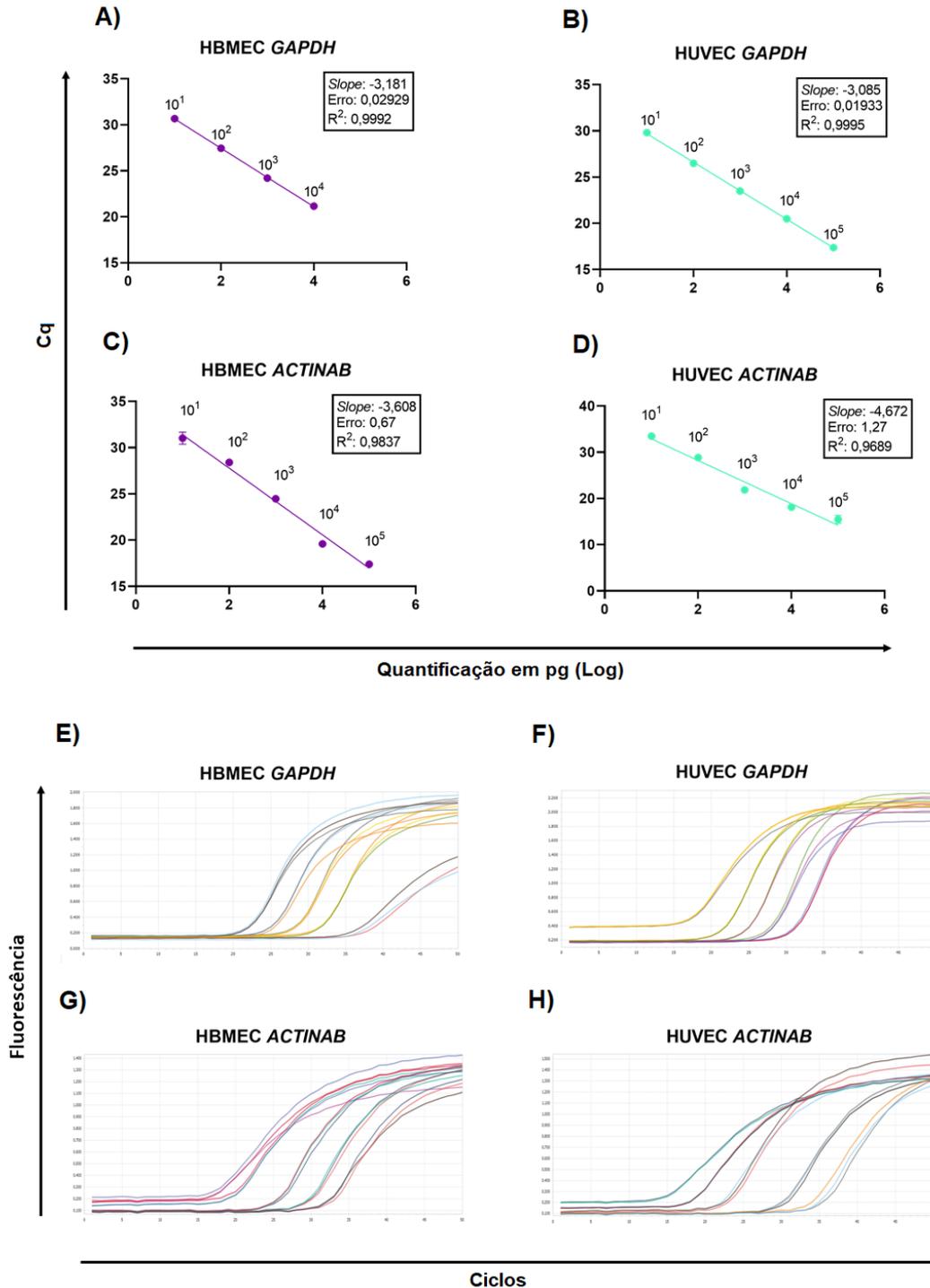
Notas: Células NHDF, HBMEC e HUVEC foram cultivadas em garrafas de cultivo por 24 horas. Após esse tempo, foram adicionados taquizoítas em uma MOI-5 por 1 hora, fixadas com solução metanol/acetona 1:1 e marcadas com DAPI, anticorpo primário anti SAG1 e secundário anti IgG de camundongo conjugado a Alexa FLuor® 488. Os taquizoítas intracelulares foram contados em objetiva de 40x (A e B) e a confirmação, quando necessário, foi realizada em objetiva de 100x (K). Os dados foram obtidos a partir de cinco campos de visualização em três réplicas biológicas e técnicas e os resultados expressos graficamente. (C, I e J). Para comparação, foi separado outro grupo de células infectadas com taquizoítas GFP e contadas por citometria de fluxo (D-G) e os resultados expressos graficamente (H). Os dados gráficos estão expressos como a média \pm erro padrão da média. FSC: dispersão frontal; MOI: multiplicidade de infecção; barra de escala no valor de 20.0 μ m (A e B); *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Teste t e ANOVA/Tukey). Fonte: do autor, 2020.

4.2 Células endoteliais infectadas com o *T. gondii* apresentam alterações transcricionais distintas

Células endoteliais são passíveis de serem infectadas por *T. gondii*, no entanto pouco é sabido sobre os eventos moleculares que sucedem a infecção. Para tal, nesse estudo foi avaliado o perfil transcricional de células HBMEC e HUVEC quando infectadas com *T. gondii*, com foco em moléculas associadas a ativação ou disfunção endotelial. Com esse intuito, o primeiro passo foi determinar uma concentração apropriada de material genético a ser analisada. Para tal, construiu-se uma curva de regressão linear baseada na expressão dos genes constitutivos *GAPDH* e *ACTINAB* em HBMEC (Figura 4.2 A e C) e HUVEC (Figura 4.2 B e D). Foram realizadas reações de qPCR, para a amplificação de *GAPDH* e *ACTINAB*, com concentrações de $1,0 \times 10^5$, $1,0 \times 10^4$, $1,0 \times 10^3$, $1,0 \times 10^2$, $1,0 \times 10^1$ picogramas de cDNA, obtido a partir dessas células endoteliais.

Foi observado que quando utilizado $1,0 \times 10^5$ pg de cDNA de células HBMEC para a amplificação de *GAPDH*, esse resultou em uma curva de amplificação retardatória em comparação com, até mesmo, a curva de amplificação obtida pela menor quantia de cDNA avaliada (Figura 4.2 E). Por outro lado, na concentração de $1,0 \times 10^5$ pg de cDNA de HUVEC foi possível obter um Cq (*cycle quantification*) menor, seguindo um padrão, onde quanto maior a concentração de cDNA utilizada, menor o Cq obtido (Figura 4.2 F). Na avaliação da expressão de *ACTINAB*, observou-se um padrão similar aquele evidenciado na expressão de *GAPDH* em células HUVEC (Figura 4.2 B e D). Diferentemente de *GAPDH*, não foi observado o desenvolvimento de uma curva de amplificação retardatória de *ACTINAB* mesmo com a utilização de $1,0 \times 10^5$ pg de cDNA de HBMEC ou HUVEC (Figura 4.2 G e H). Com base nesses valores, julgou-se propícia a análise dos genes de interesse a partir de $1,0 \times 10^4$ pg de cDNA obtido a partir de células HBMEC e HUVEC. Mesmo que menores quantias de cDNA também fossem capazes de fornecer valores fidedignos (Figura 4.2 A e B), o valor do Cq aumentou significativamente conforme reduzia-se logaritmicamente a quantia de cDNA.

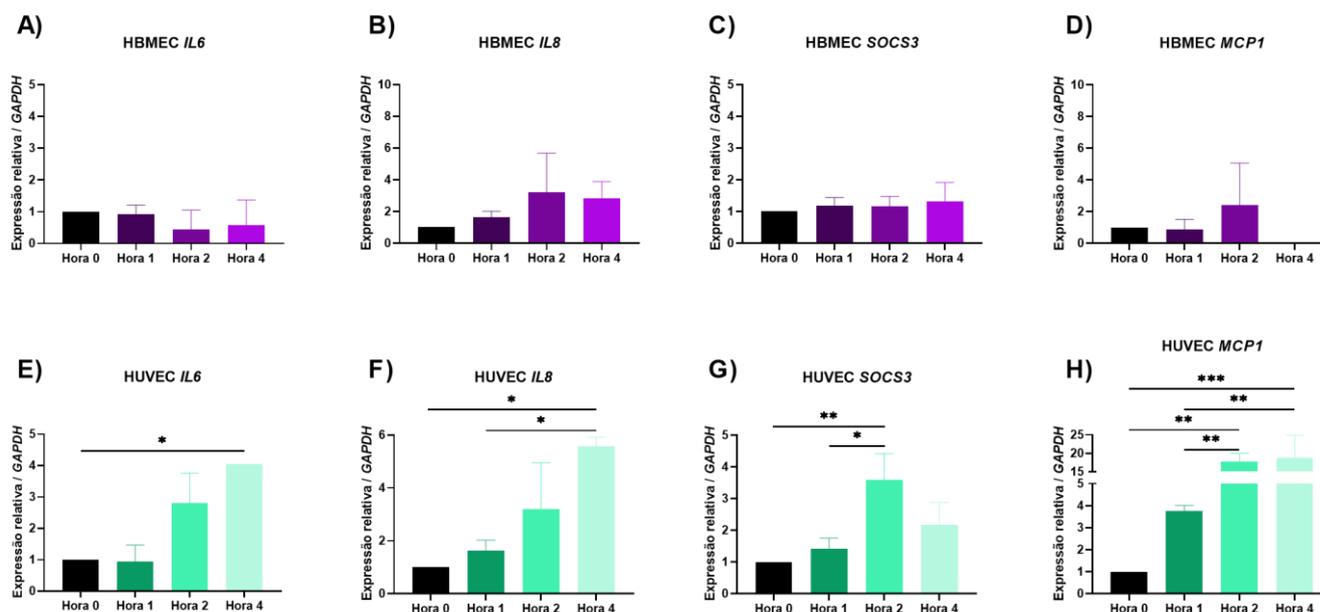
Figura 4.2 – Avaliação da curva padrão para *GAPDH* e *ACTINAB* em células endoteliais.



Notas: o RNA de células HBMEC e HUVEC foi extraído, quantificado e transcrito para cDNA. A curva padrão foi construída a partir de uma diluição seriada do cDNA das células nas concentrações de 1, 10, 100, 1.000 e 10.000 pg. Oligonucleotídeos específicos foram utilizados em reações qPCR para avaliar a expressão dos genes constitutivos *GAPDH* e *ACTINAB* em células HBMEC (A e C) e HUVEC (B e D) acompanhadas das respectivas curvas de amplificação de HBMEC (E e G) e HUVEC (F e H). Os dados foram obtidos a partir de três réplicas biológicas e técnicas e estão expressos como a média \pm desvio padrão da média. Cq: *Cycle quantification*; valores de *Slope*, erro e *coeficiente de determinação* (R^2) obtidos através de análise de regressão linear. Fonte: do autor, 2020.

Uma vez que foi conhecida a quantia de cDNA ideal para a análise da expressão gênica, a avaliação de marcadores de ativação e disfunção endotelial foi realizada por qPCR. No âmbito da inflamação, não foram observadas alterações estatisticamente significativas para os genes *IL6*, *IL8* e *SOCS3* em células HBMEC ao longo do processo de infecção (Figura 4.3 A-C). Em adição, *MCP1* não teve alteração estatisticamente significativa nas horas 1 e 2 pós infecção, porém na hora 4 pós infecção não foi possível observar níveis detectáveis de transcritos (Figura 4.3 D). Em células HUVEC, foi observada um aumento transcricional de *IL6*, *IL8*, *SOCS3* e *MCP1*. Enquanto *IL6* e *IL8* apresentaram uma alteração transcricional estatisticamente significativa na hora 4 pós infecção (ANOVA/Tukey, $p = 0,0417$ e $p = 0,0115$ respectivamente) (Figura 4.3 E e F), *SOCS3* e *MCP1* apresentaram alterações a partir da hora 2 pós infecção (ANOVA/Tukey, $p < 0,05$). Embora tenha ocorrido um aumento de *SOCS3* em células HUVEC na hora 2 pós infecção (ANOVA/Tukey, $p = 0,0097$), esse retornou a níveis similares ao controle não infectado na hora 4 pós infecção (G). A principal alteração transcricional observada foi o gene *MCP1* em células HUVEC infectadas, a qual atingiu um aumento próximo a 25 vezes superior à expressão basal (ANOVA/Tukey, $p = 0,0007$) (Figura 4.3 H). Não foram observados níveis detectáveis dos genes *IL1A*, *IL1B*, *IL10*, *IL10RA*, *IL10RB* e *TNF* tanto em células HBMEC como HUVEC infectadas ou não (dados não apresentados).

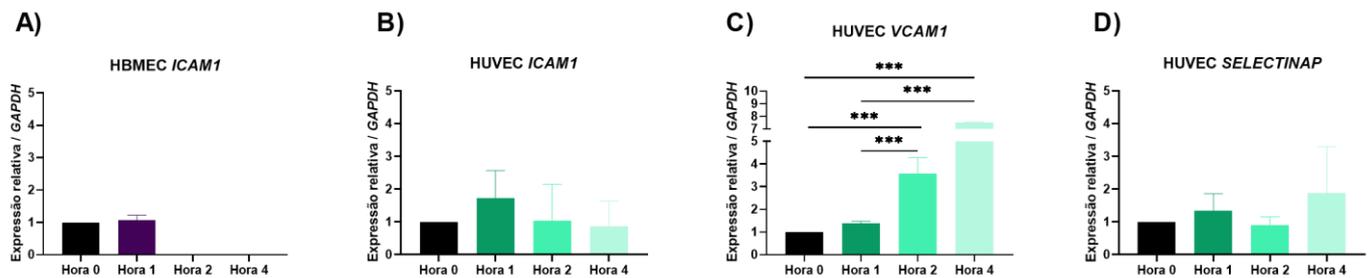
Figura 4.3 – Células HUVEC infectadas por *T. gondii* apresentam alterações transcricionais relacionadas à inflamação enquanto células HBMEC mantém uma transcrição basal.



Notas: células endoteliais de linhagem HBMEC e HUVEC foram expostas ao parasito *T. gondii* por 1, 2 ou 4 horas. Na sequência, o RNA das células foi extraído, quantificado e transcrito para cDNA. Oligonucleotídeos específicos foram utilizados em reações de PCR quantitativa para medir os níveis de expressão dos genes *IL6* (A e E), *IL8* (B e F), *SOCS3* (C e G) e *MCP1* (D e H). A análise dos dados foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, onde o gene constitutivo *GAPDH* foi utilizado como normalizador. Os dados foram obtidos a partir de três réplicas biológicas e técnicas e estão expressos como a média \pm erro padrão da média. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,001$ (ANOVA/Tukey). Fonte: do autor, 2020.

No âmbito da expressão gênica relacionada às moléculas de adesão, células HUVEC apresentaram alterações que não foram observadas em HBMEC. Apesar de ser observada uma expressão basal e constitutiva de *ICAM1* em células HUVEC ao longo de todas as horas estudadas (Figura 4.4 B), não foram observados níveis detectáveis do mesmo transcrito em células HBMEC a partir da hora 2 pós infecção (Figura 4.4 A). A expressão de *VCAM1* em células HUVEC apresentou alterações a partir de 2 horas pós infecção, chegando a atingir 7,5 vezes mais transcritos ao comparar com a hora zero ($p < 0,001$) (Figura 4.4 C). Não foram observados níveis detectáveis de transcritos de *VCAM1* e *SELECTINAP* em células HBMEC ao longo de todas as horas avaliadas. *SELECTINAE* não foi expresso em níveis detectáveis ao longo de todas as horas e por ambas as linhagens celulares (dado não mostrado).

Figura 4.4 – Células HUVEC infectadas por *T. gondii* apresentam um aumento de expressão de *VCAM1*.

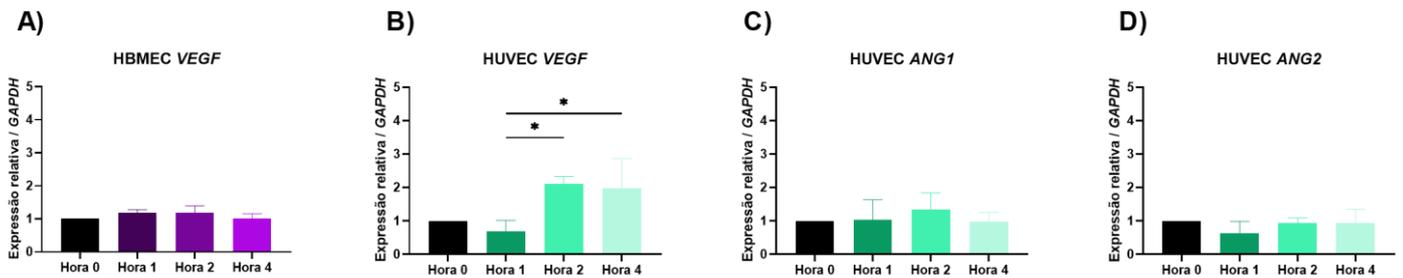


Notas: células endoteliais de linhagem HBMEC e HUVEC foram expostas ao parasito *T. gondii* por 1, 2 ou 4 horas. Na sequência, o RNA das células foi extraído, quantificado e transcrito para cDNA. Oligonucleotídeos específicos foram utilizados em reações de qPCR para medir os níveis de expressão dos genes *ICAM1*, *VCAM1* e *SELECTINAP* a partir de células HBMEC (A) e HUVEC (B, C e D). A análise dos dados foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, onde o gene constitutivo *GAPDH* foi utilizado como normalizador. Os dados foram obtidos a partir de três réplicas biológicas e técnicas e estão expressos como a média \pm erro padrão da média. ***: $p < 0,001$ (ANOVA/Tukey). Fonte: do autor, 2020.

Ao avaliar genes relacionados à angiogênese e permeabilidade vascular, foi observada uma expressão gênica diferenciada entre as linhagens celulares. Enquanto células HBMEC exibiram uma expressão basal de *VEGF* ao longo de todas as horas estudadas (Figura 4.5 A), células HUVEC apresentaram um aumento da expressão desse gene a partir da hora 2 pós infecção (ANOVA/Tukey, $p = 0,0287$) (Figura 4.5 B). Embora não tenha sido observado alteração transcricional estatisticamente significativa dos genes *ANG1* e *ANG2*, estes foram expressos em níveis detectáveis apenas em células HUVEC ao longo de todas as horas estudadas (Figura 4.5 C e D).

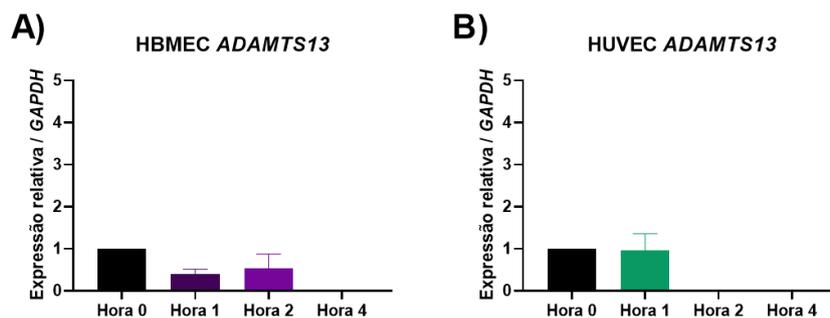
Também foram avaliados os genes *ADAMTS13* e *VWF*, os quais apresentam um papel importante na coagulação/homeostase desempenhado pelo endotélio. Não foram observados níveis detectáveis de *VWF* em qualquer hora avaliada nesse estudo. Em contrapartida, foi possível observar níveis detectáveis de transcritos de *ADAMTS13* em ambas as linhagens celulares. Todavia, além de não ter sido observada qualquer alteração estatisticamente significativa, deixam de ser observados níveis detectáveis de transcritos a partir da hora 2 e 4 pós infecção em células HUVEC e HBMEC respectivamente (Figura 4.6 A e B).

Figura 4.5 – Células HUVEC infectadas por *T. gondii* apresentaram um aumento da expressão de *VEGF* enquanto células HBMEC mantiveram a expressão basal.



Notas: células endoteliais de linhagem HBMEC e HUVEC foram expostas ao parasito *T. gondii* por 1, 2 ou 4 horas. Na sequência, o RNA das células foi extraído, quantificado e transcrito para cDNA. Oligonucleotídeos específicos foram utilizados em reações de *PCR* quantitativa para medir os níveis de expressão dos genes *VEGF* (A e B), *ANG1* (C) e *ANG2* (D). A análise dos dados foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, onde o gene constitutivo *GAPDH* foi utilizado como normalizador. Os dados foram obtidos a partir de três réplicas biológicas e técnicas e estão expressos como a média \pm desvio padrão da média. *: $p < 0,05$ (ANOVA/Tukey). Fonte: do autor, 2020.

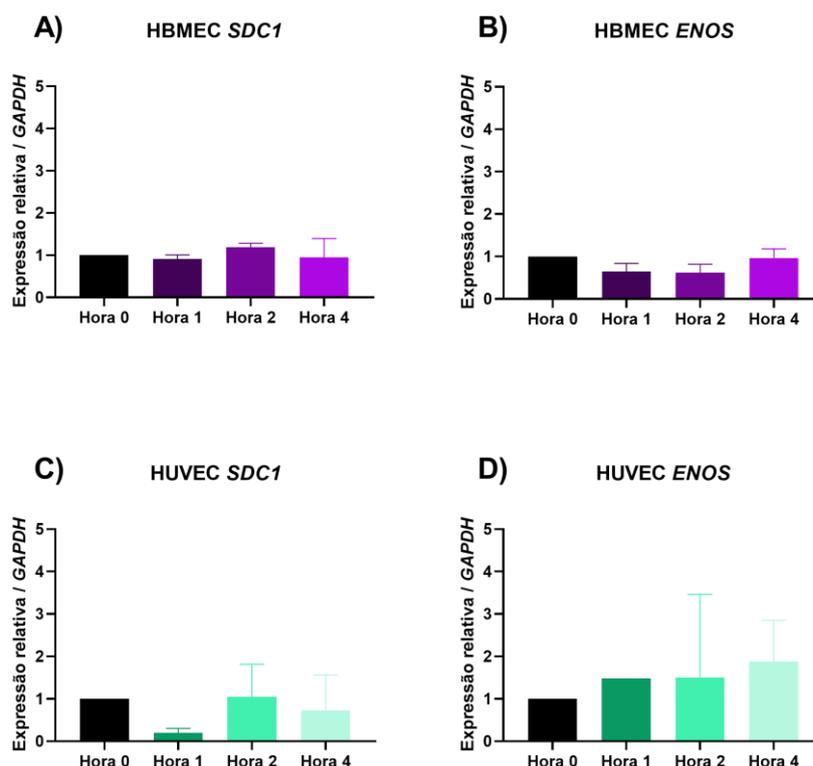
Figura 4.6 – Células endoteliais infectadas com *T. gondii* apresentaram uma regulação negativa de genes relacionados à coagulação.



Notas: células endoteliais de linhagem HBMEC e HUVEC foram expostas ao parasito *T. gondii* por 1, 2 ou 4 horas. Na sequência, o RNA das células foi extraído, quantificado e transcrito para cDNA. Oligonucleotídeos específicos foram utilizados em reações de *PCR* quantitativa para medir os níveis de expressão do gene *ADAMTS13* (A e B). A análise dos dados foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, onde o gene constitutivo *GAPDH* foi utilizado como normalizador. Os dados foram obtidos a partir de três réplicas biológicas e técnicas e estão expressos como a média \pm desvio padrão da média. (ANOVA/Tukey). Fonte: do autor, 2020.

Os genes selecionados para avaliar alterações relacionadas à disfunção endoteliais foram *SDC1* e *ENOS*. Muito embora tenha sido possível verificar níveis detectáveis de ambos os genes nas duas linhagens celulares e ao longo de todas as horas estudadas, não foi observada qualquer alteração estatisticamente significativa (Figura 4.7 A-D).

Figura 4.7 – Células HUVEC e HBMEC infectadas por *T. gondii* mantiveram uma expressão basal de genes relacionados à disfunção endotelial.



Notas: células endoteliais de linhagem HBMEC e HUVEC foram expostas ao parasito *T. gondii* por 1, 2 ou 4 horas. Na sequência, o RNA das células foi extraído, quantificado e convertido para cDNA. Oligonucleotídeos específicos foram utilizados em reações de *PCR* quantitativa para medir os níveis de expressão dos genes *SDC1* (A e C) e *ENOS* (B e D). A análise dos dados foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, onde o gene constitutivo *GAPDH* foi utilizado como normalizador. Os dados foram obtidos a partir de três réplicas biológicas e técnicas e estão expressos como a média \pm desvio padrão da média. Fonte: do autor, 2020.

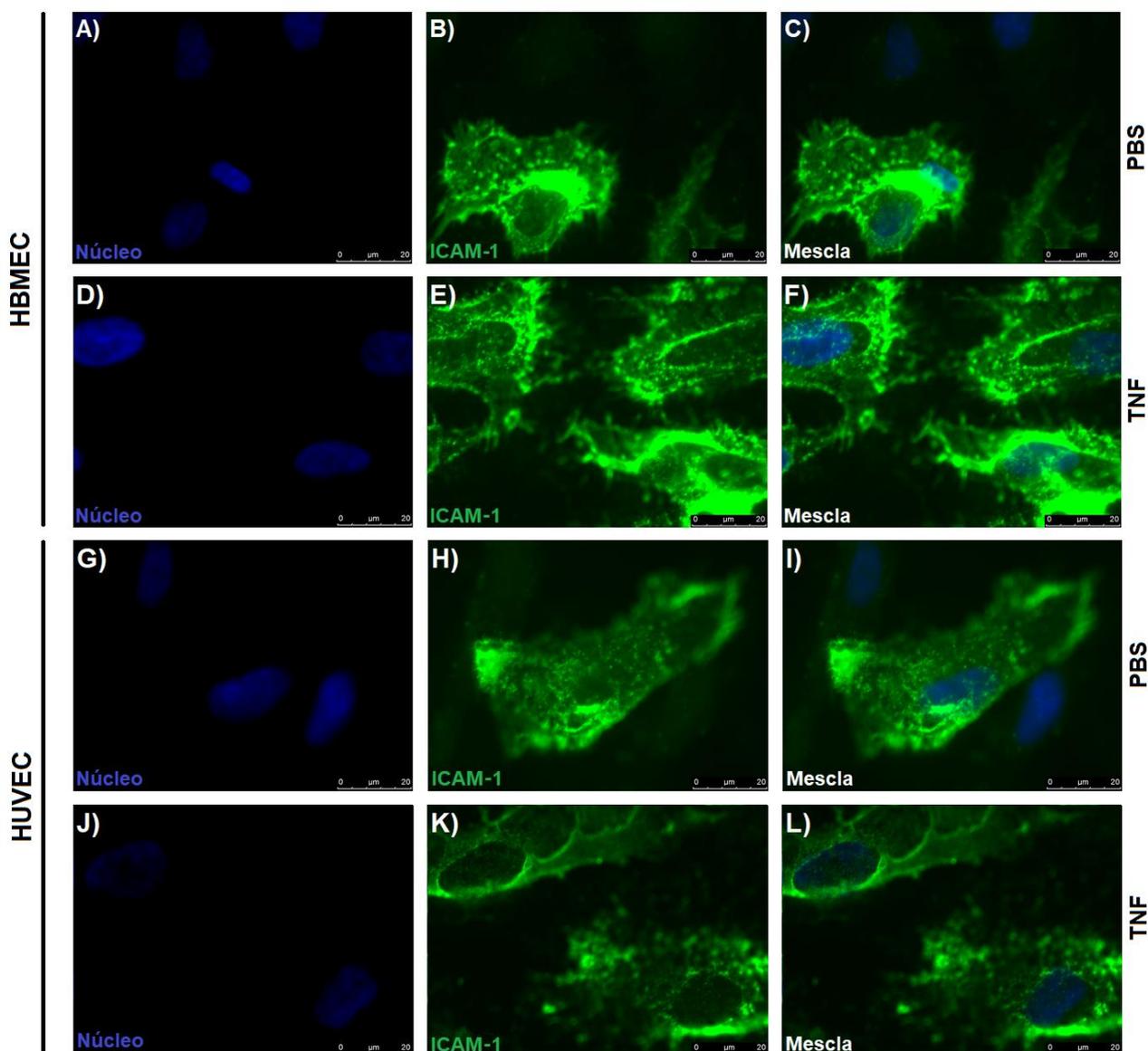
4.3 Infecção de células endoteliais por *T. gondii* promove alteração na expressão de moléculas de adesão na superfície celular de forma independente da expressão transcricional

Uma vez observado o aumento de expressão gênica de VCAM-1, julgamos conveniente avaliar essa alteração a nível proteico. Para tal, foi avaliada a expressão de ICAM-1 e VCAM-1 em células HBMEC e HUVEC estimuladas com TNF (10 ng/ml). Na ausência de estímulo, cerca de metade das células HBMEC analisadas expressavam ICAM-1 (Figura 4.8 A-C e G-H). Nessas mesmas condições, células HUVEC expressavam ICAM-1 apenas em uma pequena parcela de células (Figura 4.8 A-C e G-H). Também foi possível observar células expressando ICAM-1 próximas a outras que não a expressavam (Figura 4.8 C e I).

Ao avaliar células estimuladas com TNF, todas as células nos campos observados expressavam ICAM-1 (Figura 4.8 D-F e J-L).

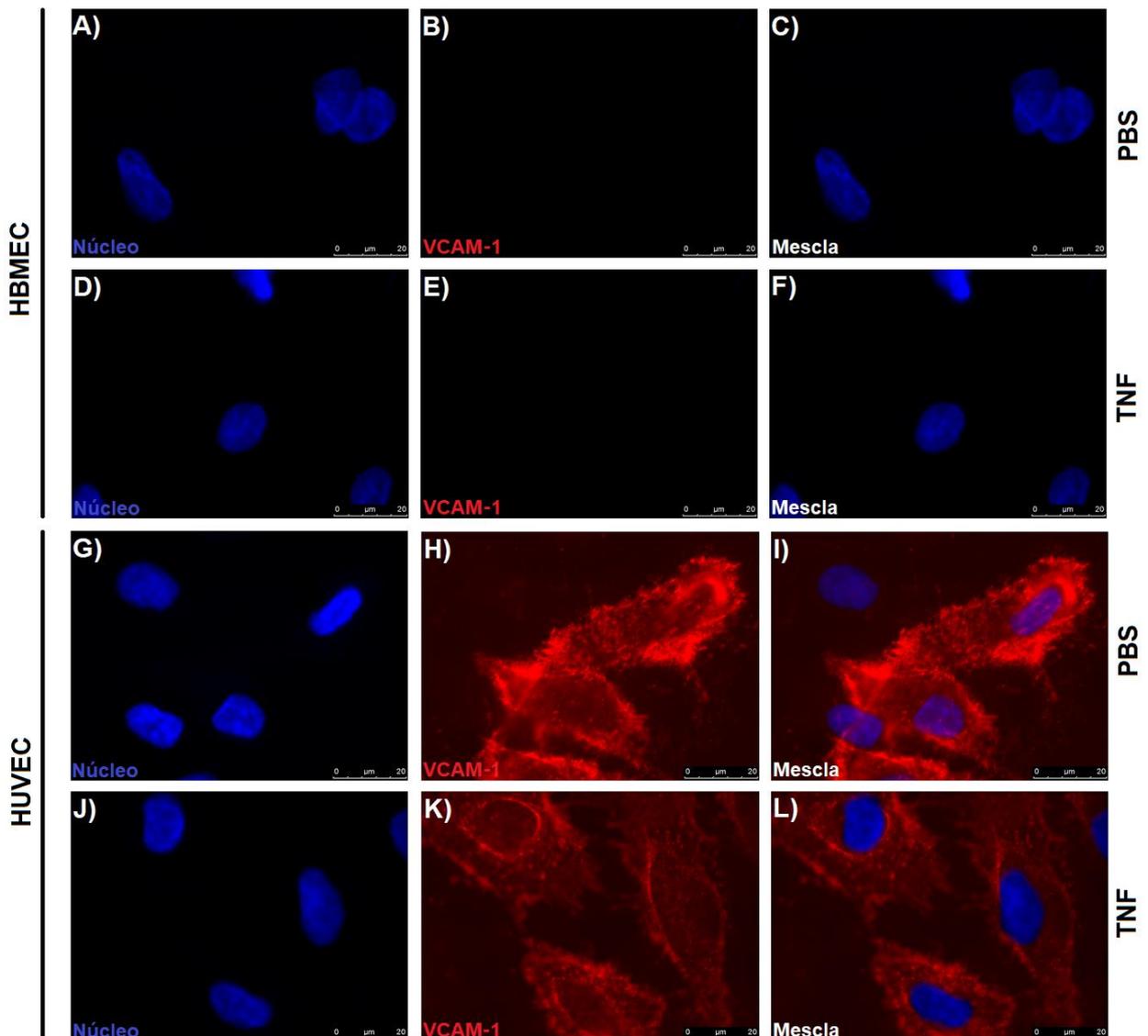
Ao analisar células HBMEC não foi observada a expressão de VCAM-1 em células estimuladas ou não com TNF (Figura 4.9 A-F). Por outro lado, células HUVEC expressavam essa proteína de forma similar à expressão de ICAM-1. Uma pequena parcela da população de HUVEC expressava ICAM-1 mesmo quando não estimulada (Figura 4.9 G-I). Quando estimuladas, todas as células avaliadas expressavam VCAM-1 de forma mais ou menos intensa (Figura 4.9 J-L).

Figura 4.8 – Células endoteliais estimuladas com PBS ou TNF expressam ICAM-1 em sua superfície.



Notas: células de linhagem HBMEC e HUVEC foram cultivadas em placas de 24 poços por 24 horas. Sequencialmente, foram incubadas com TNF (10 ng/ml) ou PBS por 24 horas. Após isso, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% e marcadas com DAPI (A, D, G e J), anticorpo primário anti-ICAM-1 e secundário anti-IgG de camundongo conjugado a *Alexa FLuor*® 488 (B, E, H e K). As imagens foram obtidas a partir de objetiva de 100x e de ao menos três réplicas biológicas. Fonte: do autor, 2020.

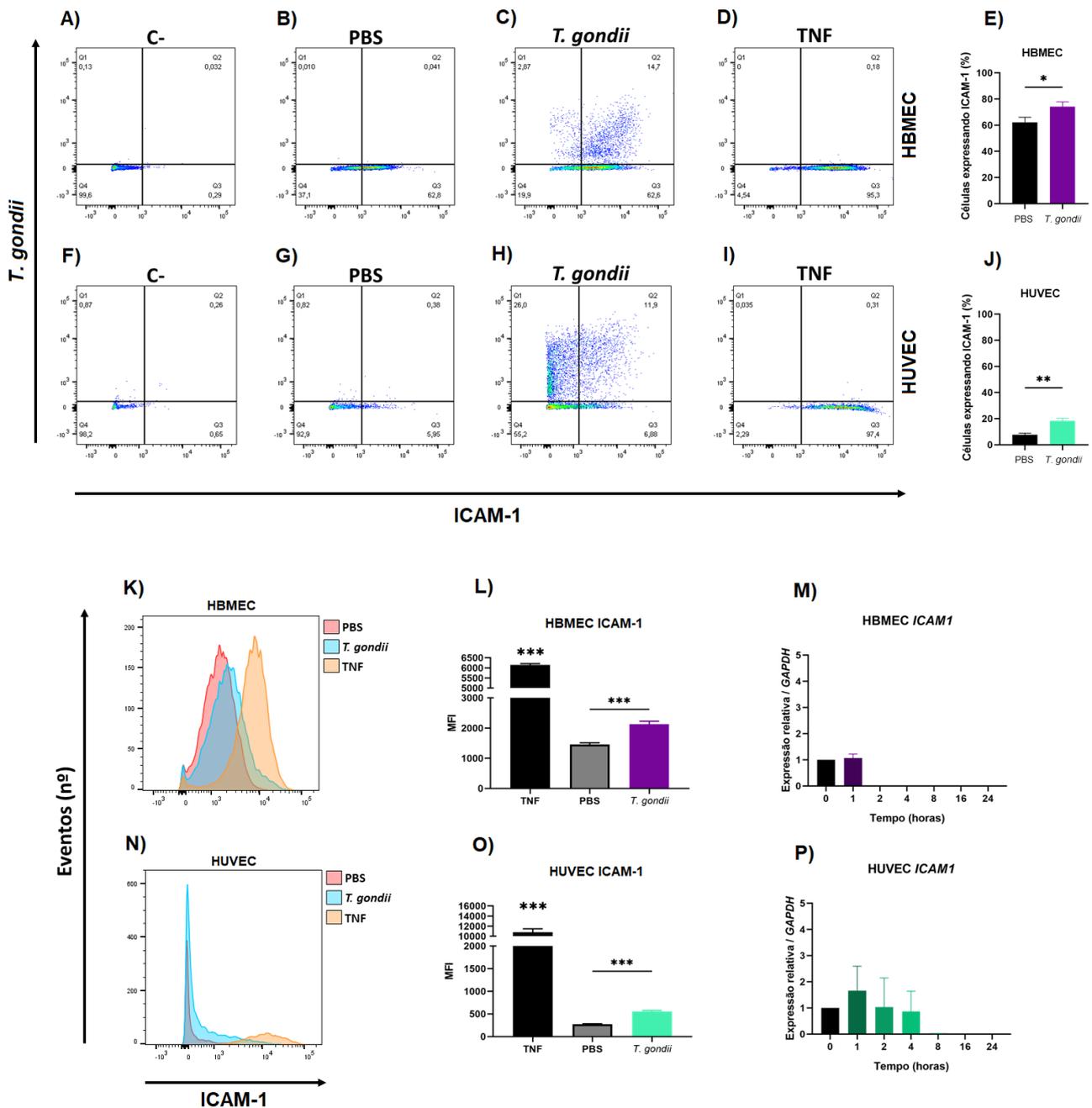
Figura 4.9 – Células HBMEC incubadas com PBS ou TNF não expressam VCAM-1 em sua superfície enquanto células HUVEC expressam a proteína.



Notas: células de linhagem HBMEC e HUVEC foram cultivadas em placas de 24 poços por 24 horas. Sequencialmente, foram incubadas com TNF (10 ng/ml) ou PBS por 24 horas. Após isso, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% e marcadas com DAPI (A, D, G e J), anticorpo primário anti-VCAM-1 conjugado a alococianina (B, E, H e K). As imagens foram obtidas a partir de objetiva de 100x e de ao menos três réplicas biológicas. Fonte: do autor, 2020.

Na sequência, a expressão de ICAM-1 e VCAM-1 foi avaliada por citometria de fluxo em células HBMEC e HUVEC quando infectadas com *T. gondii*. Tanto células HBMEC como HUVEC não estimuladas apresentaram expressão constitutiva de ICAM-1. A maioria das células HBMEC analisadas (62,23%) expressavam ICAM-1, enquanto que em HUVEC apenas 7,67% da população expressava essa proteína (Figura 4.10 B e G). Uma vez que essas células eram infectadas com *T. gondii*, tanto células HBMEC (Teste t, $p = 0,0173$) como HUVEC (Teste t, $p = 0,0011$) aumentavam a expressão de ICAM-1 (Figura 4.10 E e J).

Figura 4.10 – Na infecção por *T. gondii*, há um aumento da expressão de ICAM-1 na superfície de células HBMEC e HUVEC independente da proporção de RNAm.



Notas: células de linhagem HBMEC e HUVEC foram cultivadas em garrafas de cultivo por 24 horas. Sequencialmente, foram incubadas com TNF (10 ng/ml), PBS ou taquizoítas *GFP* em uma *MOI*-5 por 24 horas. Após isso, as células foram incubadas com anticorpo primário anti ICAM-1, secundário anti IgG de camundongo e conjugado a *ALEXA FLUOR*® 633 e avaliadas em citômetro de fluxo (A-D, F-I). Dados de células incubadas com PBS e *T. gondii* foram expressos em gráfico de barras (E e J). Intensidade Média de Fluorescência (MFI) foi baseada na média geométrica da intensidade de *ALEXA FLUOR*® 633 quantificada por histograma (K e N) em demonstrada em gráfico de barras (L e O). Concomitantemente, foi extraído o RNA de células HBMEC e HUVEC infectadas com taquizoítas em uma *MOI*-5 1, 2, 4, 8, 16 e 24 horas pós infecção. Após a transcrição do RNA para cDNA, foram utilizados oligonucleotídeos específicos para *ICAM1* e amostras analisadas por qPCR (M e P). Tratamento dos dados de qPCR realizado pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ com o gene constitutivo *GAPDH* como normalizador. Dados obtidos a partir de três réplicas biológicas e técnicas expressos como a média \pm desvio padrão. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ (Teste t e ANOVA/Tukey). Fonte: do autor, 2020.

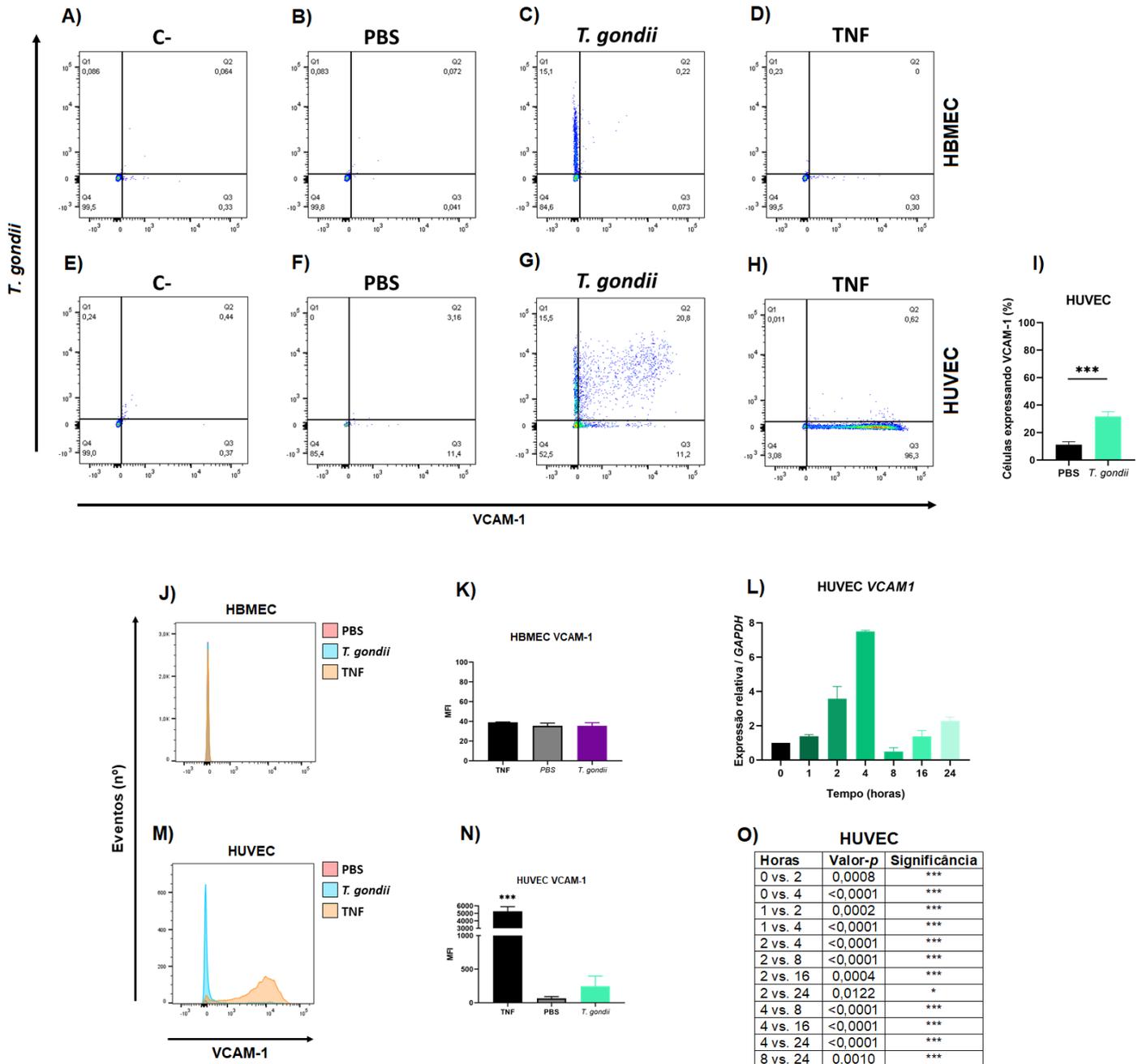
Ao avaliar a intensidade média de fluorescência (MFI) foi possível identificar um maior número de células expressando ICAM-1 e em maiores quantidades (Figura 4.10 K e N). O aumento na expressão de ICAM-1 foi detectado tanto em HBMEC quanto HUVEC (ANOVA/Tukey, $p < 0,001$) (Figura 4.10 L e O). Buscando avaliar uma correlação entre proporção de RNAm e proteína, a transcrição de ICAM-1 foi avaliada por qPCR referente às horas 8, 16 e 24 pós infecção. Todavia, além de não evidenciar um aumento transcricional, não foram observados níveis detectáveis de RNAm de ICAM-1 a partir da hora 2 pós infecção em células HBMEC e hora 8 pós infecção em células HUVEC (Figura 4.10 M e P).

Não foi observada a expressão de VCAM-1 em células HBMEC infectadas, não infectadas ou estimuladas com TNF por 24 horas (Figura 4.11 A-D). Por outro lado, um pequeno número de células HUVEC expressavam VCAM-1 mesmo na ausência de estímulo (média entre as réplicas biológicas: 5,58%) (Figura 4.11 F). Uma vez infectadas, cerca de 32,83% das células passavam a expressar a proteína (Figura 4.11 G). Ao realizar a análise matemática, foi observado um aumento estatisticamente significativo na expressão de VCAM-1 após a infecção (Teste t, $p = 0,0010$) (Figura 4.11 I).

Ao avaliar a MFI (Figura 4.11 J e M), não foi observada qualquer alteração estatisticamente significativa ao comparar células HBMEC e HUVEC infectadas com aquelas estimuladas apenas com PBS (Teste t, $p = 0,8230$) (Figura 4.11 K e N). Ao analisar por qPCR o RNAm de VCAM-1, observamos que células HUVEC demonstravam aumento transcricional a partir da hora 2 pós infecção (Teste t, $p = 0,0008$) atingindo seu pico na hora 4 pós infecção, sendo essa expressão 7,5 vezes superior às células não infectadas (Teste t, $p < 0,000133$). A partir da hora 8 pós infecção, os níveis de transcrição já retomavam a níveis similares ao de células não infectadas (Figura 4.11 N e O). Assim como não foi observado VCAM-1 na superfície de células HBMEC, também não foi detectado o transcrito nessas células em todas as horas estudadas.

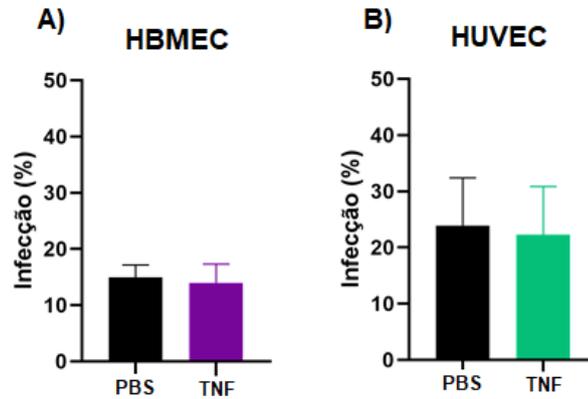
Uma vez observado o aumento de expressão de moléculas de adesão em células HBMEC (ICAM-1) e HUVEC (ICAM-1 e VCAM-1), foi avaliado se a presença dessas moléculas favoreceria o processo infeccioso. Para isso, ambas as células foram estimuladas com TNF. No entanto, não foi observada qualquer alteração estatisticamente significativa na taxa de infecção tanto de células HBMEC (Teste t, $p = 0,6961$) como HUVEC (Teste t, $p = 0,8261$) (Figura 4.12 A e B).

Figura 4.11 – Na infecção por *T. gondii*, há um aumento da expressão de VCAM-1 na superfície de células HUVEC enquanto células HBMEC não expressaram a molécula.



Notas: células de linhagem HBMEC e HUVEC foram cultivadas em garrafas de cultivo por 24 horas. Sequencialmente, foram incubadas com TNF (10 ng/ml), PBS ou taquizoítas *GFP* em uma *MOI-5* por 24 horas. Após isso, as células foram incubadas com anticorpo primário anti VCAM-1 conjugado a alofocianina e avaliadas por citômetro de fluxo (A-D, E-H). Dados de células incubadas com PBS e *T. gondii* foram expressos em um gráfico de barras (I). Intensidade Média de Fluorescência (MFI) foi baseada na média geométrica da intensidade de fluorescência de APC expressa em histograma (J e M) e em gráfico de barras (K e N). Concomitantemente, foi extraído o RNA de células HUVEC infectadas com taquizoítas em uma *MOI-5* 1, 2, 4, 8, 16 e 24 horas pós infecção. Após a transcrição do RNA para cDNA, foram utilizados oligonucleotídeos específicos para *VCAM1* e amostras analisadas por qPCR e expressas em gráfico de barras (L). As diferenças estatisticamente significativas da análise por qPCR foram categorizadas em um quadro (O). Tratamento dos dados de qPCR realizado pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ com o gene constitutivo *GAPDH* como normalizador. Dados obtidos a partir de três réplicas biológicas e técnicas expressos como a média \pm desvio padrão. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ (Teste t e ANOVA/Tukey). Fonte: do autor, 2020.

Figura 4.12 – A taxa de infecção de células endoteliais por *T. gondii* não se altera com o aumento da expressão de moléculas de adesão.

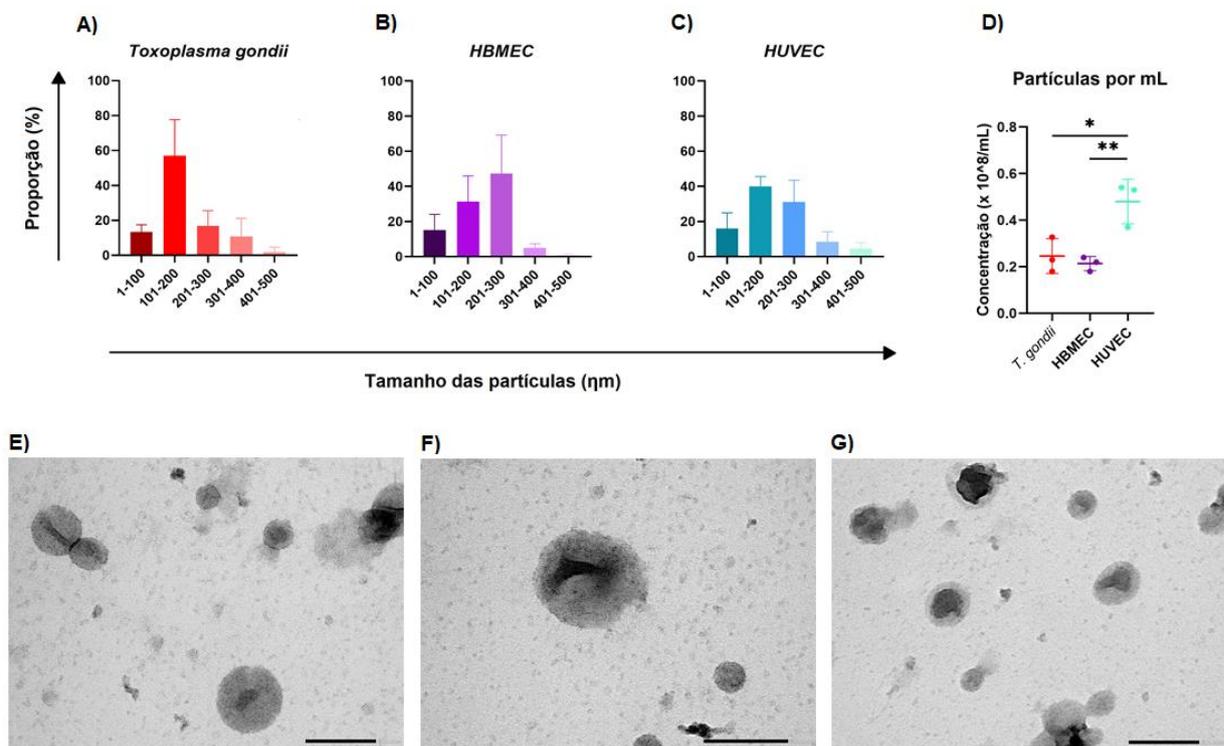


Notas: células de linhagem HBMEC e HUVEC foram cultivadas em placas de 24 poços de cultivo por 24 horas. Sequencialmente, foram incubadas com TNF (10 ng/ml) ou PBS por outras 24 horas e infectadas com taquizoítas GFP em uma MOI-5 por 1 hora. Após isso, elas foram fixadas com solução metanol/acetona 1:1 e marcadas com DAPI, Azul Evans, anticorpo primário anti SAG1 e secundário anti IgG de camundongo e conjugado a *Alexa FLuor*® 488. A contagem foi realizada em microscópio de fluorescência em objetiva de 40x a partir de três réplicas biológicas e apresentada em gráficos de barras (A e B). Dados expressos como a média \pm desvio padrão (Teste t). Fonte: do autor, 2020.

4.4 Caracterização das vesículas extracelulares de *T. gondii* e de células HBMEC e HUVEC

Ao analisar as VEs oriundas de taquizoítas através do sistema NTA, foi possível observar uma predominância de partículas com diâmetro entre 100 e 200 nm (Figura 4.13 A). Ambas as células endoteliais não infectadas apresentaram um perfil de VEs similar com uma predominância entre 100 e 300 nm de diâmetro (Figura 4.13 B e C). A quantia de VEs produzidas por $1,0 \times 10^8$ taquizoítas e células também foi avaliada. Foi observado que *T. gondii* produz cerca de $2,5 \times 10^7$ VEs/mL ao longo de duas horas. Células HBMEC secretavam em média $2,1 \times 10^7$ VEs/mL e células HUVEC produziam $4,8 \times 10^7$ VEs/mL, próximo ao dobro das VEs produzidas por células HBMEC (ANOVA/Tukey, $p = 0,0095$) ou taquizoítas (ANOVA/Tukey, $p = 0,0172$) (Figura 4.13 D).

Figura 4.13 – Vesículas extracelulares de *T. gondii* e de células endoteliais possuem tamanhos distintos.



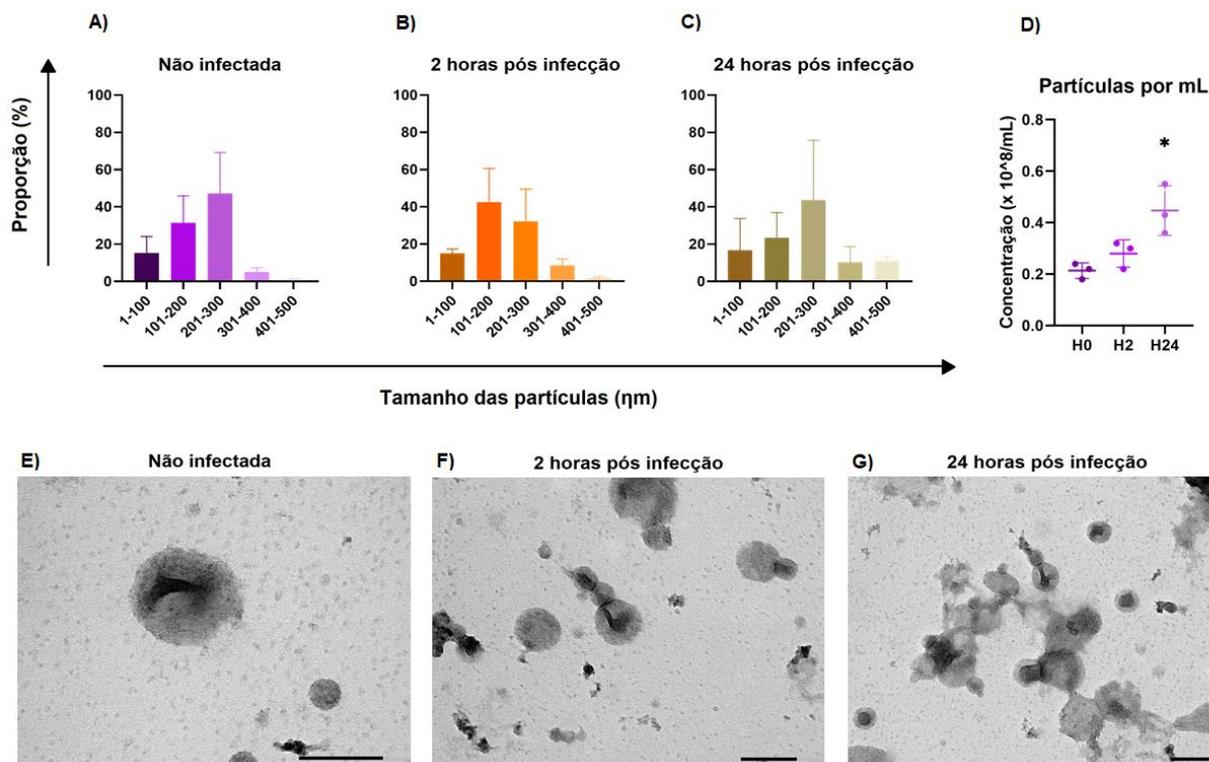
Notas: parasitos livres na população de $1,0 \times 10^8$ obtidos a partir do cultivo em células NHDF foram cultivados em 10 ml de DMEM com SFB depletado por 2 horas. Concomitantemente, células HBMEC e HUVEC foram cultivadas. Ao atingir confluência de 90%, as células foram cultivadas em DMEM com SFB depletado. Sequencialmente, o sobrenadante rico em vesículas extracelulares foi submetido à ultracentrifugação diferencial. As partículas obtidas foram ressuspensas em 500 μ l em PBS desprovido de Ca^{++} e analisadas pelo sistema NTA. Foram obtidos dados a respeito da distribuição das VEs de taquizoítas (A), HBMEC (B) e HUVEC (C) com base em seu diâmetro e, também, a concentração de partículas produzidas por essas células e taquizoítas por mL (D). Outra alíquota de VEs de *T. gondii* (E), células HBMEC (F) e HUVEC (G) foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão. Dados expressos como a média \pm desvio padrão da média. MOI: *multiplicity of infection*; Barras de escala no valor de 200 nm. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$. Fonte: do autor, 2020.

Para que uma partícula seja considerada VE nas análises de microscopia eletrônica de transmissão, três características são importantes: morfologia esférica com aspecto caliceforme, presença de estrutura envoltória indicativa de ser dupla membrana e diâmetro em acordo com o postulado para VEs (Théry *et al.*, 2018). Tanto VEs oriundas de *T. gondii* como de HBMEC e HUVEC observadas por microscopia eletrônica encontraram-se dentro dos parâmetros estabelecidos e com um tamanho aproximado de 100 nm (Figura 4.13 E-G).

Como foi observado anteriormente (Figura 4.13 B), células HBMEC não infectadas produzem VEs com predomínio de tamanho entre 100 e 300 nm (Figura 4.14 A). Duas horas pós infecção por *T. gondii*, o predomínio continuava a se concentrar entre 100 e 300 nm, todavia foi observado um discreto aumento na concentração de VEs com tamanho entre 100 e 200 nm (Figura 4.14 B). Diferente de

hora 2 pós infecção, o acumulado de VEs produzidas por células HBMEC ao longo de 24 horas se concentrou entre 200 e 300 nm (Figura 4.14 C).

Figura 4.14 – Células HBMEC infectadas por *T. gondii* produzem mais vesículas extracelulares e com tamanho diferenciado ao longo da infecção.



Notas: células endoteliais de linhagem HBMEC foram cultivadas em meio DMEM suplementado a 37°C e 5% de CO₂ atmosférico. Ao atingir confluência de 90%, as células eram infectadas com *Toxoplasma gondii* em uma MOI-5, o meio de cultivo foi trocado para DMEM com SFB depletado e as células foram incubadas novamente. Após 2 e 24 horas de incubação, o sobrenadante rico em vesículas extracelulares foi submetido à ultracentrifugação diferencial. As partículas obtidas foram ressuspensas em 500 µl em PBS desprovido de Ca⁺⁺ e analisadas pelo sistema NTA. Foram obtidos dados a respeito da distribuição por diâmetro das VEs de células não infectadas (A), 2 horas pós infecção (B) e 24 horas pós infecção (C) e, também, por concentração de partículas das células por mL (D). Outra alíquota de VEs de células não infectadas (E), 2 horas pós infecção (F) e 24 horas pós infecção (G) foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão. Dados expressos como a média ± desvio padrão da média. H: hora; MOI: *multiplicity of infection*; barras de escala no valor de 200 nm. Fonte: do autor, 2020.

Ao avaliar a quantia de VEs produzidas pelas células HBMEC nas diferentes condições, foi observado que 24 horas pós infecção a célula produziu aproximadamente o dobro de VEs ($4,5 \times 10^7$ VEs/mL) quando comparado a 2 horas pós infecção ($2,8 \times 10^7$ VEs/mL) (ANOVA/Tukey, $p=0,0478$) ou comparado as células não infectadas ($2,1 \times 10^7$ VEs/mL) (ANOVA/Tukey, $p=0,0115$) (Figura 4.14 D). A avaliação por microscopia eletrônica de transmissão das VEs de células HBMEC infectadas indicou a presença de um maior número de VEs com uma maior variedade de tamanhos nas horas 2 e 24 pós infecção (Figura 4.14 F e G). Também foi observado um número maior de VEs com um aspecto irregular na hora 24 pós

infecção (Figura 4.14 G). Para fins didáticos, os gráficos 4.13 B e 4.14 A são o mesmo. Igualmente ocorre com as imagens de microscopia 4.13 F e 4.14 E.

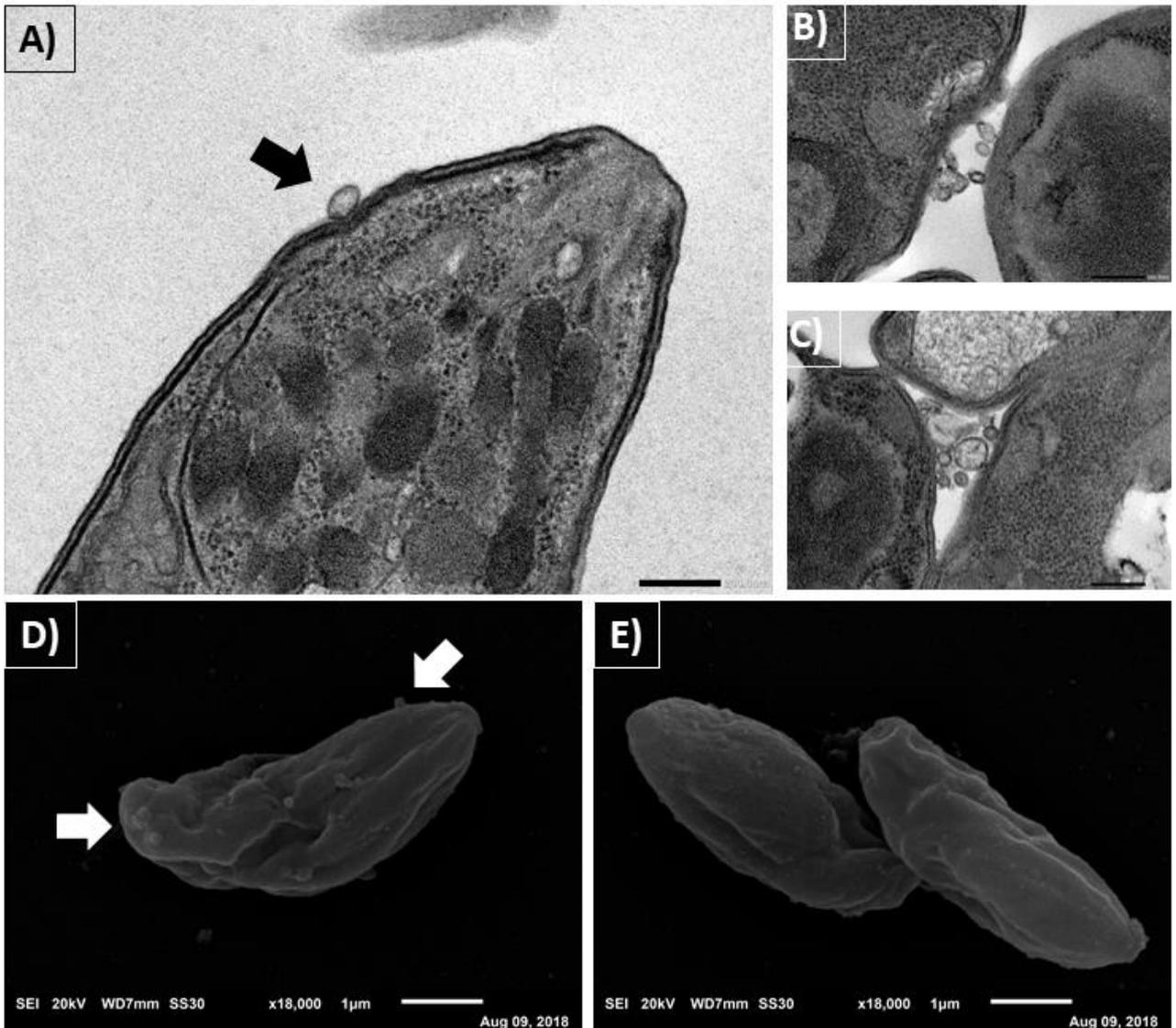
Detendo o conhecimento de que o preparo das VEs para análise por microscopia eletrônica de transmissão promove a alteração da morfologia das mesmas, realizamos a análise de VEs através do processamento comumente utilizado na análise de células. Observamos que a metodologia de emblocamento e fixação com aldeído glutárico 3,0% favorecem a preservação da arquitetura e morfologia das VEs de taquizoítas. Foi possível identificar não apenas a presença de uma estrutura envoltória indicativa de ser a dupla membrana, como também foi possível evidenciar acúmulo de VEs no espaço extracelular entre taquizoítas (Figura 4.15 B e C). Através da microscopia eletrônica de varredura também foi evidenciada a presença das VEs com diferentes diâmetros ao longo da membrana de taquizoítas livres (Figura 4.15 D e E).

4.5 Vesículas extracelulares de células HBMEC infectadas podem dificultar a invasão parasitária enquanto que vesículas extracelulares de *T. gondii* favorecem o processo infeccioso

Uma vez tendo isolado e caracterizado adequadamente as VEs de taquizoítas e de células endoteliais, foi realizado um ensaio de invasão associado ao pretratamento tanto de células endoteliais com VEs de *T. gondii* (TGVEs) e VEs de células HBMEC e HUVEC infectadas (HBTGVEs e HUTGVEs, respectivamente) ou não infectadas (HBVE e HUVE respectivamente). Foi observado que células HBMEC quando na presença de TGVEs apresentavam um aumento na taxa de infecção de 14,95% para 22,22% (ANOVA/Tukey, $p = 0,0250$). Por outro lado, quando essas células foram estimuladas com HBTGVEs observou-se uma redução considerável da taxa de infecção de 14,95% para 5,36% (ANOVA/Tukey, $p = 0,0004$) (Figura 4.16 A).

Ao realizar o mesmo ensaio com células HUVEC estimuladas com TGVEs, não foi observada alteração no processo infeccioso (ANOVA/Tukey, $p > 0,05$) (Figura 4.16 B).

Figura 4.15 – *Toxoplasma gondii* produz vesículas extracelulares com diferentes tamanhos.

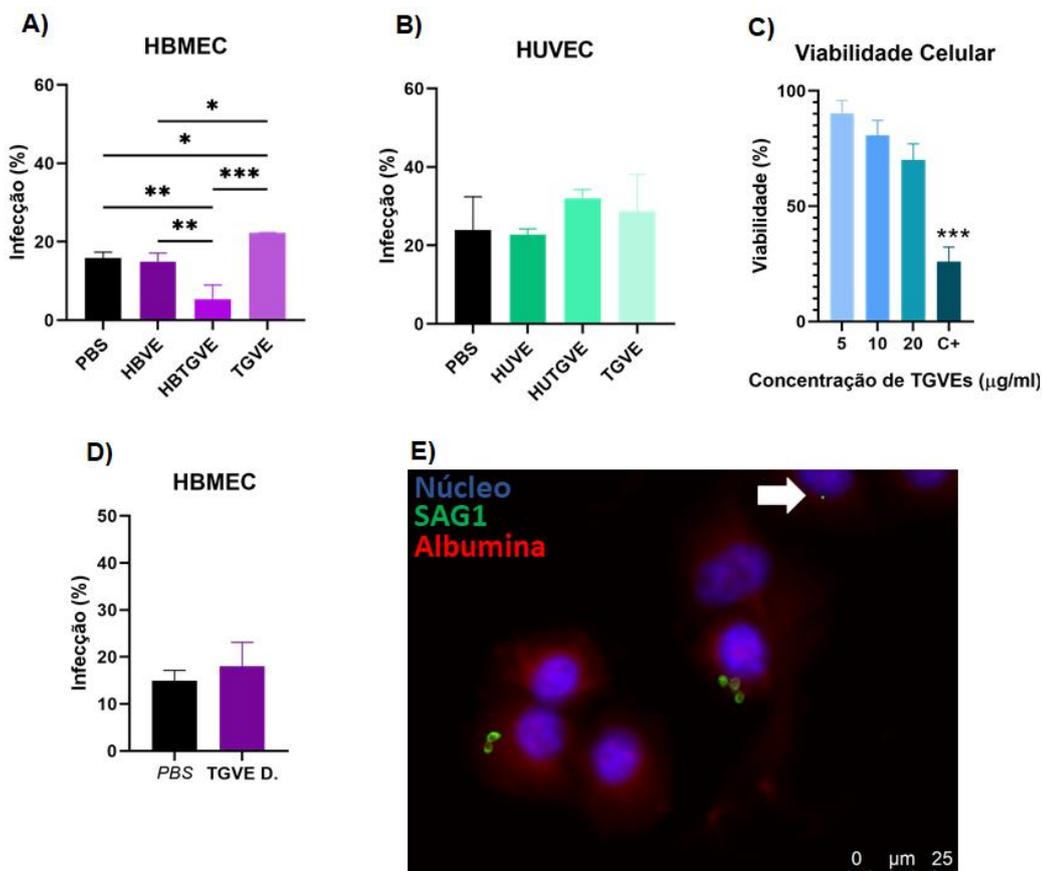


Notas: parasitos livres na população de $1,0 \times 10^8$ obtidos a partir do cultivo em células NHDF foram centrifugados a $900 \times g$, lavados três vezes com PBS. A fixação foi realizada com aldeído glutárico (3%) e a contrastação negativa com acetato de uranila e de chumbo. Sequencialmente os taquizoítas foram observados em microscópio eletrônico de transmissão (A-C) e varredura (D e E). Setas apontam para vesículas extracelulares junto à membrana de taquizoítas. Barras da escala no tamanho de 200 nm (A-C) e $1 \text{ }\mu\text{m}$ (D e E). Fonte: do autor, 2020.

Buscando compreender o efeito das TGVE no processo infeccioso, cogitamos a possibilidade de utilizar uma concentração maior de VEs. Todavia, antes de realizar um novo ensaio de invasão foi necessário conhecer o efeito citotóxico de grandes concentrações de TGVEs. Baseando-se em trabalhos utilizando macrófagos, cogitamos testar concentrações de VEs em três diferentes concentrações muito superiores àquelas utilizadas anteriormente por nossa equipe. São elas: 5, 10 e $20 \text{ }\mu\text{g/mL}$ (Li, Yawen, Xiu, *et al.*, 2018). Através de um ensaio de MTT foi observado que mesmo grandes concentrações de TGVEs (até $20 \text{ }\mu\text{g/mL}$) não representam letalidade às células HBMEC (Figura 4.16 C). Uma vez

conhecendo uma concentração de TGVEs que não induzisse a morte celular, um novo ensaio de invasão com uma concentração desafiadora de TGVEs (TGVEs D.) foi realizado. Foi observado que ao estimular células HBMEC com TGVEs D. o efeito potencializador de infecção evidenciado pela utilização de concentrações menores de TGVEs deixa de ocorrer (Figura 4.16 E). Em adição, foi observada uma série de

Figura 4.16 – VEs oriundas de células infectadas promovem uma redução da infecção de células HBMEC por *T. gondii* enquanto VEs parasitárias em baixas concentrações favorecem a infecção.

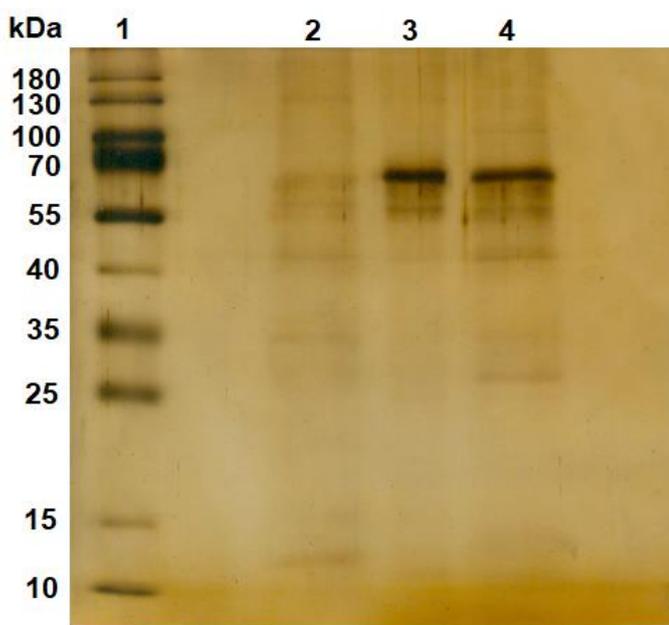


Notas: células HBMEC e HUVEC foram cultivadas em placas de 24 poços por 24 horas. Após esse tempo, elas foram incubadas por 24 horas com 7,4 ng de TGVE, HBVE, HBTGVE, HUVE e HUTGVE extraídas por ultracentrifugação. Posteriormente, as células foram infectadas com taquizoítas em uma MOI-5 por 1 hora, fixadas e marcadas com DAPI, Azul Evans, anticorpo primário anti SAG1 e secundário anti IgG de camundongo e conjugado a *Alexa FLuor*® 488. A contagem foi realizada em microscópio de fluorescência (A) em objetiva de 40x a partir de três réplicas biológicas (A e B). Concomitantemente, células HBMEC foram incubadas com 5 µg, 10 µg e 20 µg de de TGVE e avaliadas por reação de MTT (C). Após isso, foi realizado um novo ensaio de infecção com incubação das células com 20 µg de TGVE e contagem por microscopia de fluorescência (D e E). Seta branca: indicativo de partícula parasitária. Dados obtidos a partir de três réplicas biológicas e técnicas expressos como a média ± desvio padrão. D: desafio; F.: fisiológico; HBTGVE: vesícula extracelular de célula HBMEC infectada; HBVE: vesícula extracelular de célula HBMEC; HUTGVE vesícula extracelular de célula HUVEC infectada; HUVE: vesícula extracelular de célula HUVEC; MOI: multiplicidade de infecção; TGVE: vesícula extracelular de *T. gondii*; *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001 (Teste t e ANOVA/Tukey). Fonte: do autor, 2020.

pequenas partículas marcadas com anticorpos únicos para *T. gondii* (anti SAG1) adjacentes ao núcleo das células, os quais foram sugestivos de serem TGVEs incorporadas (Figura 4.16 seta em E).

Uma vez observado o potencial de VEs tanto de células como de parasitos em alterar o processo infeccioso, conteúdo proteico dessas partículas foi avaliado. Para tal, foram avaliadas VEs de taquizoítas livres, células endoteliais não infectadas e infectadas. A primeira análise do conteúdo proteico foi realizada através da resolução das VEs em gel de poliacrilamida. Ao corar o gel com nitrato de prata, foi possível observar diferentes padrões de bandas proteicas relativas às TGVEs, HBVEs e HBTGVEs (Figura 4.17 2, 3 e 4 respectivamente). O resultado obtido a partir dessa análise sugeriu haver alterações no conteúdo proteico de VEs de células endoteliais após serem infectadas. Para elucidar essa hipótese a análise proteômica foi realizada.

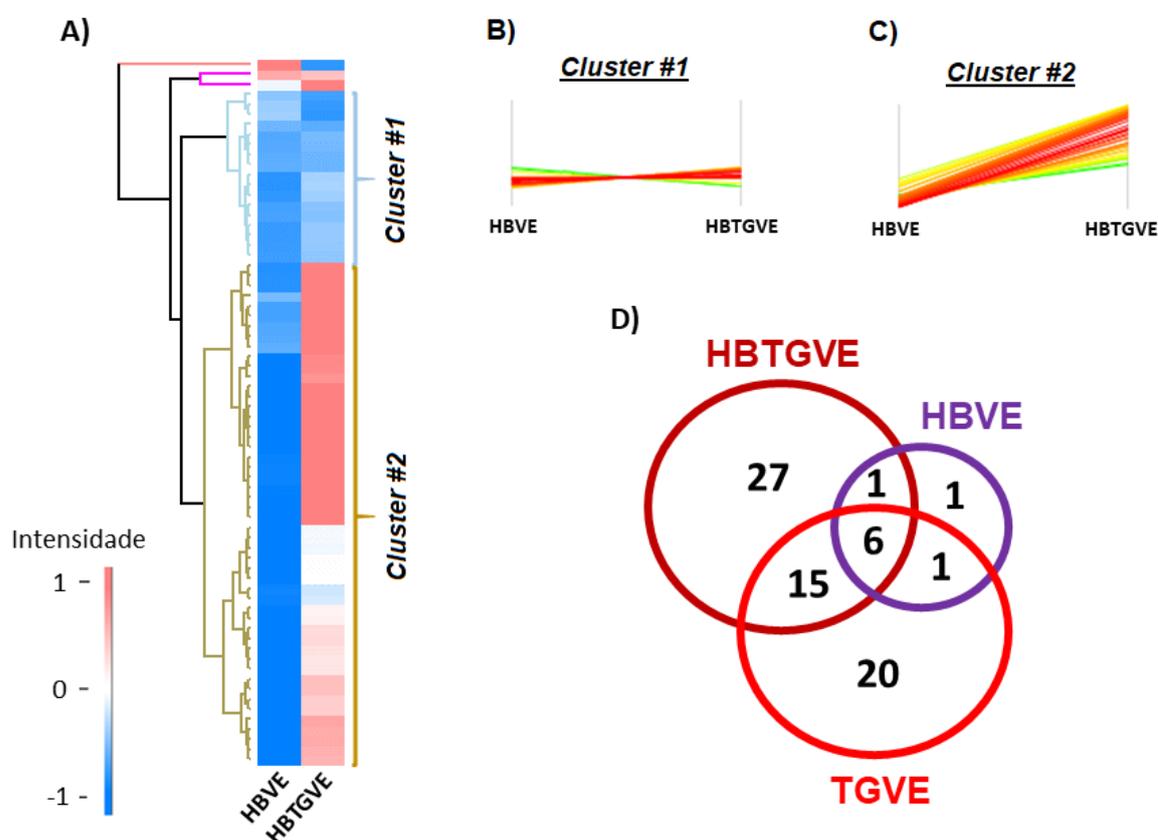
Figura 4.17 – Perfil proteico de VEs de células é diferente após a infecção por *T. gondii*.



Notas: VEs obtidas a partir de $1,0 \times 10^8$ taquizoítas e células HBMEC por ultracentrifugação foram ressuspensas em 20 μ l de tampão de lise e resolvidas em gel de poliacrilamida 12% em eletroforese sob baixa voltagem (10 V/cm). Sequencialmente o gel foi corado com nitrato de prata. Nota-se a presença do marcador de peso molecular (1), de TGVEs (2), HBVE (3) e HBTGVE (4). kDa: kiloDaltons; HBVE: vesícula extracelular de célula HBMEC; HBTGVE: vesícula extracelular de célula HBMEC infectada com *T. gondii*; VE: vesícula extracelular. Fonte: do autor, 2020.

A análise proteômica foi realizada por espectrometria de massas *em tandem* (MS/MS) e os dados obtidos corroboraram com a hipótese demonstrando uma alteração no conteúdo proteico de VEs de células HBMEC após a infecção. Ao categorizar as frações proteicas fornecidas pela MS/MS em um mapa de calor (*heatmap*), as variações podem ser divididas em dois principais *clusters* (Figura 4.18 A). O primeiro apresenta a manutenção de uma baixa expressão proteica mesmo após a infecção (Figura 4.18 B) enquanto o segundo apresenta o aumento da expressão proteica após a infecção (Figura 4.18 C). A partir do Diagrama de Venn dos dados proteômicos de TGVEs, HBVEs e HBTGVEs, foram observadas 15 proteínas em

Figura 4.18 – Perfil proteômico de VEs de células HBMEC é alterado após a infecção das células por *T. gondii*.



Notas: vesículas extracelulares obtidas por ultracentrifugação a partir de $1,0 \times 10^8$ taquizoítas de *T. gondii* ou células HBMEC infectadas ou não foram ressuspensas em 50 μ l de tampão de lise, resolvidas em gel de poliacrilamida 12%. Posteriormente a proteínas contidas no gel foram reduzidas por DTT 10 mM, alquiladas iodoacetamina 55 mM, digeridas com solução ABC 10 mM e clivadas com tripsina 12,5 mM. Em seguida, os peptídeos foram purificados com metanol (grau LC-MS) e eluídos com ácido fórmico 0,1% para serem analisados no sistema LC-MS/MS. Proteomas de referência para *Homo sapiens* e *T. gondii* foram adquiridos a partir do banco de dados UniProt enquanto os dados foram analisados pelo software Perseus 1.6.10.43. Clusters desenvolvidos a partir de distância euclidiana após normalização (A) e comparação da alteração de expressão para os dois principais clusters identificados (B e C). Diagrama de Venn demonstra as proteínas comuns entre as VEs (D). ABC complexo avidina-biotina: HBTGVE: vesícula extracelular de célula HBMEC infectada; HBVE: vesícula extracelular de célula HBMEC; LC-MS: cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. Fonte: do autor, 2020.

comum entre TGVEs e HBTGVEs ao passo que foi observada apenas uma proteína compartilhada entre HBVEs e HBTGVEs (Figura 4.18 D).

Foram evidenciadas diferenças entre as proteínas identificadas como únicas nas VEs. TGVEs contém uma série de proteínas únicas como Anexina A6 (ID.: P08133), HSP70 (ID. P48741) e GTPase Rho mitocondrial (ID. H3BST5). HBTGVE contém diferentes proteínas únicas como histonas, subunidade beta de hemoglobina (ID. F8W6P5) e proteína dedo de zinco (ID. Q9C0D4) (Apêndice B). Também foram identificadas nas HBTGVEs duas proteínas de *Toxoplasma gondii* as quais não foram identificadas em TGVEs: histona H4 (ID. B9PNK6) e queuina tRNA ribosiltransferase parasitárias (ID. V5BF03) (Apêndice C). A única proteína encontrada apenas em HBVEs foi um antimicrobiano, a dermicidina (ID. P81605). Cabe salientar que a análise foi realizada a partir de uma pequena quantidade de material. A análise das réplicas faltantes se encontra em desenvolvimento.

Tabela 4.1 – Células HBMEC infectadas por *T. gondii* produzem VEs com perfil proteômico relacionado com sistema imune.

Categoria funcional	Cluster #1	Cluster #2
Exocitose	7	-
Imunidade mediada por neutrófilos	7	14
Exocitose regulada	7	15
Ativação de neutrófilos	6	14
Imunidade mediada por leucócitos	7	16
Ativação de neutrófilos envolvidos com a resposta imune	6	14
Degranulação de neutrófilos	6	14
Ativação de granulócitos	6	14
Ativação de células mieloides envolvidas com a resposta imune	6	14
Imunidade mediada por leucócitos de origem mieloide	6	14
Degranulação de leucócitos	-	14

Notas: vesículas extracelulares obtidas por ultracentrifugação a partir de $1,0 \times 10^8$ células HBMEC infectadas por *T. gondii* foram analisadas por LC-MS/MS. Proteomas de referência para *Homo sapiens* foram adquiridos a partir do banco de dados UniProt enquanto os dados foram analisados pelo software *Perseus* 1.6.10.43. A análise de enriquecimento de ontologia genética dos *clusters* foi realizada pela plataforma *ShinyGo* onde as colunas representam o número de proteínas associadas à localização. HBTGVE: vesícula extracelular de célula HBMEC infectada; HBVE: vesícula extracelular de célula HBMEC; LC-MS: cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. Fonte: do autor, 2020.

Foi realizada a análise de enriquecimento da ontologia genética (GO) através da plataforma *ShinyGO* v0.61 (*Ge-Lab*, EUA) e foram avaliadas tanto a categoria funcional como localização das proteínas identificadas. Ambos os *clusters* #1 e #2 apresentaram proteínas relacionadas ao sistema imune. Todavia, o *cluster* #2 apresentou aproximadamente o dobro de proteínas envolvidas com o sistema imune

ao comparar com o *cluster* #1. Enquanto o *cluster* #1 não tinha qualquer proteína relacionada com degranulação de leucócitos, o *cluster* #2 não tinha qualquer proteína relacionada com exocitose (Tabela 4.1).

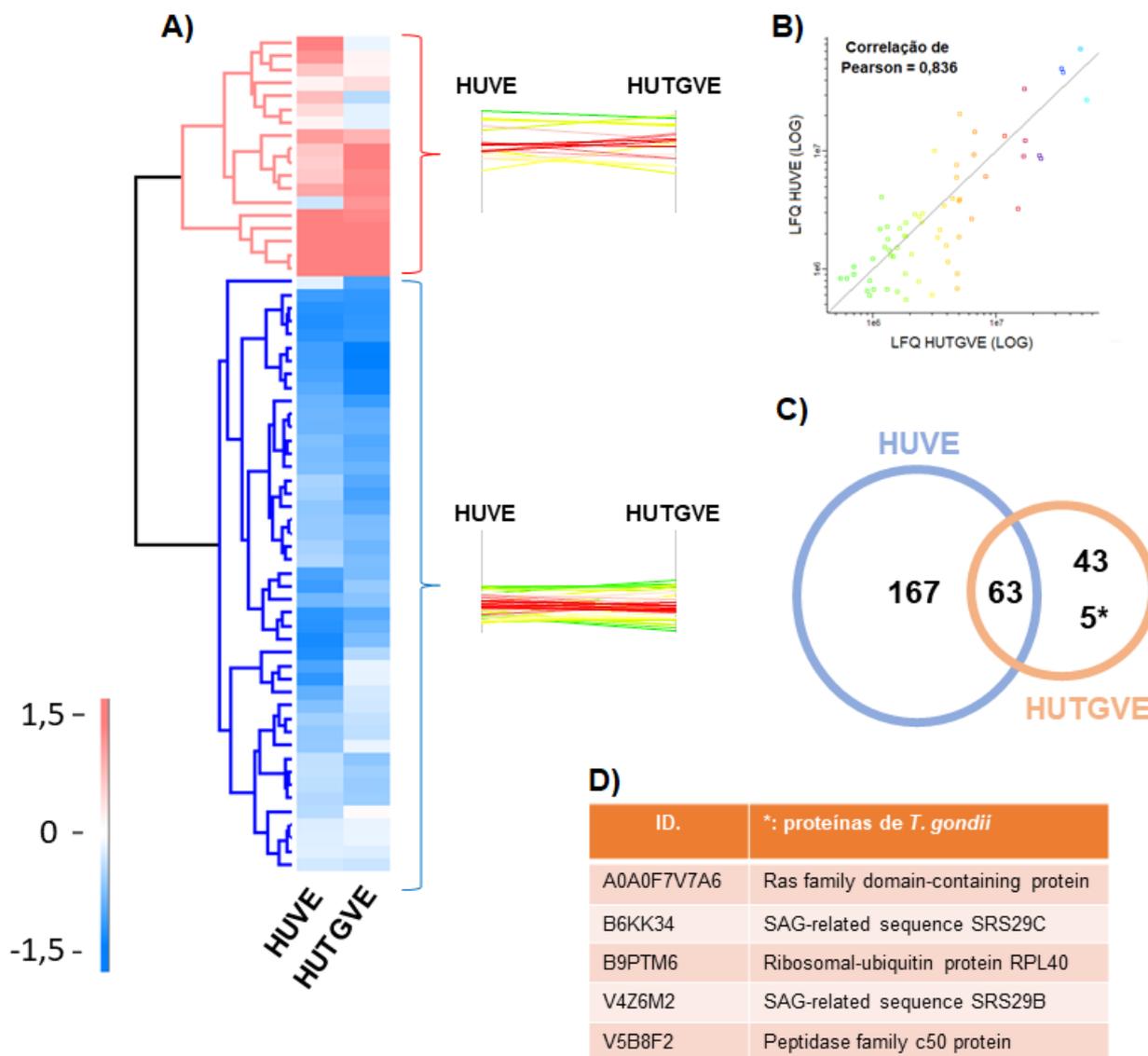
Ao avaliar a localização/região das proteínas, foi observado que os *clusters* apresentavam proteínas oriundas de diferentes compartimentos relacionados com vesículas. Assim como na categoria funcional, também foram observadas diferenças entre os dois *clusters*. O *cluster* #2 apresentou um maior número de proteínas do que o *cluster* #1 originárias de diferentes regiões. Todavia, o *cluster* #1 continha proteínas originárias de partes de vesículas citoplasmáticas, vesículas citoplasmáticas, grânulos de secreção e vesículas de secreção ao passo que no *cluster* #2 não são observadas proteínas oriundas dessas regiões. O *cluster* #1 não apresentou qualquer proteína com origem de vesículas ou de junções de ancoragem, aderente ou célula-substrato (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 – Células HBMEC infectadas por *T. gondii* produzem VEs com perfil proteômico diversificado com relação ao local de origem das proteínas.

Localização	Cluster #1	Cluster #2
Vesículas	-	34
Espaço extracelular	11	30
Parte da região extracelular	11	30
Região extracelular	11	32
Organelas extracelulares	10	27
Exossomas extracelulares	10	27
Vesículas extracelulares	10	27
Parte de vesículas citoplasmáticas	9	-
Vesículas citoplasmáticas	9	-
Grânulos de secreção	7	-
Vesículas de secreção	7	-
Junção de ancoragem	-	15
Junção aderente	-	14
Junção célula-substrato	-	13

Notas: vesículas extracelulares obtidas por ultracentrifugação a partir de $1,0 \times 10^8$ células HBMEC infectadas por *T. gondii* foram analisadas por LC-MS/MS. Proteomas de referência para *Homo sapiens* foram adquiridos a partir do banco de dados UniProt enquanto os dados foram analisados pelo software Perseus 1.6.10.43. A análise de enriquecimento de ontologia genética dos *clusters* foi realizada pela plataforma ShinyGo onde as colunas representam o número de proteínas associadas à localização. HBTGVE: vesícula extracelular de célula HBMEC infectada; HBVE: vesícula extracelular de célula HBMEC; LC-MS: cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. Fonte: do autor, 2020.

Figura 4.19 – Perfil proteômico de VEs de células HUVEC é alterado após a infecção das células por *T. gondii*.



Notas: vesículas extracelulares obtidas por ultracentrifugação a partir de $1,0 \times 10^9$ células HUVEC infectadas por *T. gondii* em uma MOI-5 ou não foram ressuspensas em 50 μ l de tampão de lise, resolvidas em gel de poliacrilamida 12%. Posteriormente a proteínas contidas no gel foram reduzidas por DTT 10 mM, alquiladas iodoacetamina 55 mM, digeridas com solução ABC 10 mM e clivadas com tripsina 12,5 mM. Em seguida, os peptídeos foram purificados com metanol (grau LC-MS) e eluídos com ácido fórmico 0,1% para serem analisados por LC-MS/MS. Proteomas de referência para *Homo sapiens* e *T. gondii* foram adquiridos a partir do banco de dados UniProt enquanto os dados foram analisados pelo software Perseus 1.6.10.43. Heatmap e clusters desenvolvidos a partir de distância euclidiana após normalização (A). Gráfico de dispersão correlacionando a concentração de proteínas entre HUVEs e HUTGVEs (B); Diagrama de Venn demonstra as proteínas comuns entre as VEs (D) enquanto * indica proteínas de *T. gondii* em HUTGVEs (D). ABC complexo avidina-biotina; HUTGVE: vesícula extracelular de célula HUVEC infectada; HUVE: vesícula extracelular de célula HUVEC; ID.: identificação; LC-MS: cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas; MOI: multiplicity of infection. Fonte: do autor, 2020.

Vesículas extracelulares de células HUVEC infectadas (HUTGVEs) e não infectadas (HUVEs) tiveram seu conteúdo proteico avaliado por espectrometria de massas *em tandem*. Foi identificado um total de 325 peptídeos. Após normalização

logarítmica e eliminação de contaminantes, foi construído um mapa de calor com 63 proteínas comuns entre HUVEs e HUTGVEs. A partir deste, foi possível identificar 2 principais *clusters* após a normalização. Enquanto um demonstra a manutenção da expressão de proteínas tanto em HUVEs como em HUTGVEs, o outro apresenta uma baixa expressão proteica em ambas HUVEs e HUTGVEs (Figura 4.19 A). Sequencialmente, foi possível desenvolver um gráfico de dispersão em coordenadas cartesianas atrelado a uma regressão linear onde foi possível observar uma correlação na expressão proteica em HUVEs e HUTGVEs (correlação de Pearson = 0,836) (Figura 4.19 B). Através do desenvolvimento de um diagrama de Venn foi possível observar a presença de 167 proteínas únicas em HUVEs (Figura 4.19 C). Das 48 proteínas únicas em HUTGVEs, 5 eram exclusivamente de *T. gondii* englobando proteínas de superfície (ID. B6KK34 e V4Z6M2, GTPases (ID. A0A0F7V7A6), proteínas ribossomais (ID. B9PTM6) e peptidases (ID. V5B8F2) (Figura 4.19 D).

Tabela 4.3 – Células HUVEC infectadas por *T. gondii* produzem VEs com perfil proteômico diversificado com relação ao local de origem das proteínas.

Localização	HUVE	HUTGVE
Região extracelular	136	-
Vesículas	131	-
Parte da região extracelular	130	28
Espaço extracelular	127	28
Vesículas extracelulares	119	25
Exossomas extracelulares	119	25
Organelas extracelulares	119	-
Junção de ancoragem	51	-
Adesão focal	46	-
Junção aderente célula/substrato	46	-
Ribossomo citosólico	-	11
Subunidade ribossomal	-	11
Subunidade grande de ribossomo citosólico	-	9
Parte citosólica	-	9

Notas: vesículas extracelulares obtidas por ultracentrifugação a partir de $1,0 \times 10^9$ células HUVEC infectadas por *T. gondii* foram analisadas por LC-MS/MS. Proteoma de referência para *Homo sapiens* foi adquirido a partir do banco de dados *UniProt* enquanto os dados foram analisados pelo software *Perseus* 1.6.10.43. A análise de enriquecimento de ontologia genética dos grupos foi realizada pela plataforma *ShinyGo* onde as colunas representam o número de proteínas associadas à localização. HUTGVE: vesícula extracelular de célula HUVEC infectada; HUVE: vesícula extracelular de célula HUVEC; LC-MS: cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. Fonte: do autor, 2020.

Ao realizar a análise do enriquecimento da ontologia genética das proteínas exclusivas em HUVEs e HUTGVEs, os dados foram organizados por localização e

categoria funcional. No âmbito da localização, foram observadas similaridades entre as proteínas de HUVes e HUTGVEs com proteínas localizadas em vesículas, exossomas ou região extracelulares. Enquanto foram evidenciadas proteínas únicas em HUVes relacionadas com junções de ancoragem, adesão focal e junção aderente, proteínas originárias de ribossomos foram observadas principalmente em HUTGVEs (Tabela 4.3).

Ao realizar a análise de enriquecimento por categoria funcional foi observada apenas uma única função em comum entre HUVes e HUTGVEs: o estabelecimento de localização de proteínas ao retículo endoplasmático. Foi observada uma grande diversidade funcional nas proteínas de HUVes como transporte mediado por vesículas, ativação celular, exocitose e endereçamento de proteínas. A partir do momento que células HUVEC eram infectadas por *T. gondii*, o conteúdo proteico das VEs sofria uma significativa alteração e foram identificadas proteínas com funções relacionadas a cotranslação, endereçamento e localização de proteínas. Também foram observadas proteínas relacionadas com processos catabólicos por mRNA (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 – Células HUVEC infectadas por *T. gondii* produzem VEs com perfil proteômico diversificado com relação à categoria funcional das proteínas.

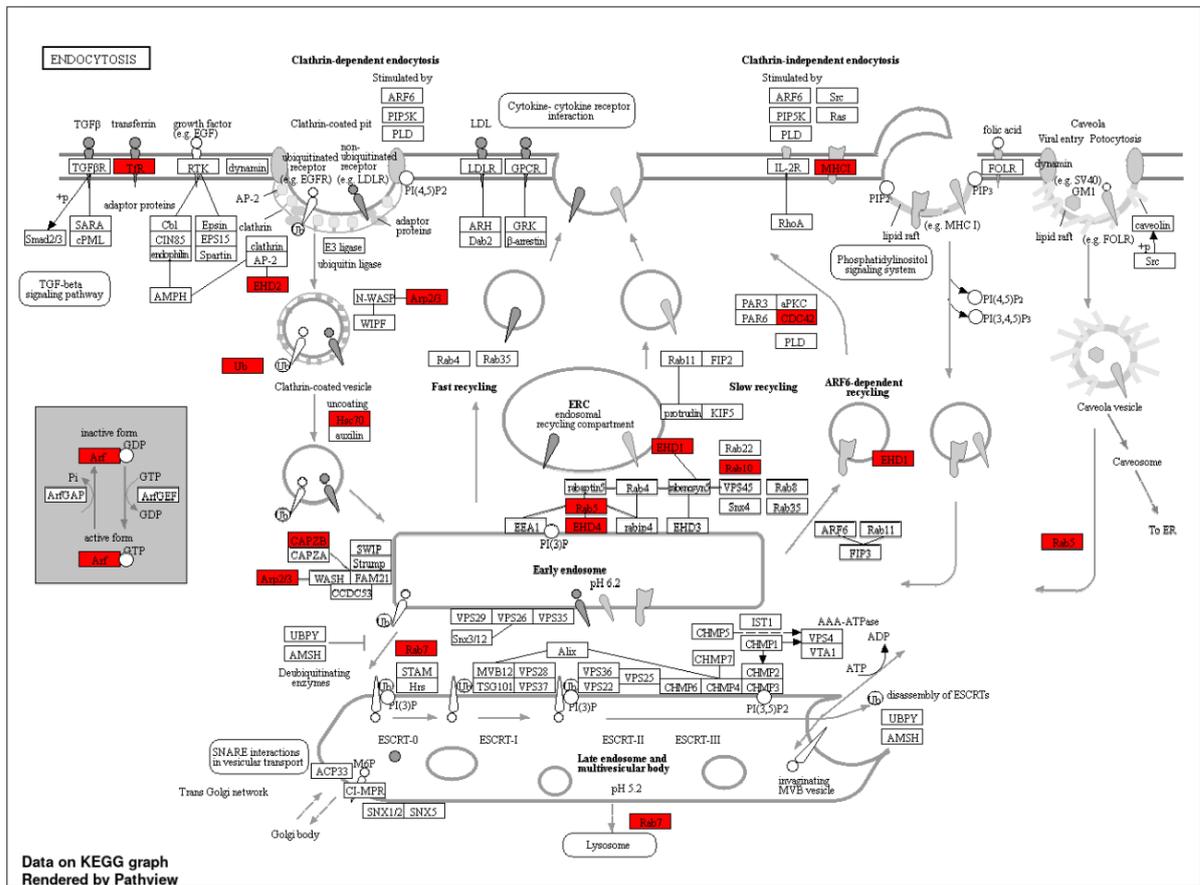
Categoria funcional	HUVE	HUTGVE
Transporte mediado por vesículas	65	-
Ativação celular	54	-
Interação interespécie entre organismos	48	-
Exocitose regulada	44	-
Exocitose	45	-
Simbiose	45	-
Processamento viral	43	-
Endereçamento de proteínas	31	-
Estabelecimento de localização de proteínas na membrana	29	-
Estabelecimento de localização de proteínas no retículo endoplasmático	20	11
Proteína de cotranslação dependente de SRP de endereçamento à membrana	-	11
Endereçamento de proteína ao retículo endoplasmático	-	12
Proteína cotranslacional de endereçamento à membrana	-	11
Processo catabólico por mRNA transcrito nuclearmente, mutação sem sentido	-	11
Estabelecimento de localização de proteína em organelas	-	16
Localização de proteína em organelas	-	18
Estabelecimento de localização de proteína na membrana	-	13
Transcrição viral	-	11

Notas: vesículas extracelulares obtidas por ultracentrifugação a partir de $1,0 \times 10^9$ células HUVEC infectadas por *T. gondii* foram analisadas por LC-MS/MS. Proteoma de referência para *Homo sapiens* foi adquirido a partir do banco de dados *UniProt* enquanto os dados foram analisados pelo *software Perseus* 1.6.10.43. A análise de enriquecimento de ontologia genética dos grupos foi realizada pela plataforma *ShinyGo* onde as colunas representam o número de proteínas associadas à localização. HUTGVE: vesícula extracelular de célula HUVEC infectada; HUVE: vesícula extracelular de célula HUVEC; LC-MS: cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. Fonte: do autor, 2020.

Buscando compreender a localização e função das proteínas encontradas nas VEs, realizamos a análise da rede de interações moleculares através da

Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (KEGG). Ao avaliar as proteínas exclusivas de HUVEs, foi observada uma série de proteínas relacionadas a processos de endocitose dependente (Transferrin receptor (P90, CD71), isoform CRA, ID. G3V0E5) ou independente de clatrina (HLA class I histocompatibility antigen, B-46 alpha chain (Fragment), ID. A0A140T9S9), formação de vesículas caveolares (Ras-related protein Rab-5C, ID. P51148) e, principalmente, com endossoma primário (EH domain-containing protein 4, ID. Q9H223; Ras-related protein Rab-7a (Fragment), ID. C9IZZ0; Ras-related protein Rab-10, ID. P61026; F-actin-capping protein subunit beta, ID. P47756; Actin-related protein 2/3 complex subunit 5, ID. O15511) (Figura 4.).

Figura 4.20 – Proteínas exclusivas de HUVE relacionam-se com processos de endocitose.

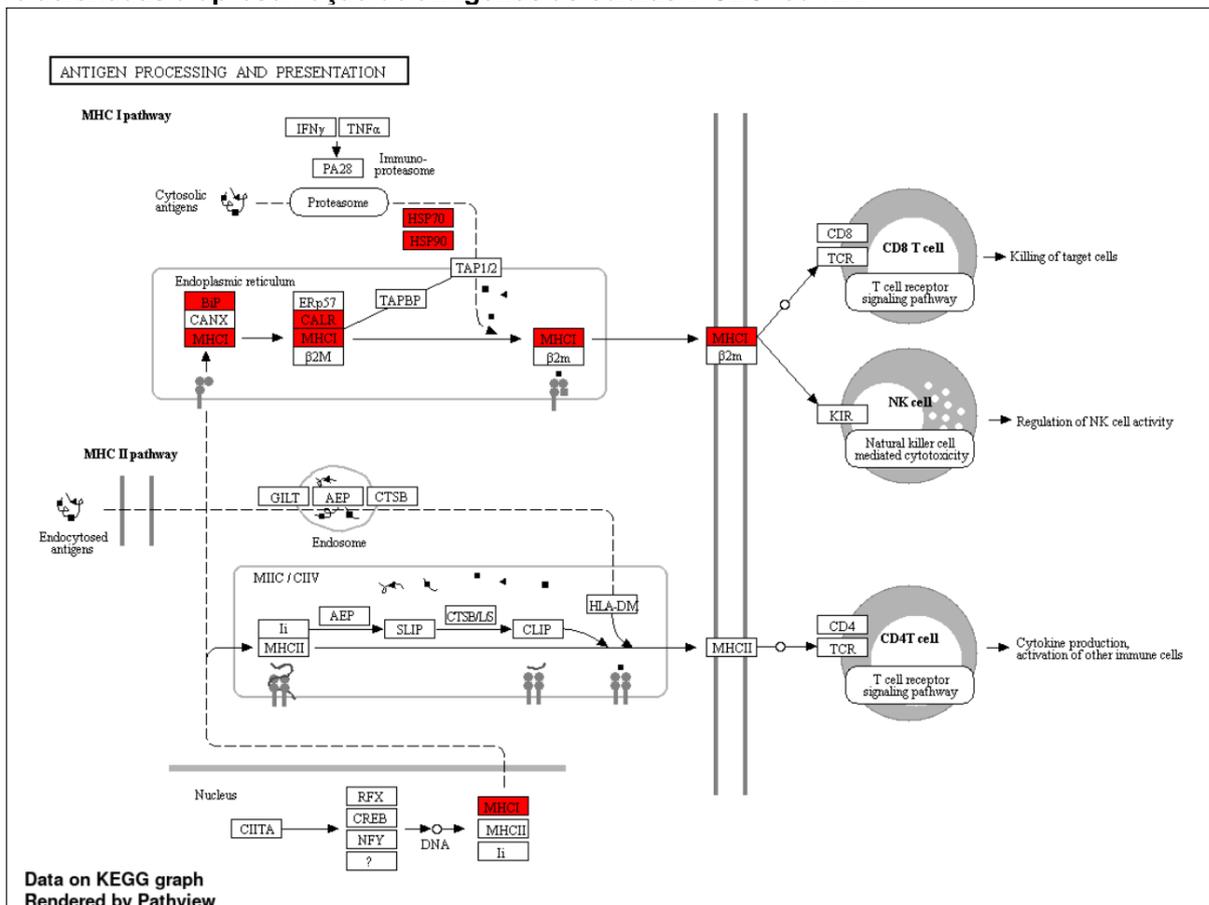


Notas: vesículas extracelulares obtidas por ultracentrifugação a partir de $1,0 \times 10^9$ células HUVEC foram analisadas por LC-MS/MS. Proteoma de referência para *Homo sapiens* foi adquirido a partir do banco de dados UniProt enquanto os dados foram analisados pelo software Perseus 1.6.10.43. A análise de enriquecimento de ontologia genética e da rede de interações moleculares foi realizada pelas plataformas ShinyGo e Pathview. HUVE: vesícula extracelular de célula HUVEC; LC-MS: cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. Fonte: do autor, 2020.

Ao avaliar proteínas de HUVEs relacionadas ao processamento e apresentação de antígenos, foram observadas diversas proteínas relacionadas com a apresentação de antígenos através de MHC-I a células T CD8+ e NK (HLA class I

histocompatibility antigen, A-3 alpha chain, ID. A0A140T975; Heat shock protein HSP 90-alpha, ID. P07900) mas não por MHC-II a células T CD4+ (Figura 4.20). Não foi observada através da rede de interações moleculares significativa abundância de proteínas de HUTGVEs em qualquer via específica. Sua maior concentração foi em subunidades ribossomais.

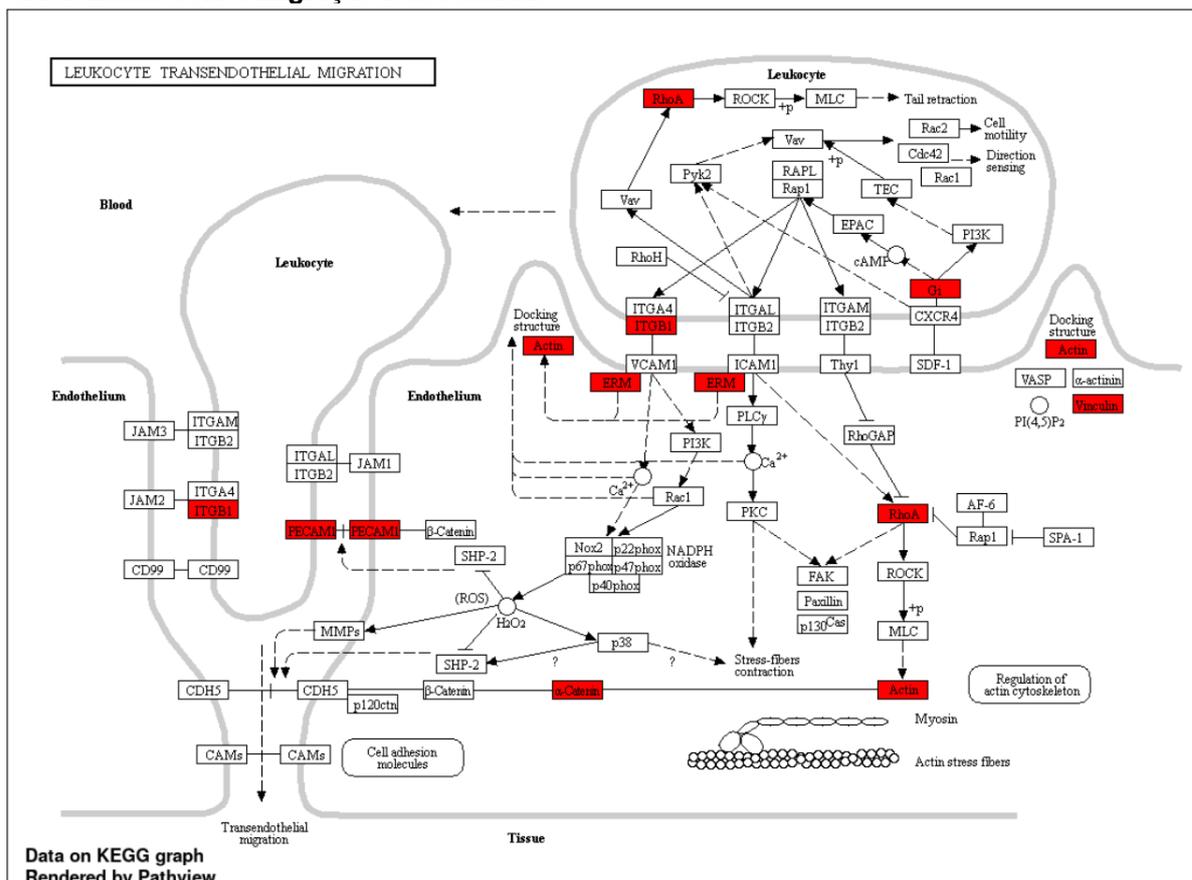
Figura 4.20 – Células HUVEC não infectadas por *T. gondii* produzem VEs com proteínas relacionadas à apresentação de antígenos às células T CD8+ ou NK.



Notas: vesículas extracelulares obtidas por ultracentrifugação a partir de $1,0 \times 10^9$ células HUVEC foram analisadas por LC-MS/MS. Proteoma de referência para *Homo sapiens* foi adquirido a partir do banco de dados UniProt enquanto os dados foram analisados pelo software Perseus 1.6.10.43. A análise de enriquecimento de ontologia genética e da rede de interações moleculares foi realizada pelas plataformas ShinyGo e Pathview. HUVE: vesícula extracelular de célula HUVEC; LC-MS: cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. Fonte: do autor, 2020.

Ao realizar uma análise de enriquecimento das 63 proteínas em comum entre HUVEs e HUTGVEs, foi observado que haviam proteínas intimamente relacionadas com a migração leucocitária. Foram evidenciadas proteínas envolvidas com a marginação/rolamento de leucócitos (Actin, cytoplasmic 2, ID. P63261; Integrin beta-1, ID. P05556) e com a diapedese dessas células (Platelet endothelial cell adhesion molecule, ID. P16284) (Figura 4.21). Algumas proteínas ribossomais também foram evidenciadas tanto em HUVE quanto em HUTGVE.

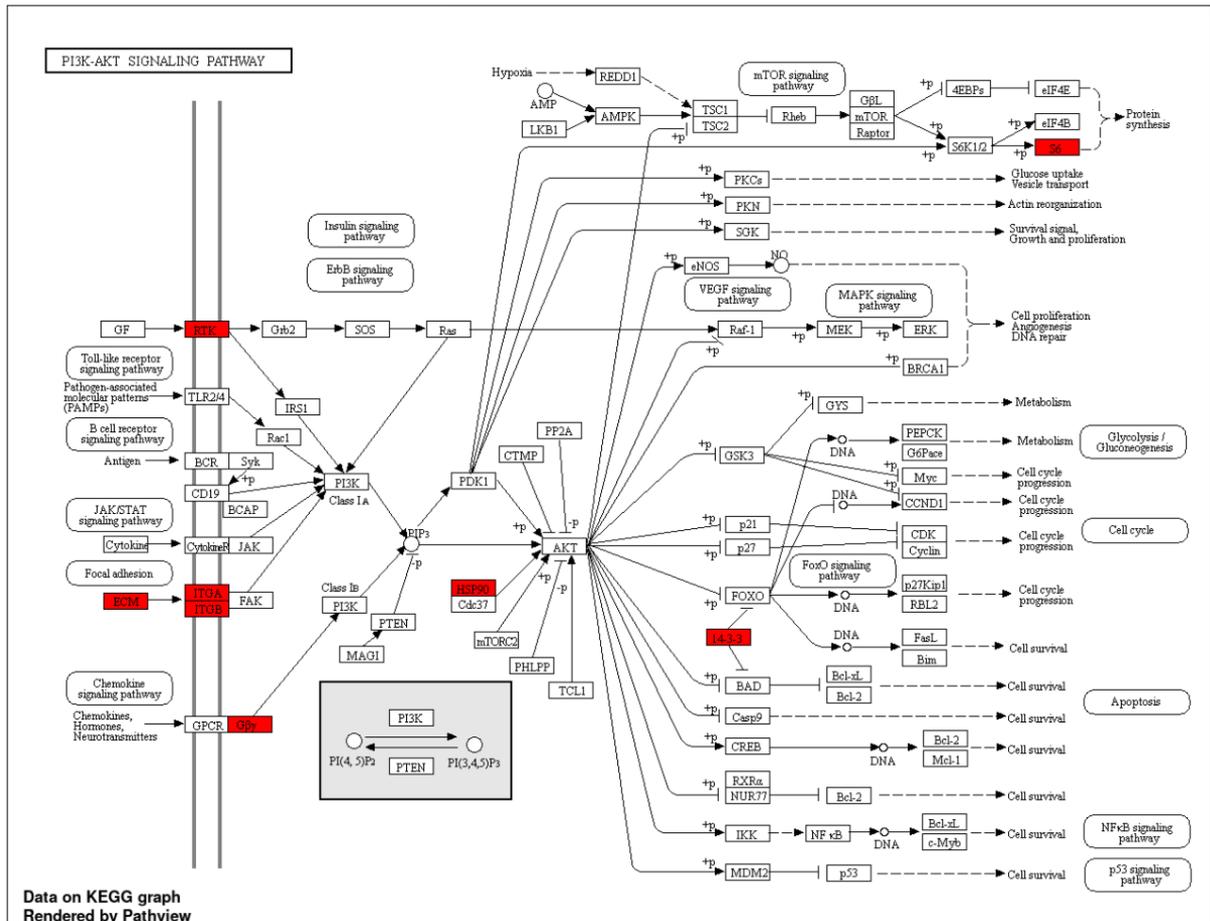
Figura 4.21 – VEs de células HUVEC infectadas ou não por *T. gondii* possuem proteínas relacionadas com a migração leucocitária.



Notas: vesículas extracelulares obtidas por ultracentrifugação a partir de $1,0 \times 10^9$ células HUVEC infectadas ou não por *T. gondii* foram analisadas por LC-MS/MS. Proteoma de referência para *Homo sapiens* foi adquirido a partir do banco de dados *UniProt* enquanto os dados foram analisados pelo software *Perseus* 1.6.10.43. A análise de enriquecimento de ontologia genética e da rede de interações moleculares foi realizada pelas plataformas *ShinyGo* e *Pathview*. HUTGVE: vesícula extracelular de célula HUVEC infectada por *T. gondii*; HUVE: vesícula extracelular de célula HUVEC; LC-MS: cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. Fonte: do autor, 2020.

Analisando as proteínas em comum entre HUVEs e HUTGVEs, foi observado um grupo de proteínas relacionadas com a via de sinalização PI3K-AKT. Foram evidenciadas além de proteínas categorizadas como receptores de membrana (Integrin alpha-V, ID. P06756; Integrin alpha-5, ID. P08648; Integrin beta-3, ID. P05106; Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2, ID. C9JIS1) outra associadas com a fosforilação de AKT (Heat shock protein HSP 90-beta, ID. P08238) (Figura 4.22).

Figura 4.22 – VEs de células HUVEC infectadas ou não por *T. gondii* possuem proteínas relacionadas com a via de sinalização PI3K-AKT.

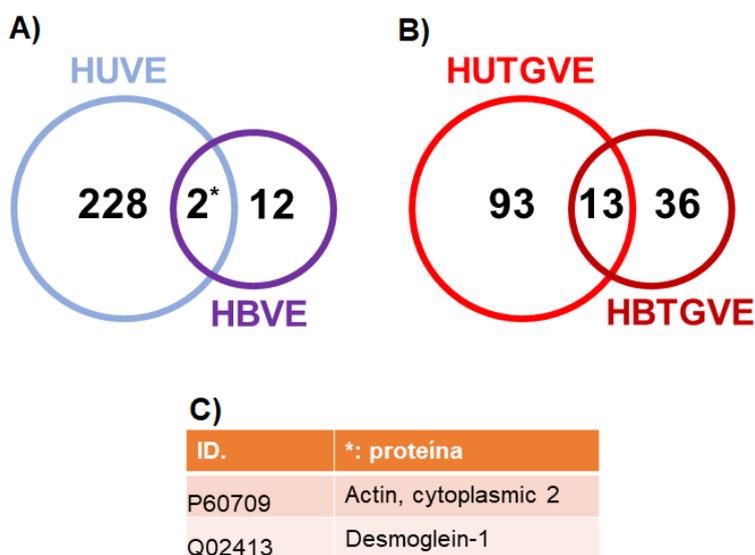


Notas: vesículas extracelulares obtidas por ultracentrifugação a partir de $1,0 \times 10^9$ células HUVEC infectadas por *T. gondii* ou não foram analisadas por LC-MS/MS. Proteoma de referência para *Homo sapiens* foi adquirido a partir do banco de dados *UniProt* enquanto os dados foram analisados pelo software *Perseus* 1.6.10.43. A análise de enriquecimento de ontologia genética e da rede de interações moleculares foi realizada pelas plataformas *ShinyGo* e *Pathview*. HUTGVE: vesícula extracelular de célula HUVEC infectada por *T. gondii*; HUVE: vesícula extracelular de célula HUVEC; LC-MS: cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. Fonte: do autor, 2020.

Uma vez analisado o perfil proteômico de VEs de células HUVEC infectadas ou não por *T. gondii*, foi realizada uma avaliação comparativa do conteúdo proteico de VEs de células HBMEC e HUVEC infectadas ou não. A partir dessa análise foi observado que o perfil proteômico de HBVEs e HUVEs era bastante distinto. Enquanto HUVEs apresentaram 228 proteínas únicas e HBVEs detinham 12 proteínas únicas, foram evidenciadas apenas duas proteínas em comum entre as duas amostras (Actin, cytoplasmic 2, ID. P60709; Desmoglein-1, ID. Q02413) (Figura 4.24 A e C). Ao realizar a comparação entre HBTGVEs e HUTGVEs, foi observado que o perfil proteico permanece distinto entre as duas amostras. Enquanto que em HUTGVEs foram identificadas 93 proteínas únicas, em HBTGVEs foram identificadas 36 proteínas únicas, além de serem observadas 13 proteínas em comum (Figura 4.24 B). Dentre elas encontram-se integrina (ID. P05556), vinculina

(ID. P18206), caspase (ID. P31944) e histona H4 (ID. P62805). Foi também identificada a desmogleína (ID. Q02413), a única proteína em comum entre HUVE, HUTGVE, HBVE e HBTGVE. Análises com maiores concentrações de HBVE e HBTGVE encontram-se em processamento.

Figura 4.23 – Células HBMEC e HUVEC produzem VEs com um perfil proteômico distinto antes e após a infecção.



Notas: vesículas extracelulares obtidas por ultracentrifugação a partir de $1,0 \times 10^9$ células HBMEC e HUVEC infectadas por *T. gondii* ou não foram analisadas por LC-MS/MS. Proteoma de referência para *Homo sapiens* e *T. gondii* foi adquirido a partir do banco de dados *UniProt* enquanto os dados foram analisados pelo software *Perseus* 1.6.10.43. Sequencialmente foram desenvolvidos diagramas com as proteínas de HUVE e HBVE (A) e HUTGVE e HBTGVE (B). As proteínas em comum entre HUVE e HBVE foram categorizadas em um quadro (C). HBTGVE; vesícula extracelular de célula HBMEC infectada por *T. gondii*; HBVE: vesícula extracelular de célula HBMEC; HUTGVE; vesícula extracelular de célula HUVEC infectada por *T. gondii*. HUVE: vesícula extracelular de célula HUVEC; LC-MS: cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. Fonte: do autor, 2020.

Foram observadas diversas proteínas em comum em VEs produzidas por células HBMEC e HUVEC infectadas por *T. gondii*. Nesse grupo foram observadas proteínas envolvidas com a adesão leucocitária e com a comunicação celular (Integrin beta-1, ID. P05556), relacionadas à transcrição (Brain acid soluble protein 1, ID. P80723; Histone H4, ID P62805) e proteínas associadas com a manutenção da integridade da barreira endotelial (Vinculin, ID. P18206; Desmoglein-1, ID. Q02413) (Tabela 4.5). Diversas proteínas observadas em HUVE como HLAs deixam de ser observadas após infecção por *T. gondii*. Proteínas ribossomais foram observadas

em ambas HUVEs e HUTGVEs, todavia foram observadas proteínas ribossomais em HUTGVEs (apêndices D e E).

Tabela 4.5 – Células HBMEC e HUVEC infectadas por *T. gondii* produzem VEs com diferentes proteínas em comum.

ID.	Proteína
Q9NZT1	Calmodulin-like protein 5
P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein
P05089	Arginase-1
P05556	Integrin beta-1
P15144	Aminopeptidase N
P18206	Vinculin
P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein
P29966	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate
P31944	Caspase-14
P62805	Histone H4
P80723	Brain acid soluble protein 1
Q02413	Desmoglein-1
A0A0A0MSI0	Peroxiredoxin-1 (Fragment)

Notas: vesículas extracelulares obtidas por ultracentrifugação a partir de $1,0 \times 10^9$ células HBMEC e HUVEC infectadas por *T. gondii* ou não foram analisadas por LC-MS/MS. Proteoma de referência para *Homo sapiens* foi adquirido a partir do banco de dados *UniProt* enquanto os dados foram analisados pelo *software Perseus* 1.6.10.43. HBTGVE; vesícula extracelular de célula HBMEC infectada por *T. gondii*; HBVE: vesícula extracelular de célula HBMEC; HUTGVE; vesícula extracelular de célula HUVEC infectada por *T. gondii*. HUVE: vesícula extracelular de célula HUVEC; LC-MS: cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. Fonte: do autor, 2020.

5 DISCUSSÃO

5.1 Células endoteliais apresentam perfis distintos quando infectadas por *T. gondii*

Células endoteliais compreendem o tipo celular com a mais íntima relação com o sangue e todos seus componentes (Bruce *et al.*, 2015). Muitos processos podem alterar a homeostase e promover uma resposta por parte do tecido endotelial. Dentre esses processos encontram-se os infecciosos seja por bactérias (Krüll *et al.*, 1999), vírus (Calvert *et al.*, 2015), fungos (Liu *et al.*, 2010), helmintos (Debrah *et al.*, 2007) ou protozoários (Knight *et al.*, 2005). Dentre os agentes infecciosos, *Toxoplasma gondii* é um protozoário capaz de interagir com o endotélio. Todavia, há uma escassez de estudos a respeito dessa interação.

T. gondii é um protozoário intracelular obrigatório capaz de sobreviver no interior da grande maioria das células eucarióticas (Dubey e Su, 2009). Foi observado que esse protozoário é capaz de invadir células endoteliais e se replicar eficientemente nelas. Além disso, também foi notado que células endoteliais de diferentes regiões do organismo interagem com *T. gondii* de forma distinta (Konradt *et al.*, 2016). Muito embora sejam observados trabalhos que avaliem a interação entre o endotélio e *T. gondii*, grande parte dos estudos concentram-se na capacidade do parasito atravessar a barreira endotelial e atingir tecidos nobres (Baba *et al.*, 2017; Konradt *et al.*, 2016). Conseqüentemente, trabalhos avaliando outras importantes alterações endoteliais na infecção por *T. gondii* se tornam menos numerosos.

Em um trabalho realizado em 2016, foi observado que células do endotélio cerebral apresentam uma taxa de infecção por *T. gondii* muito menor do que células do endotélio pulmonar (Konradt *et al.*, 2016). Outro estudo mostrou que células HUVEC apresentam uma menor taxa de infecção por *T. gondii* quando comparadas a células endoteliais da microvasculatura (HMEC, do inglês - *human microvasculature endothelial cell*). Nesse mesmo trabalho, foi observado que a taxa de infecção não é apenas dependente da linhagem celular, mas também da cepa de *T. gondii*. Curiosamente, a infecção por uma cepa menos virulenta (ME-49) apresentou uma maior taxa de infecção em HUVEC quando comparada a uma cepa mais virulenta (RH) (Cañedo-solares *et al.*, 2013). Tais eventos fortaleceram a

hipótese de que células HBMEC e HUVEC poderiam apresentar taxas de infecção por *T. gondii* distintas. De fato, nesta dissertação, células HBMEC apresentaram uma menor taxa de infecção e carga parasitária comparado a células HUVEC. É interessante observar que a equipe de Cañedo-Soares utilizou a proporção de 10 taquizoítas por célula ao passo que nós utilizamos a proporção 5:1. Todavia, mesmo com essa diferença em número de taquizoítas, os resultados foram similares.

Outro ponto levantado pela equipe de Cañedo-Soares, é que a taxa de replicação das células pode estar relacionada com a taxa de infecção das mesmas. *T. gondii* invade preferencialmente células na fase S do ciclo celular e, por conta disso, apresenta uma taxa de infecção maior em células com replicação mais intensa (Lavine e Arrizabalaga, 2009). No presente trabalho, não foi realizada uma análise comparativa do ciclo celular entre células HBMEC e HUVEC. No entanto, foi observado que uma única célula HUVEC albergava até oito taquizoítas enquanto que células próximas a essa não se encontravam infectadas. Embora seja especulativo, esse resultado pode sugerir que células HUVEC infectadas produzam moléculas que inibam o ciclo celular das células adjacentes assim como foi observado em estudos com outros tipos celulares (Kim *et al.*, 2016).

Uma vez confirmado que a infecção por *T. gondii* em células HUVEC e HBMEC apresenta perfis distintos, o próximo passo foi avaliar se o protozoário poderia ativar o endotélio, também, de maneira distinta. Para isso, um painel de genes relacionados à ativação endotelial foi avaliado. Os resultados mostraram que células HUVEC apresentaram um perfil inflamatório muito mais intenso do que células HBMEC representado por uma elevação do nível de *IL6*, *IL8*, *SOCS3* e *MCP1*. Ao recorrer à literatura, foi observado que células HUVEC apresentam uma resposta inflamatória intensa quando estimuladas com diferentes agentes pró inflamatórios (Makó *et al.*, 2010). Todavia, verificamos uma escassez de informações a respeito das alterações moleculares que podem ser causadas pela infecção do endotélio por *T. gondii* (Baba *et al.*, 2017; Lachenmaier *et al.*, 2011).

MCP1, também conhecida como CCL2, é uma molécula quimioatrativa de monócitos. Sua secreção está fortemente envolvida não apenas com processos inflamatórios e infiltrados monocíticos, mas até mesmo com a apoptose (Gerszten *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2011). Neste estudo, foi observado uma crescente expressão de *MCP1* em células HUVEC infectadas com *T. gondii* ao longo do tempo. Tal fato revela um contínuo estímulo de expressão ao longo da invasão parasitária. Resultados similares foram observados no endotélio da retina infectada por

taquizoítas de *T. gondii*. Essa expressão era mantida elevada mesmo após 24 horas do início do processo infeccioso (Knight *et al.*, 2005). É interessante observar que a expressão de *MCP1* também foi avaliada em fibroblastos quando infectados por *T. gondii* ou apenas pelo contato com a proteína parasitária SAG1. Foi evidenciado que quando fibroblastos eram incubados com proteínas purificadas do parasito era promovida uma intensa, mas breve, expressão de *MCP1*. Já durante a infecção por *T. gondii*, a expressão de *MCP1* se estendia ao longo de 24 horas (Brenier-pinchart *et al.*, 2006). Com isso, pode-se concluir que o parasito estimula a expressão de *MCP1* em diferentes linhagens celulares, incluindo células endoteliais, como HUVEC.

Mas se por um lado células HUVEC apresentaram um aumento na expressão de *MCP1* quando infectadas por *T. gondii*, o mesmo não foi observado em células HBMEC. A expressão se manteve de forma constitutiva até a hora 2 pós infecção até não serem observados níveis detectáveis dos transcritos na hora 4 pós infecção. Ao recorrer à literatura, diferentes situações são observadas onde células HBMEC apresentam um aumento da expressão de *MCP1* na infecção por vírus da Hepatite C (Liu *et al.*, 2016), ou mantém uma expressão basal na infecção por vírus Epstein-Barr (Casiraghi, Dorovini-zis e Horwitz, 2011) ou por *Cryptococcus neoformans* (Jong *et al.*, 2008). Portanto, a expressão de *MCP1* em células HBMEC parece ter uma expressão bastante distinta de acordo com o agente infeccioso.

A quimioatratividade de monócitos é essencial para o desenvolvimento de um processo inflamatório e a eliminação de agentes infecciosos. A produção desordenada de *MCP1* em regiões como o sistema nervoso central está intimamente relacionada a processos neuroinflamatórios (Sawyer *et al.*, 2014) e desordens neurológicas como esclerose múltipla amiotrófica (Henkel *et al.*, 2004). No âmbito gestacional, a expressão e produção aumentadas de *MCP1* foi relatada como um importante fator para a migração de agentes infecciosos, como vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV1) ao cérebro do feto (Eugenin *et al.*, 2005) ou mesmo com eventos de aborto espontâneo (Li, Wu e Dong, 2016).

Ainda no âmbito da inflamação buscamos avaliar outros genes, como *IL12*. Sabe-se que a expressão tanto da forma ativa (*IL12p70*) como de seu homodímero (*IL12p40*) pode ser aumentada sob condições muito específicas como através da interação CD40/CD154, enquanto que *IL12p35* é constitutivamente expressa em células HUVEC (Lienenlücke *et al.*, 2000). Através da análise por qPCR, verificamos que as células HUVEC e HBMEC não expressavam *IL12p40* a níveis detectáveis.

Fato qual não significa necessariamente que não havia expressão, mas que a quantidade de mRNA de *IL12p40* fosse muito escassa a partir de 1 ng de RNA total que utilizamos nas avaliações. A mesma observação pode ser relacionada à avaliação de outros genes os quais não conseguimos detectar em células HBMEC (*ANG1*, *ANG2*, *SELECTINAE*, *SELECTINAP* e *VCAM1*) ou em ambas as células (*IL1B*, *IL10rA*, *IL10rB* e *VWF*).

A associação entre *IFNG* e *TNF* é capaz de estimular células endoteliais a eliminarem agentes invasores como *Pseudomonas aeruginosa* pela produção de espécies reativas de oxigênio (Assis, De *et al.*, 2000). A atividade de nitritos, ânions superóxidos ou óxido nítrico na infecção por *T. gondii* demonstra não ser um mecanismo eficaz, ao menos quando agindo isoladamente, na contenção do desenvolvimento parasitário em células HUVEC (Woodman, Dimier e Bout, 1991). Estudos relataram a expressão de *TNF* em células HUVEC intensamente estimuladas com lipopolissacarídeos (LPS), mas com a impossibilidade de liberação das mesmas no meio extracelular, as quais permaneciam no citoplasma e membrana celular (Fujita *et al.*, 2011). Em nosso trabalho, foi observado que tanto células HBMEC como HUVEC não expressaram *TNF* em níveis detectáveis no processo infeccioso por *T. gondii*. Tal ocorrido pode ser atrelado à regulação negativa da expressão de *TNF* conforme relatado para outros modelos celulares (Bennouna, Sukhumavasi e Denkers, 2006).

Embora a presença de *IFNG* e *TNF* possa estimular células endoteliais a produzirem espécies reativas de oxigênio, estudos avaliaram o aumento da expressão de *ENOS* também sob estímulo de *IFNG* e *TNF* e seu impacto na defesa celular contra *T. gondii* (Dincel e Atmaca, 2015). Ressalta-se que atividade das espécies reativas de oxigênio representam um papel protetivo em estágios tardios da infecção por *T. gondii* em diversas linhagens celulares (Scharton-Kersten *et al.*, 1997). Se por um lado a produção de óxido nítrico é capaz de promover, ao menos em parte, o controle da infecção por taquizoítas em células endoteliais, a atividade excessiva ou suprimida pode representar a disfunção dessas mesmas células (Albrecht *et al.*, 2003).

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que células HUVEC infectadas com *T. gondii* não apresentaram qualquer alteração nos níveis de *ENOS* ao longo de todas as horas estudadas. Esse fato corrobora com a literatura, que ressalta a supressão da atividade da enzima por parte do organismo materno a fim de manter a gestação (Pfaff *et al.*, 2008). No âmbito cerebral, células HBMEC

também não apresentaram qualquer alteração na expressão de *ENOS* ao longo de todas as horas estudadas. Os efeitos deletérios da expressão de *ENOS* foi evidenciado em um estudo, o qual demonstrou que camundongos não apresentavam um aumento agudo, mas sim crônico da expressão de *ENOS* chegando a se prolongar por semanas. Tal situação tem sido intimamente relacionada a processos de encefalite nesses animais (Dincel e Atmaca, 2015). Espera-se que a expressão de *ENOS* em células HUVEC infectadas por *T. gondii* possivelmente seja suprimida mesmo sendo avaliada dias após infecção. Porém, células HBMEC poderiam apresentar um aumento na expressão de *ENOS* em momentos tardios da infecção.

Embora *ADAMTS13* seja uma molécula intimamente relacionada com a coagulação, foi observado que ela possui um papel neuroprotetivo (Dincel e Atmaca, 2016) Ao passo que a necrose e apoptose endotelial propiciam a migração de taquizoítas até o sistema nervoso central, a expressão constitutiva de *ADAMTS13* promove um papel protetivo contra a migração parasitária (Dincel e Atmaca, 2016). No estudo aqui apresentado, explorou-se a expressão de *ADAMTS13* em ambos os tipos celulares e foi observado que nas horas iniciais pós infecção a expressão de *ADAMTS13* passa a ser regulada negativamente. Isso pode ter ocorrido por uma interferência direta pela presença do taquizoítas ou por alterações na expressão de VWF (Vomund e Majerus, 2009). Todavia, como não observamos níveis detectáveis de VWF, não é possível correlacionar os eventos.

Células HUVEC mantém uma neovasculogênese constante, e por isso devem manter um nível basal de expressão gênica de *ANG1* e *ANG2* (Breier, 2000). Os resultados obtidos em nosso estudo corroboraram com tal afirmação uma vez que a expressão desses genes não sofreu modificações ao longo de todas as horas avaliadas. Muito embora os níveis de *ANG1* e *ANG2* permaneceram estáveis, foi evidenciado um discreto aumento da expressão de *VEGF*, o qual poderia promover um desbalanço no processo neovasculogênico. Tal achado entra em discordância com um trabalho realizado em 2012 que evidenciou casos de aborto em mulheres com sorologia positiva para *T. gondii* associados à redução na expressão de *VEGF* (Al-Mohaimen e Ahmed, 2012). Todavia, no estudo citado foi verificado que essa alteração ocorria em trofoblastos. Baseando-se nisso, é interessante verificar que diferentes células atreladas à gestação podem responder de forma distinta à infecção. Ainda no âmbito infeccioso, também foram observadas por outros

trabalhos alterações na expressão de *ANG1* e *ANG2* em células HUVEC infectadas por outros agentes como o vírus Hantaan (Hwang *et al.*, 2009).

O aumento da expressão de moléculas de adesão, como ICAM-1 ou VCAM-1, tem como objetivo principal suscitar a marginação, rolamento e a diapedese de leucócitos através do endotélio para chegar ao local de inflamação (Bruce *et al.*, 2015). Diversos eventos tem sido observados como capazes de modular positiva ou negativamente a expressão de tais moléculas. Esses eventos compreendem desde moléculas envolvidas diretamente com o endotélio como VEGF (Conti e Bartolucci, 2015), microRNAs associados a lipoproteínas (Tabet *et al.*, 2014) ou mesmo hidro cortisona conjugada a glicina (Tan *et al.*, 2017).

É sabido que células endoteliais quando infectadas por *T. gondii* aumentam a expressão transcricional de moléculas de adesão, como *ICAM1* (Lachenmaier *et al.*, 2011). Na presente dissertação, os resultados apontaram que células HBMEC e HUVEC expressam constitutivamente ICAM-1. Porém, após a infecção por *T. gondii* as células passaram ter mais ICAM-1 em sua superfície. É interessante que o oposto foi observado a nível transcricional: a partir da hora 8 pós infecção não foram verificados níveis detectáveis de mRNA de ICAM-1 em células HUVEC. Já em células HBMEC a redução do nível transcricional ocorreu na hora 2 pós infecção. Tal discrepância entre transcritos e proteína origina a hipótese de que a infecção por *T. gondii* promove a externalização de proteínas de adesão encontradas em lisossomos. Essa suspeita é alicerçada na capacidade de ICAM-1 participar de não apenas processos de interação entre endotélio e leucócitos, mas também participar constantemente no transporte de moléculas por endocitose. Uma vez que a célula internaliza a partícula de interesse, ela é capaz de reciclar ICAM-1 para novas atividades (Muro, Schuchman e Muzykantov, 2006).

Já foi observado que a expressão de moléculas de adesão facilitam o processo de migração de *T. gondii* através de células do endotélio da retina (Furtado *et al.*, 2012). Por conta disso, foi cogitada a possibilidade da expressão de ICAM-1 na superfície de células endoteliais poderem facilitar o ingresso parasitário (Cañedo-solares *et al.*, 2013). O fato de não termos verificado o aumento da taxa de infecção de células endoteliais expressando maiores quantias de ICAM-1 e VCAM-1 pode revelar que *T. gondii* não utiliza essas moléculas para invadir a célula alvo. Ressaltamos que a ativação das células com TNF, como foi realizado nesse estudo, além de promover a expressão de ICAM-1 e VCAM-1, também é capaz de ativar vias relativas à eliminação de taquizoítas. Porém, desconsideramos a possibilidade

de a contagem de taquizoítas intracelulares uma hora pós infecção ter sido afetada pela ativação de vias de eliminação por duas condições: 1) ENOS não promove uma proteção eficiente em infecções agudas, mas em crônicas (Scharton-Kersten *et al.*, 1997); IDO é ativada intensamente por IFN, mas não por TNF (Däubener *et al.*, 2001). Curiosamente, não identificamos a expressão de VCAM-1 em células HBMEC, mesmo quando essas foram estimuladas com TNF. Esse fato é bastante contraditório na literatura, onde diversos estudos relatam a expressão de tal moléculas nessas células (Dalvi *et al.*, 2017; Wong e Dorovini-zis, 1995), enquanto outros não (Däubener *et al.*, 2001; Washington *et al.*, 1994).

5.2 Vesículas extracelulares no contexto infeccioso

É notável a discrepância entre autores a respeito do diâmetro padrão das vesículas secretadas por *T. gondii* (Li e Zhou, 2017; Li, Yawen, Xiu, *et al.*, 2018; Silva e Lima, 2017). Tal fato pode ocorrer por um fator peculiar e pouco discutido: a possibilidade das vesículas em fusionar-se (Kita-Tokarczyk *et al.*, 2005). Dessa forma, mesmo o processo de isolamento poderia gerar resultados com notáveis diferenças. Objetivando contornar tal situação, o trabalho aqui apresentado inseriu outra metodologia para auxiliar a caracterização das vesículas extracelulares. Além da análise pelo sistema NTA e observação das vesículas por microscopia eletrônica de transmissão que juntas validam a purificação das vesículas extracelulares (VEs), incluímos a avaliação dos taquizoítas através de microscopia eletrônica tanto de transmissão como varredura com enfoque nas VEs. Com base nisso, verificamos que VEs secretadas por taquizoítas apresentaram um tamanho diversificado e com predomínio entre 100 e 200 nanômetros. Estudos realizados em 2018 utilizaram microscopia eletrônica de varredura para observar a secreção de VEs a partir de taquizoítas de *T. gondii*, todavia, as imagens avaliadas isoladamente demonstraram um efeito similar e confundível à desfragmentação da membrana plasmática (*shedding of membrane*) (Silva *et al.*, 2018).

Os resultados obtidos nesse estudo mostram que há uma concordância entre o tamanho das vesículas extracelulares secretadas por taquizoítas observado pelo NTA e microscopia eletrônica tanto de transmissão como varredura. Porém, muita discussão é observada na literatura a respeito do perfil das vesículas extracelulares secretadas por *T. gondii*. Sabe-se que o NTA possui uma ampla abrangência de detecção de partículas, todavia, toda partícula que seja ora muito pequena ou

demasiadamente grande pode ser negligenciada pelo sistema conforme a linha de corte determinada pelo avaliador (Vestad *et al.*, 2017). Dessa forma, a fim de se obter um gráfico mais uniforme, pesquisadores optam por aumentar o ponto de corte para detecção de partículas em detrimento à identificação daquelas com tamanho próximo ao limite de 10 nanômetros (Maas *et al.*, 2015). Tal modificação pode mascarar resultados condizentes com a realidade. Outro ponto o qual requisita especial atenção é o processo natural de agregação de vesículas extracelulares que pode ser facilitado pela temperatura ambiente ou trepidação realizada pelo sistema de bombeamento do NTA.

Por muitos anos, devido à sua arquitetura celular simples, o endotélio de todo o organismo foi visto como um único grupo celular (Jaffe *et al.*, 1973). Apenas com os avanços da biologia celular e molecular que foi observado que células endoteliais de diferentes localizações apresentam atividades bastante distintas (Byrne *et al.*, 2000; Makó *et al.*, 2010; Rust *et al.*, 2012; Sanders, 2004). O mesmo pode ser observado através das VEs. Observamos que células HBMEC e HUVEC produzem VEs não apenas com tamanhos distintos, mas também em diferentes concentrações e conteúdo proteico distinto. Células HUVEC em um ambiente sem estresse celular secretam próximo a duas vezes mais VEs ao comparar com células HBMEC nas mesmas condições. Evento o qual sugere que células HUVEC mantêm uma comunicação celular muito mais intensa do que células HBMEC.

No presente estudo foi observado que as vesículas extracelulares obtidas a partir de células endoteliais 24 horas pós infecção por *T. gondii* apresentaram características diferentes daquelas analisadas 2 horas após o estímulo. Não apenas a concentração de VEs aumentou após 24 horas, como também o tamanho das mesmas. Foi observado que VEs de células HBMEC apresentaram tamanho médio entre 100 e 200 nm 2 horas após a infecção. No entanto, após 24 horas de infecção, essas VEs passaram a apresentar um tamanho médio entre 100 e 300 nm. Embora haja a possibilidade de as células secretarem VEs com tal diâmetro, outro evento possível de ocorrer seria o fuscionamento dessas VEs ao longo das horas (Kita-Tokarczyk *et al.*, 2005).

Nesse estudo, as imagens obtidas tanto por microscopia eletrônica de transmissão como de varredura sugerem a liberação de vesículas de *T. gondii* extracelulares através de brotamento da membrana plasmática, ou seja, microvesículas. Porém, é muito provável que haja a produção e liberação tanto de exossomas como microvesículas pelo protozoário de forma concomitante. Tal evento

levanta novos questionamentos acerca das vias de secreção de vesículas extracelulares pelo *T. gondii*. Embora seja observado trabalhos que isolem exossomas de *T. gondii* através de kits específicos (Li, Yawen, Xiu, *et al.*, 2018; Wowk *et al.*, 2017) e outros que isolem VEs através de cromatografia (Silva *et al.*, 2018), ainda não há estudos que avaliem as diferenças tanto nas vias de secreção como conteúdo entre exossomas e microvesículas desse protozoário.

As vias de ativação de células endoteliais a partir de vesículas extracelulares são objeto recente de estudo. É sabido que vesículas extracelulares oriundas de tecidos tumorais podem conter tetraspaninas capazes de modular com grande eficiência a expressão gênica de células endoteliais. A consequência disso é um aumento na expressão gênica de *VEGF*, *VWF*, *VEGFR2*, *CXCL5* e *CCR1* acompanhada de um aumento da proliferação e migração de células endoteliais adjacentes ao tecido tumoral (Nazarenko *et al.*, 2010). Assim como para a maioria dos agentes infecciosos, são observados mais trabalhos que avaliaram os efeitos de exossomas oriundos de células infectadas do que os efeitos da VEs parasitárias em células hospedeiras (Aline *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2016; Pope e Lässer, 2013). Foi evidenciado que células dendríticas infectadas por *T. gondii* produzem exossomas que potencializam a resposta do tipo Th1 (Aline *et al.*, 2004). Não obstante, também foi observado que células L6 murinas infectadas por *T. gondii* produzem exossomas contendo miRNA relacionados à interrupção do ciclo celular (Kim *et al.*, 2016). No entanto, pouco se sabe sobre as VEs de taquizoítas. Foi observado que macrófagos que entraram em contato com exossomas parasitários produzem mais IL-12, TNF e IFNG. Em adição a isso, camundongos estimulados com os mesmos exossomas apresentam maior sobrevivência ao serem infectados com concentrações letais de taquizoítas (Li, Yawen, Xiu, *et al.*, 2018). Portanto, a avaliação da influência de TGVEs em diferentes células pode gerar resultados promissores.

Em nosso estudo, foi verificado que células HBMEC estimuladas com baixas concentrações de VEs provenientes de *T. gondii* apresentaram maiores taxas de infecção. Também foi evidenciado um aumento na taxa de infecção em células HUVEC, porém sem representação estatisticamente significativa. Para a realização de ensaios com concentrações desafiadoras de VEs parasitárias, nos baseamos em trabalhos realizados com macrófagos (Li, Yawen, Liu, *et al.*, 2018). Yawen e sua equipe observaram que TGVEs apresentavam efeito citotóxico em macrófagos a partir de uma concentração de 160 µg/mL. Por conta disso, desenvolvemos a hipótese de que células endoteliais, por não deterem uma maquinaria proteica

voltada principalmente ao combate a agentes infecciosos – como observa-se em macrófagos –, apresentariam uma maior sensibilidade ao estímulo por partículas parasitárias. Em concordância com o esperado, a maior concentração de TGVEs que utilizamos sem letalidade estatisticamente significativa foi de 20 µg/mL, mas cogita-se que se avaliássemos a concentração de 40 µg/mL já poderíamos observar efeitos citotóxicos por parte das TGVEs.

Curiosamente, quando células HBMEC eram expostas a maiores concentrações das mesmas VEs, o efeito potencializador deixava de ocorrer. A principal hipótese cogitada foi que grandes concentrações de TGVEs promoviam uma intensa resposta inflamatória por parte das células de forma similar ao que se observa na incubação das mesmas com LPS ou TNF (Makó *et al.*, 2010). Essa resposta inflamatória poderia ativar vias como da IDO ou ENOS e restringir o crescimento parasitário (Albrecht *et al.*, 2003; Däubener *et al.*, 2001). A respeito do aumento da taxa de infecção mediada por VEs parasitárias, pode ser especulado pelo menos duas possibilidades: 1) na regulação negativa de genes pertencentes a vias de eliminação parasitária como *ENOS* ou *IDO* (Däubener *et al.*, 2001; Dincel e Atmaca, 2015); 2) na regulação negativa de genes, tal como *MAPK* (*p38 mitogen-activated protein kinase*) (Grethe *et al.*, 2004), *FOXO3* (*forkhead box O3*) (Li, P. *et al.*, 2018), *CASPASE1* (Xi *et al.*, 2016), *BAX* ou *BAK* (Dhanabal *et al.*, 1999) os quais pertenceriam às vias de morte celular programada, seja ela via apoptose ou inflamossoma.

Se por um lado, grandes concentrações de VEs parasitárias não alteraram a taxa de infecção, o estímulo das células com menores concentrações de VEs potencializou o processo infeccioso por mecanismos ainda não relatados na literatura vigente. A compreensão desse evento é bastante complexa devido ao fato de não estarmos avaliando os efeitos da presença/ausência de VEs, mas sim, da concentração das mesmas. Wowk e colaboradores avaliaram, através de análises proteômicas, a presença de diversas proteínas nos exossomas de *T. gondii* (Wowk *et al.*, 2017). Enquanto que algumas proteínas das TGVEs, como roptrias (Bradley *et al.*, 2005) ou micronemas (Soldati, Dubremetz e Lebrun, 2001), poderiam favorecer o processo infeccioso, outras proteínas poderiam propiciar um processo inflamatório potencializado com a maior concentrações de VEs. Uma vez que uma resposta inflamatória se instaurasse, a mesma poderia se sobrepor aos mecanismos que, anteriormente, favoreciam o parasito. Assim, seria observada a redução da taxa de

infecção. Caso possa ser verificada essa sobreposição de eventos, um diferente mecanismo de interação parasita/hospedeiro poderia ser descrito.

Diferente do aumento na taxa de infecção de células HBMEC estimuladas com TGVEs, observamos uma redução nessa taxa ao estimular as células com HBTGVEs. Os mecanismos envolvidos nesse processo continuam sob investigação, porém, a hipótese levantada é que diferentes proteínas contidas nas HBTGVEs poderiam propiciar um processo de resposta à infecção. Dentre elas, foram observadas proteínas associadas à compactação do DNA, as quais poderiam afetar a transcrição de genes associados à infecção (Leng *et al.*, 2020). Curiosamente, foi identificada a histona H4 de *T. gondii* em HBTGVEs mas não nas VEs do próprio parasito ou em HUTGVEs. Não se sabe se a proteína foi encontrada nessas VEs por algum mecanismo parasitário, ou foi apenas o produto da degradação do protozoário em lisossomos celulares. Também não sabemos se a presença da proteína pode promover algum efeito protetivo nas células hospedeiras. Foi observado por outros grupos de pesquisa que células infectadas com *Leishmania spp.*, incorporavam a histona H3 parasitária a qual desestabilizava o nucleossoma da célula hospedeira e alterava o padrão transcricional (Dacher *et al.*, 2019). Todavia, interações como essa ainda não foram estudadas em células infectadas por *T. gondii*.

Nesse estudo foi observado que células HBMEC apresentaram uma maior quantidade de proteínas parasitárias em suas VEs após a infecção ao comparar com células HUVEC infectadas. Cogitava-se que ambos tipos celulares produzissem VEs com significativo conteúdo proteico decorrente da degradação parasitária. Todavia, mesmo apresentando um perfil inflamatório e uma maior taxa de infecção, células HUVEC produziram VEs com apenas cinco proteínas parasitárias. Estudos relataram a presença de diferentes mRNAs e proteínas em VEs de células endoteliais submetidas a condições de estresse como hipóxia ou na presença de TNF (Jong *et al.*, 2012). Outros estudos realizados em 2013 evidenciaram a presença de mRNA de *T. gondii* em VEs de fibroblastos humanos infectados o qual poderia regular a expressão de IL-17 (Pope e Lässer, 2013). Em adição aos trabalhos sobre VEs de células endoteliais, pesquisas demonstraram que as VEs de células endoteliais ativadas são capazes de estimular pericitos a produzirem VEGFB (Yamamoto *et al.*, 2015). Embora seja observado um significativo número de estudos sobre as VEs de células endoteliais, a presença de proteínas parasitárias em nessas VEs permanece pobremente discutida.

Proteínas comumente localizadas em vesículas citoplasmáticas e de grânulos de secreção deixaram de ser observados em HBTGVEs enquanto que começaram a ser observadas proteínas localizadas em junções de ancoragem, aderente e célula-substrato. É sabido que células endoteliais desenvolvem um contato célula-célula bastante complexo (Dejana, 2004). Nesse contexto, podem ser observadas interações do tipo junção aderente (*adherent junction*) e união justa (*tight junction*) mas não de desmossomas os quais inexistem em células endoteliais (Yonashiro *et al.*, 2009). Não obstante, mesmo com a ausência de desmossoma, a desmogleína foi a única proteína identificada nas VEs tanto de HBMEC como HUVEC infectadas ou não. Isso pode ocorrer devido ao fato de a desmogleína possuir um papel não canônico em células endoteliais. A proteína propicia a neoangiogênese nesse tipo celular (Ebert *et al.*, 2016). VEs de células mesmo infectadas contendo proteínas relacionadas à interação celular refuta, ao menos em parte, a hipótese de ser uma simples aleatoriedade. A melhor hipótese concentraria na importância dada à interação celular mesmo em eventos infecciosos.

Em analogia a um sistema *in vivo*, uma vez próximas ao estado de confluência, as células deixam de ser amplamente responsivas a fatores de crescimento e passam a adotar características atreladas ao controle de permeabilidade e da apoptose (Viñals e Pouysségur, 1999; Wójciak-Stothard *et al.*, 2001). Curiosamente, minutos após o primeiro contato célula-célula, já é desenvolvida uma rápida interação (Pece e Gutkind, 2000). Nesse contexto, é possível cogitar que uma vez confluentes e sem estímulo estressante, células HBMEC apresentam uma comunicação através de junções ou VEs menos intensa. Uma vez desafiadas por um processo infeccioso, elas retomariam intensamente atividades de comunicação celular seja por junções ou mesmo VEs. Se por um lado células HBMEC produziram VEs com proteínas relacionadas à interação celular, células HUVEC responderam de forma contrária. Essas secretaram VEs com diversas proteínas relacionadas a junções celulares quando não infectadas, após o contato com *T. gondii*, a concentração dessas proteínas era drasticamente reduzida ou deixava ser observada.

Foi evidenciada a presença de poucas proteínas ribossomais em VEs de células HUVEC. Após serem infectadas por *T. gondii*, foi observado, além de uma maior concentração dessas proteínas, a presença de outras proteínas ribossomais. Embora trabalhos revelem o perfil proteômico de VEs de células endoteliais ativadas (Peterson *et al.*, 2008) e outros que evidenciem a presença de mRNA relacionados a

ribossomos em VEs de células tumorais (Chen *et al.*, 2016), não são verificados trabalhos que estudem a presença das proteínas ribossomais em VEs. Cogita-se que o aumento de proteínas ribossomais nas HUTGVEs seja decorrente de um aumento de taxa metabólica associado a uma ampliação do *turnover* proteico de ribossomos. Outra hipótese seria que células HUVEC infectadas compartilham proteínas ribossomais que favorecem a maquinaria traducional de células adjacentes.

A apresentação de antígenos próprios através do sistema HLA é um evento constante no organismo e age como um mecanismo preventivo de reações auto imunes (Bakker *et al.*, 2006). Trabalhos evidenciaram que células imunes são capazes de produzir VEs com MHC capaz de apresentar antígenos e modular o sistema imune (Buschow *et al.*, 2010). Outros trabalhos demonstraram que células dendríticas estimuladas com partículas de *T. gondii* podem produzir VEs que apresentam antígenos parasitários em MHC-II (Aline *et al.*, 2004). Todavia, pouco se sabe a respeito da apresentação de antígenos próprios através de VEs. Nessa dissertação foi observada a presença de proteínas do sistema HLA em VEs de células HUVEC não infectadas. Após a infecção por *T. gondii*, muitas dessas proteínas deixaram de ser observadas nas VEs. Não se sabe se a alteração do perfil proteômico das HUTGVEs é decorrente de alguma modulação de origem parasitária ou por parte da própria célula em resposta à infecção.

O estudo aqui exposto mostrou que as células endoteliais HBMEC e HUVEC apresentam um perfil distinto quando infectadas por *T. gondii*. Esse evento demonstra que mesmo pertencendo ao mesmo tipo celular (endotélio), as células são capazes de reagir de forma totalmente diferente. Não obstante, uma série de questionamentos podem ser realizados para suscitar novos estudos como: a expressão de ICAM-1 em células endoteliais infectadas por *T. gondii* ocorre pela externalização de proteínas contidas em lisossomos por um mecanismo parasitário ou celular? Esse evento poderiam facilitar o ingresso de monócitos circulantes a tecidos como o cérebro ou o feto?; Por que células HUVEC produzem próximo ao dobro de VEs ao comparar com células HBMEC? Qual o mecanismo envolvido na alteração da taxa de infecção de células endoteliais ativadas com VEs de taquizoítas e de outras células infectadas? Será que VEs de células HBMEC infectadas promoveriam um efeito protetivo em células HUVEC? Portanto, enfatizamos a importância do desenvolvimento constante de estudos que avaliem as alterações em diferentes tipos de células endoteliais sob as mais diversas circunstâncias.

CONCLUSÕES

- Células endoteliais de tipos diferentes apresentam um perfil transcricional distinto à invasão por *Toxoplasma gondii*.
- Células HUVEC apresentam um perfil pro-inflamatório quando infectadas por *T. gondii*.
- Células endoteliais infectadas por *T. gondii* aumentam a expressam de moléculas adesivas em sua superfície.
- Pretratamento de células HBMEC com VEs de *T. gondii* promove uma maior taxa de infecção.
- Pretratamento de células HBMEC com VEs de células endoteliais infectadas por *T. gondii* promove uma redução na taxa de infecção.
- O perfil proteômico de VEs de células endoteliais é alterado na infecção por *T. gondii*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-MOHAIMEN, N. A.; AHMED, A. M. Vegf expression in trophoblastic tissue of women with spontaneous miscarriage and infected by *Toxoplasma gondii* using insitu hybridization. **Iraqi J. Biotech**, v. 11, n. 2, p. 494–502, 2012.
- ALBRECHT, E. W. J. A. *et al.* Protective role of endothelial nitric oxide synthase. **Journal of Pathology**, v. 199, n. 1, p. 8–17, 2003.
- ALINE, F. *et al.* *Toxoplasma gondii* antigen-pulsed-dendritic cell-derived exosomes induce a protective immune response against T. gondii infection. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 7, p. 4127–4137, 2004.
- ALVARADO-ESQUIVEL, C. *et al.* Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in brain and heart by immunohistochemistry in a hospital-based autopsy series in Durango, Mexico . **European Journal of Microbiology and Immunology**, v. 5, n. 2, p. 143–149, 2015.
- ASSIS, M. C. DE *et al.* Human endothelial cells are activated by interferon- γ plus tumour necrosis factor- α to kill intracellular *Pseudomonas aeruginosa*. **Immunology**, v. 101, n. 2, p. 271–278, 2000.
- AVIRUTNAN, P. *et al.* Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 161, n. 11, p. 6338–46, 1998.
- BABA, M. *et al.* Adhesion of *Toxoplasma gondii* tachyzoite-infected vehicle leukocytes to capillary endothelial cells triggers timely parasite egression. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017.
- BAKKER, P. I. W. DE *et al.* A high-resolution HLA and SNP haplotype map for disease association studies in the extended human MHC. **Nature Genetics**, v. 38, n. 10, p. 1166–1172, 2006.
- BAN, Y. *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase levels at the normal and recurrent spontaneous abortion fetal-maternal interface. **Journal of International Medical Research**, v. 41, n. 4, p. 1135–1149, 2013.
- BANERJEE, A. *et al.* Activation of brain endothelium by pneumococcal neuraminidase NanA promotes bacterial internalization. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 11, p. 1576–1588, 2010.
- BAUTISTA, L. E. *et al.* Independent association between inflammatory markers (C-reactive protein , interleukin-6 , and TNF- a) and essential hypertension. **Journal of Human Hypertension**, v. 19, p. 149–154, 2005.
- BEAUVILLAIN, C. *et al.* Exosomes are an effective vaccine against congenital toxoplasmosis in mice. **Vaccine**, v. 27, n. 11, p. 1750–1757, 2009.
- BELOV, K. *et al.* Characterization of the opossum immune genome provides insights into the evolution of the mammalian immune system. **Genome Research**, v. 17, n. 7, p. 982–991, 2007.

BENNOUNA, S.; SUKHUMAVASI, W.; DENKERS, E. Y. *Toxoplasma gondii* Inhibits Toll-Like Receptor 4 Ligand-Induced Mobilization of Intracellular Tumor Necrosis Factor Alpha to the Surface of Mouse Peritoneal Neutrophils. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 7, p. 4274–4281, 2006.

BERENDS, E. T. M. *et al.* Distinct localization of the complement C5b-9 complex on Gram-positive bacteria. **Cellular Microbiology**, v. 15, n. August, p. 1955–1968, 2013.

BEUTLER, B. *et al.* Genetic Analysis of Host Resistance: Toll-Like Receptor Signaling and Immunity at Large. **Annu. Rev. Immunol.**, n. 24, p. 353–389, 2006.

BLUNDELL, C. *et al.* A microphysiological model of the human placental barrier. **Lab on a Chip**, 2016.

BOBIĆ, B.; ŠIBALIĆ, D.; DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ. High Levels of igM Antibodies Specific for *Toxoplasma gondii* in Pregnancy 12 Years after Primary Toxoplasma Infection. **Gynecol Obstet Invest**, n. 31, p. 182–184, 1991.

BÖGER, R. H. *et al.* Cardiovascular Disease and Mortality in the Community. v. 119, n. 12, p. 1592–1600, 2010.

BOHNE, W.; HEESEMANN, J.; GROSS, U. W. E. Reduced Replication of *Toxoplasma gondii* Is Necessary for Induction of Bradyzoite-Specific Antigens: a Possible Role for Nitric Oxide in Triggering Stage Conversion. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 5, p. 1761–1767, 1994.

BOSSI, P. *et al.* *Toxoplasma gondii*-associated Guillain-Barre syndrome in an immunocompetent patient. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 12, p. 3724–3725, 1998.

BRADLEY, P. J. *et al.* Proteomic analysis of rhoptry organelles reveals many novel constituents for host-parasite interactions in *Toxoplasma gondii*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 40, p. 34245–34258, 2005.

BREIER, G. Angiogenesis in embryonic development - A review. **Placenta**, v. 21, n. SUPPL.1, p. 11–15, 2000.

BRENIER-PINCHART, M. *et al.* The *Toxoplasma* surface protein SAG1 triggers efficient in vitro secretion of chemokine ligand 2 (CCL2) from human fibroblasts. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 254–261, 2006.

BROOKS, J. M. *et al.* *Toxoplasma gondii* Infections Alter GABAergic Synapses and Signaling in the Central Nervous System. **mBio**, v. 6, n. 6, p. e01428-15, 2015.

BRUCE, A. *et al.* **Molecular Biology of The Cell**. sixth ed. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, 2015.

BURKE, S. M. *et al.* Human mast cell activation with virus-associated stimuli leads to the selective chemotaxis of natural killer cells by a CXCL8-dependent mechanism. **Blood**, v. 111, n. 12, p. 5467–5476, 2008.

BUSCHOW, S. I. *et al.* MHC class II-associated proteins in B-cell exosomes and potential functional implications for exosome biogenesis. **Immunology and Cell**

Biology, v. 88, n. 8, p. 851–856, 2010.

BYRNE, K. J. O. *et al.* Vascular endothelial growth factor, platelet-derived endothelial cell growth factor and angiogenesis in non-small-cell lung cancer. **British Journal of Cancer**, v. 82, n. 8, p. 1427–1432, 2000.

CALVERT, J. K. *et al.* Dengue Virus Infection of Primary Endothelial Cells in Endothelial Cells Function and Is Restricted by Interferon-Stimulated Responses. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 00, n. 00, p. 1–12, 2015.

CAÑEDO-SOLARES, I. *et al.* Endothelial cell invasion by *Toxoplasma gondii*: differences between cell types and parasite strains. **Parasitol Res.**, v. 112, n. 8, p. 3029–3033, 2013.

CARME, B. *et al.* Severe Acquired Toxoplasmosis in Immunocompetent Adult Patients in French Guiana. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 11, p. 4037–4044, 2002.

CASIRAGHI, C.; DOROVINI-ZIS, K.; HORWITZ, M. S. Epstein-Barr virus infection of human brain microvessel endothelial cells: A novel role in multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 230, n. 1–2, p. 173–177, 2011.

CHARGAFF, E.; RANDOLPH, W. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. **J Biol Chem.**, v. 166, n. 1, p. 189–197, 1946.

CHEN, M. *et al.* Transcriptome and long noncoding RNA sequencing of three extracellular vesicle subtypes released from the human colon cancer LIM1863 cell line. **Nature Publishing Group**, n. November, p. 1–14, 2016.

CHOI, J. W. *et al.* Secretable Small RNAs via Outer Membrane Vesicles in Periodontal Pathogens. **Journal of Dental Research**, v. 96, n. 4, p. 458–466, 2017.

CLOUGH, B. *et al.* K63-Linked Ubiquitination Targets *Toxoplasma gondii* for Endolysosomal Destruction in IFN γ - Stimulated Human Cells. **PLoS Pathogens**, p. 1–25, 2016.

COCUCCI, E.; MELDOLESI, J. Ectosomes and exosomes: Shedding the confusion between extracellular vesicles. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 6, p. 364–72, 2015.

COCUCCI, E.; RACCHETTI, G.; MELDOLESI, J. Shedding microvesicles: artefacts no more. **Trends in Cell Biology**, v. 19, n. 2, p. 43–51, 2009.

CONTI, F.; BARTOLUCCI, F. Angiopoietin-1 Reduces VEGF-Stimulated Leukocyte Adhesion to Endothelial Cells by Reducing ICAM-1, VCAM-1, and E-Selectin Expression. **Geobotany Studies**, p. 17–18, 2015.

COPPIN, A. *et al.* Evolution of plant-like crystalline storage polysaccharide in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* argues for a red alga ancestry. **Journal of Molecular Evolution**, v. 60, n. 2, p. 257–267, 2005.

COUILLARD, C. *et al.* Circulating Levels of Oxidative Stress Markers and Endothelial Adhesion Molecules in Men with Abdominal Obesity. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 90, n. 12, p. 6454–6459, 2005.

CUVILLIER-HOT, V. *et al.* Characterization and immune function of two intracellular

- sensors, HmTLR1 and HmNLR, in the injured CNS of an invertebrate. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, n. 2, p. 214–226, 2011.
- DACHER, M. *et al.* Incorporation and influence of *Leishmania* histone H3 in chromatin. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. 22, p. 11637–11648, 2019.
- DAI, Z. L. *et al.* L-Glutamine regulates amino acid utilization by intestinal bacteria. **Amino Acids**, v. 45, n. 3, p. 501–512, 2013.
- DALVI, P. *et al.* Immune activated monocyte exosomes alter microRNAs in brain endothelial cells and initiate an inflammatory response through the TLR4/MyD88 pathway. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.
- DÄUBENER, W. *et al.* Restriction of *Toxoplasma gondii* growth in human brain microvascular endothelial cells by activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 10, p. 6527–6531, 2001.
- DAVIDSON, B. C.; HAGGAN, J. Dietary polyenoic fatty acids change the response of cat blood platelets to inductions of aggregation by ADP. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 39, n. 1, p. 31–37, 1990.
- DEBIERRE-GROCKIEGO, F. *et al.* Activation of TLR2 and TLR4 by Glycosylphosphatidylinositols Derived from *Toxoplasma gondii*. **J Immunol**, n. 179, p. 1129–1137, 2007.
- DEBRAH, A. Y. *et al.* Plasma vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) and VEGF-A gene polymorphism are associated with hydrocele development in lymphatic filariasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 4, p. 601–608, 2007.
- DEJANA, E. Endothelial cell-cell junctions: Happy together. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 4, p. 261–270, 2004.
- DHANABAL, M. *et al.* Endostatin induces endothelial cell apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 17, p. 11721–11726, 1999.
- DIETZ, H. H. *et al.* Toxoplasmosis in a colony of New World monkeys. **Veterinary Parasitology**, v. 68, n. 4, p. 299–304, 1997.
- DINCEL, G. C.; ATMACA, H. T. Nitric oxide production increases during *Toxoplasma gondii* encephalitis in mice. **Experimental Parasitology**, v. 156, p. 104–112, 2015.
- DINCEL, G. C.; ATMACA, H. T. Increased expressions of ADAMTS-13 and apoptosis contribute to neuropathology during *Toxoplasma gondii* encephalitis in mice. **Neuropathology**, v. 36, n. 3, p. 211–226, 2016.
- DOR, Y. *et al.* A novel role for VEGF in endocardial cushion formation and its potential contribution to congenital heart defects. **Development**, v. 128, n. 9, p. 1531–1538, 2001.
- DRENJANCEVIC, I. *et al.* The Markers of Endothelial Activation, Endothelial Dysfunction - Old Concepts and New Challenges. **IntechOpen**, v. i, p. 391–417, 2018.

- DUAN, M. *et al.* HIV Tat Induces Expression of ICAM-1 in HUVECs: Implications for miR-221/-222 in HIV-Associated Cardiomyopathy. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. 1–11, 2013.
- DUBEY, J. Bradyzoite-Induced Murine Toxoplasmosis: Stage Conversion, Pathogenesis, and Tissue Cyst Formation in Mice Fed Bradyzoites of - Different Strains of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 592–602, 2007.
- DUBEY, J. P. Isolation of *Toxoplasma gondii* from a Naturally Infected Beef Cow. **The Journal of Parasitology**, v. 78, n. 1, p. 151, 1992.
- DUBEY, J. P. *et al.* Oocyst-Induced Murine Toxoplasmosis: Life Cycle, Pathogenicity, and Stage Conversion in Mice Fed *Toxoplasma gondii* Oocysts. **The Journal of Parasitology**, v. 83, n. 5, p. 870, 1997.
- DUBEY, J. P. The History of *Toxoplasma gondii* —The First 100 Years. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 55, n. 6, p. 467–475, 2008.
- DUBEY, J. P. *et al.* Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil : high prevalence , high burden of disease , and epidemiology †. **Parasitology**, v. 139, p. 1375–1424, 2012.
- DUBEY, J. P.; MILLER, N. L.; FRENKEL, J. K. Characterization of the New Fecal Form of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of parasitology**, v. 56, n. 3, p. 447–456, 1970.
- DUBEY, J. P.; SU, C. Population biology of *Toxoplasma gondii*: what ' s out and where did they come from. v. 104, n. March, p. 190–195, 2009.
- EBERT, L. M. *et al.* A non-canonical role for desmoglein-2 in endothelial cells : implications for neoangiogenesis. **Angiogenesis**, v. 19, n. 4, p. 463–486, 2016.
- ERJEFÄLT, J. S. *et al.* Degranulation patterns of eosinophil granulocytes as determinants of eosinophil driven disease. **Thorax**, v. 56, n. 5, p. 341–344, 2001.
- EUGENIN, E. A. *et al.* HIV-1 tat protein induces a migratory phenotype in human fetal microglia by a CCL2 (MCP-1)-dependent echanism: Possible role in NeuroAIDS. **Glia**, v. 49, n. 4, p. 501–510, 2005.
- FABBRI, C. *et al.* Lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in *Plasmodium vivax* malaria patients evolving with cholestatic jaundice. **Malaria Journal**, v. 12, n. 1, p. 1–7, 2013.
- FAITH, J. T.; SUROVELL, T. A. Synchronous extinction of North America's Pleistocene mammals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 49, p. 20641–20645, 2009.
- FERGUSON, D. J. P. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008 , homage to Nicolle , Manceaux and Splendore. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. March, p. 133–148, 2009.
- FRENTZOU, G. A. *et al.* IL-1 β down-regulates ADAMTS-13 mRNA expression in cells of the central nervous system. **Journal of molecular neuroscience : MN**, v.

46, n. 2, p. 343–351, 2012.

FRY, T. J. *et al.* A potential role for interleukin-7 in T-cell homeostasis. **Blood**, v. 97, n. 10, p. 2983–2991, 2019.

FUJITA, K. *et al.* Expression of Tumor Necrosis Factor- α in Cultured Human Endothelial Cells Stimulated With Lipopolysaccharide or Interleukin-1 α . **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 20, n. 2, p. 410–415, 2011.

FURTADO, J. M. *et al.* *Toxoplasma gondii* tachyzoites cross retinal endothelium assisted by intercellular adhesion molecule-1 in vitro. **Immunology and Cell Biology**, v. 90, n. 9, p. 912–915, 2012.

GARCIA-SILVA, M. R. *et al.* Gene Expression Changes Induced by Trypanosoma cruzi Shed Microvesicles in Mammalian Host Cells: Relevance of tRNA-Derived Halves. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–11, 2020.

GAZZINELLI, R. T. *et al.* induction of interferon γ by an intracellular parasite and. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 90, n. July, p. 6115–6119, 1993.

GENOVA, B. M. DI *et al.* Intestinal delta-6-desaturase activity determines host range for Toxoplasma sexual reproduction. **PLoS Biology**, v. 17, n. 8, p. 1–19, 2019.

GERSZTEN, R. E. *et al.* MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. **Nat**, v. 398, n. April, p. 718–723, 1999.

GRETHE, S. *et al.* p38 MAPK mediates TNF-induced apoptosis in endothelial cells via phosphorylation and downregulation of Bcl-xL. **Experimental Cell Research**, v. 298, n. 2, p. 632–642, 2004.

GROSS, S. S.; WOLIN, M. S. NITRIC OXIDE: Pathophysiological Mechanisms. **Annual Review of Physiology**, v. 57, p. 737–769, 1995.

GUBBELS, M. *et al.* High-Throughput Growth Assay for *Toxoplasma gondii* Using Yellow Fluorescent Protein. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 1, p. 309–316, 2003.

HARVEY, W. **Exercitatio Anatomica. De Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus**, 1628.

HEDMAN, K.; SEPPÄLÄ, I. Recent primary Toxoplasma infection indicated by a low avidity of specific IgG. **Journal of Clinical Immunology**, v. 8, n. 3, p. 214–221, 1988.

HEHL, A. B. *et al.* Asexual expansion of *Toxoplasma gondii* merozoites is distinct from tachyzoites and entails expression of non-overlapping gene families to attach, invade, and replicate within feline enterocytes. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 1–16, 2015.

HELMS, H. C. *et al.* In vitro models of the blood–brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 36, n. 5, p. 862–890, 2016.

HENKEL, J. S. *et al.* Presence of Dendritic Cells, MCP-1, and Activated Microglia/Macrophages in Amyotrophic Lateral Sclerosis Spinal Cord Tissue. **Annals of Neurology**, v. 55, n. 2, p. 221–235, 2004.

HERNANZ, R. *et al.* Toll-like receptor 4 contributes to vascular remodelling and endothelial dysfunction in angiotensin II-induced hypertension. **British Journal of Pharmacology**, 2015.

HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: Transmission, diagnosis, and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, n. 10, p. 634–640, 2002.

HIMBURG, H. A.; DOWD, S. E.; FRIEDMAN, M. H. Frequency-dependent response of the vascular endothelium to pulsatile shear stress. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 27708, p. 645–653, 2019.

HUANG, P. L. Mouse models of nitric oxide synthase deficiency. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 11, n. SUPPL. 16, p. 120–123, 2000.

HUE, S. *et al.* Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 11, p. 2473–2483, 2006.

HUNTER, C. A. *et al.* Production of Gamma Interferon by Natural Killer Cells from *Toxoplasma gondii*-Infected SCID Mice: Regulation by Necrosis Factor Alpha. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 7, p. 2818–2824, 1994.

HWANG, J. Y. *et al.* Reduced expression of angiotensin-1 in Hantaan virus-infected human umbilical vein endothelial cells increases their permeability. **Acta virologica**, v. 53, p. 7–13, 2009.

IBRAHIM, H. M. *et al.* *Toxoplasma gondii* Cyclophilin 18-Mediated Production of Nitric Oxide Induces Bradyzoite Conversion in a CCR5-Dependent Manner □. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 9, p. 3686–3695, 2009.

JAFFE, E. A. *et al.* Culture of Human Endothelial Cells Derived from Umbilical Veins. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 52, n. April, p. 2745–2756, 1973.

JIANG, C. *et al.* TNF- α induces vascular endothelial cells apoptosis through overexpressing pregnancy induced noncoding RNA in Kawasaki disease model. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 72, p. 118–124, 2016.

JIANG, L. *et al.* conformation of soluble PECAM-1 , an endothelial marker. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 77, p. 102–108, 2016.

JIANG, S. *et al.* A C1q domain containing protein from *Crassostrea gigas* serves as pattern recognition receptor and opsonin with high binding affinity to LPS. **Fish and Shellfish Immunology**, n. May, p. 1–9, 2015.

JIANG, Y. *et al.* Irbesartan attenuates TNF- α -induced ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin expression through suppression of NF- κ B pathway in HUVECs. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 19, n. 17, p. 3295–3302, 2015.

JONG, A. *et al.* Infectomic Analysis of Gene Expression Profiles of Human Brain

- Microvascular Endothelial Cells Infected with *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2008, 2008.
- JONG, O. G. DE *et al.* Cellular stress conditions are reflected in the protein and RNA content of endothelial cell- derived exosomes. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. Apr 16, n. 1, p. 1–12, 2012.
- KIM, M. J. *et al.* Exosomes secreted by *Toxoplasma gondii*-infected L6 cells: Their effects on host cell proliferation and cell cycle changes. **Korean Journal of Parasitology**, v. 54, n. 2, p. 147–154, 2016.
- KIM, S. H. *et al.* Functional characterization of a delta 6-desaturase gene from the black seabream (*Acanthopagrus schlegeli*). **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 6, p. 1185–1193, 2011.
- KITA-TOKARCZYK, K. *et al.* Block copolymer vesicles - Using concepts from polymer chemistry to mimic biomembranes. **Polymer**, v. 46, n. 11, p. 3540–3563, 2005.
- KLOSE, C. S. N.; ARTIS, D. Innate lymphoid cells as regulators of immunity , inflammation and tissue homeostasis. **Nature Immunology**, v. 17, n. 7, p. 765–774, 2016.
- KNIGHT, B. C. *et al.* The effect of *Toxoplasma gondii* infection on expression of chemokines by rat retinal vascular endothelial cells. **Journal of Neuroimmunology**, v. 160, n. 1–2, p. 41–47, 2005.
- KONRADT, C. *et al.* Endothelial cells are a replicative niche for entry of *Toxoplasma gondii* to the central nervous system. **Nature Microbiology**, v. 1, n. 3, p. 1–8, 2016.
- KRÜLL, M. *et al.* Signal transduction pathways activated in endothelial cells following infection with *Chlamydia pneumoniae*. **Journal of Immunology**, v. 162, n. 8, p. 4834–4841, 1999.
- KRUZEL, M. L. *et al.* Lactoferrin protects gut mucosal integrity during endotoxemia induced by lipopolysaccharide in mice. **Inflammation**, v. 24, n. 1, p. 33–44, 2000.
- LACHENMAIER, S. M. *et al.* Intracellular transport of *Toxoplasma gondii* through the blood-brain barrier. **Journal of Neuroimmunology**, v. 232, n. 1–2, p. 119–130, 2011.
- LACOUR, A. G. *et al.* Procalcitonin, IL-6, IL-8, IL-1 receptor antagonist and C-reactive protein as identifiers of serious bacterial infections in children with fever without localising signs. **European Journal of Pediatrics**, v. 160, n. 2, p. 95–100, 2001.
- LARRAÑAGA, G. F. DE *et al.* Viral load and disease progression as responsible for endothelial activation and/or injury in human immunodeficiency virus-1-infected patients. **Blood Coagulation and Fibrinolysis**, v. 14, n. 1, p. 15–18, 2003.
- LAVINE, M. D.; ARRIZABALAGA, G. Induction of mitotic S-phase of host and neighboring cells by *Toxoplasma gondii* enhances parasite invasion. **Mol Biochem Parasitol**, v. 164, n. 1, p. 95–99, 2009.

- LÁZARO-IBÁÑEZ, E. *et al.* Different gDNA Content in the Subpopulations of Prostate Cancer Extracellular Vesicles : Apoptotic Bodies , Microvesicles , and Exosomes. **The Prostate**, v. 74, n. 14, p. 1379–1390, 2014.
- LEAL, F. E. *et al.* *Toxoplasma gondii* Pneumonia in Immunocompetent Subjects: Case Report and Review. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 6, p. e62–e66, 2007.
- LÉDÉE-BATAILLE, N. *et al.* Role of the endometrial tripod interleukin-18, -15, and -12 in inadequate uterine receptivity in patients with a history of repeated in vitro fertilization-embryo transfer failure. **Fertility and Sterility**, v. 83, n. 3, p. 598–605, 2005.
- LEE, J. *et al.* Staphylococcus aureus extracellular vesicles carry biologically active β -lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 6, p. 2589–2595, 2013.
- LEHMANN, U. *et al.* SHP2 and SOCS3 contribute to Tyr-759-dependent attenuation of interleukin-6 signaling through gp130. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 1, p. 661–671, 2003.
- LÉLU, M. *et al.* Quantitative estimation of the viability of *Toxoplasma gondii* oocysts in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 15, p. 5127–5132, 2012.
- LENG, J. *et al.* *Toxoplasma gondii* Prevents Chromatin Remodeling Initiated by TLR-Triggered Macrophage Activation. **The Journal of Immunology**, n. 182, p. 489–497, 2020.
- LI, P. *et al.* MicroRNA-30c-5p inhibits NLRP3 inflammasome-mediated endothelial cell pyroptosis through FOXO3 down-regulation in atherosclerosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 503, n. 4, p. 2833–2840, 2018.
- LI, P.; WU, H. L.; DONG, B. H. Relationship between TLR4 and CCL2 expression and recurrent spontaneous abortion. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 1, p. 1–8, 2016.
- LI, YE *et al.* Chronic *Toxoplasma gondii* Infection Induces Anti-N-Methyl-DAspartate Receptor Autoantibodies and Associated Behavioral Changes and Neuropathology. **Infection and Immunity**, v. 86, n. 10, p. 1–12, 2018.
- LI, YAWEN; LIU, Y.; *et al.* Characterization of exosomes derived from *Toxoplasma gondii* and their functions in modulating immune responses. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 467–477, 2018.
- LI, YE *et al.* Persistent toxoplasma infection of the brain induced neurodegeneration associated with activation of complement and microglia. **Infection and Immunity**, v. 87, n. 8, p. 1–12, 2019.
- LI, YANG *et al.* MicroRNA-122 promotes endothelial cell apoptosis by targeting XIAP: Therapeutic implication for atherosclerosis. **Life Sciences**, v. 232, n. 261, p. 116590, 2019.
- LI, Y.; ZHOU, H. Moving towards improved vaccines for *Toxoplasma gondii*. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 00, n. 00, p. 1–8, 2017.

LI, YAWEN; XIU, F.; *et al.* Exosomes derived from *Toxoplasma gondii* stimulate an inflammatory response through JNK signaling pathway. **Nanomedicine**, v. 13, n. 10, p. 1157–1168, 2018.

LIAO, Z. *et al.* Serum extracellular vesicle depletion processes affect release and infectivity of HIV-1 in culture. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

LIENENLÜKE, B. *et al.* CD154 stimulation of interleukin-12 synthesis in human endothelial cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 30, p. 2864–2870, 2000.

LIU, M. *et al.* The endothelial cell receptor GRP78 is required for mucormycosis pathogenesis in diabetic mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 6, p. 1914–1924, 2010.

LIU, Y. *et al.* Hepatitis C Virus Infection Induces Elevation of CXCL10 in Human Brain Microvascular Endothelial Cells. **Journal of Medical Virology**, n. February, p. 1–8, 2016.

LOBB, R. J. *et al.* Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. **Journal of Extracellular Vesicles**, 2015.

LOPES PINHEIRO, M. A. *et al.* Internalization and presentation of myelin antigens by the brain endothelium guides antigen-specific T cell migration. **eLife**, v. 5, n. JUN2016, p. 1–12, 2016.

LUO, Q. *et al.* Analysis of the glycoproteome of *Toxoplasma gondii* using lectin affinity chromatography and tandem mass spectrometry. **Microbes and Infection**, v. 13, n. 14–15, p. 1199–1210, 2011.

MAAS, S. L. N. *et al.* Possibilities and limitations of current technologies for quantification of biological extracellular vesicles and synthetic mimics. **Journal of Controlled Release**, 2015.

MACFADDEN, B. J. Extinct mammalian biodiversity of the ancient New World tropics. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 21, n. 3, p. 157–165, 2006.

MAGERL, M. *et al.* Non-pathogenic commensal *Escherichia coli* bacteria can inhibit degranulation of mast cells. **Experimental Dermatology**, v. 17, n. 5, p. 427–435, 2008.

MAGNESS, R. R. *et al.* Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries . V . Effects of ovariectomy , the ovarian cycle , and pregnancy on prostacyclin synthase expression. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 60, p. 103–118, 2000.

MAKÓ, V. *et al.* Proinflammatory activation pattern of human umbilical vein endothelial cells induced by IL-1 β , TNF- α , and LPS. **Cytometry Part A**, v. 77, n. 10, p. 962–970, 2010.

MALDONADO, Y. A.; READ, J. S. Diagnosis, Treatment, and Prevention of Congenital Toxoplasmosis in the United States. **Pediatrics**, v. 139, n. 2, p. e20163860, 2017.

MALKIN, H. M. Julius Cohnheim (1839 — 1884) His Life and Contributions to

- Pathology. **Annal of Clinical and Laboratory Science**, v. 14, n. 5, p. 335–342, 1984.
- MARKETON, M. M. *et al.* Microbiology: Plague bacteria target immune cells during infection. **Science**, v. 309, n. 5741, p. 1739–1741, 2005.
- MCGEACHY, M. J. *et al.* TGF- β and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain TH-17 cell-mediated pathology. **Nature Immunology**, v. 8, n. 12, p. 1390–1397, 2007.
- MEERLOO, J. VAN; KASPERS, G. J. L.; CLOOS, J. **Cancer Cell Culture: the MTT assay**. [s.l.: s.n.]. v. 731
- MELO, E. J. L.; ATTIAS, M.; SOUZA, W. DE. The single mitochondrion of tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Structural Biology**, v. 130, n. 1, p. 27–33, 2000.
- MERCER, D. F. *et al.* Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. **Nature Medicine**, v. 7, n. 8, p. 927–933, 2001.
- MINOT, S. *et al.* Admixture and recombination among *Toxoplasma gondii* lineages explain global genome diversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 33, p. 13458–13463, 2012.
- MITSUKA-BREGANÓ, R.; LOPES-MORI, F. R. M.; NAVARRO, I. T. **Toxoplasmose adquiridana gestação e congênita**. [s.l.: s.n.].
- MONTOYA, J. G.; REMINGTON, J. S. Clinical Practice: Management of *Toxoplasma gondii* Infection during Pregnancy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, n. 4, p. 554–566, 2008.
- MORAES, L. M. DE B. *et al.* Occurrence of anti-Neospora caninum and anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies in goats and sheep in western Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 4, p. 312–317, 2011.
- MOTYKA, B. *et al.* Mannose 6-Phosphate / Insulin-like Growth Factor II Receptor Is a Death Receptor for Granzyme B during Cytotoxic T Cell – Induced Apoptosis. **Cell**, v. 103, p. 491–500, 2000.
- MÜLLBERG, J. *et al.* IL-6 Receptor Independent Stimulation of Human gp130 by Viral IL-6. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 9, p. 4672–4677, 2000.
- MURO, S.; SCHUCHMAN, E. H.; MUZYKANTOV, V. R. Lysosomal Enzyme Delivery by ICAM-1-Targeted Nanocarriers Bypassing Glycosylation- and Clathrin-Dependent Endocytosis. **Molecular Therapy**, v. 13, n. 1, p. 135–141, 2006.
- NAZARENKO, I. *et al.* Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation. **Cancer Research**, v. 70, n. 4, p. 1668–1678, 2010.
- NIKOLSKAIA, O. V. *et al.* Blood-brain barrier traversal by African trypanosomes requires calcium signaling induced by parasite cysteine protease (Journal of Clinical Investigation (2006) 116, (2739-2747) DOI:10.1172/JCI27798). **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 5, p. 1974, 2008.

- NUNEZ, E. A.; WALLIS, J.; GERSHON, M. D. Secretory processes in follicular cells of the bat thyroid 111. The occurrence of extracellular vesicles and colloid droplets during arousal from hibernation. **Am. J. ANAT.**, n. 141, p. 179–202, 1974.
- O'LEARY, J. G. *et al.* T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. **Nature Immunology**, v. 7, n. 5, p. 507–516, 2006.
- OLDENHOVE, G. *et al.* Article Decrease of Foxp3 + Treg Cell Number and Acquisition of Effector Cell Phenotype during Lethal Infection. **Immunity**, v. 31, n. 5, p. 772–786, 2009.
- PECE, S.; GUTKIND, J. S. Signaling from E-cadherins to the MAPK pathway by the recruitment and activation of epidermal growth factor receptors upon cell-cell contact formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 52, p. 41227–41233, 2000.
- PÉREZ-CREMADES, D. *et al.* Extracellular histones disarrange vasoactive mediators release through a COX-NOS interaction in human endothelial cells. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 21, n. 8, p. 1584–1592, 2017.
- PETERSEN, E. *et al.* European Multicenter Study of the LIAISON Automated Diagnostic System for Determination of *Toxoplasma gondii* -Specific Immunoglobulin G (IgG) and IgM and the IgG Avidity Index. **Parasitology**, v. 43, n. 4, p. 1570–1574, 2005.
- PETERSEN, S. V. *et al.* Control of the classical and the MBL pathway of complement activation. **Molecular Immunology**, v. 37, n. 2000, p. 803–811, 2001.
- PETERSON, D. B. *et al.* Comparative proteomic analysis of PAI-1 and TNF-alpha-derived endothelial microparticles. **Proteomics**, v. 8, n. 12, p. 2430–2446, 2008.
- PFAFF, A. W. *et al.* Impact of foetus and mother on IFN- γ -induced indoleamine 2,3-dioxygenase and inducible nitric oxide synthase expression in murine placenta following *Toxoplasma gondii* infection. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 2, p. 249–258, 2008.
- PINO, P. *et al.* *Plasmodium falciparum* -Infected Erythrocyte Adhesion Induces Caspase Activation and Apoptosis in Human Endothelial Cells . **The Journal of Infectious Diseases**, v. 187, n. 8, p. 1283–1290, 2003.
- POPE, S. M.; LÄSSER, C. *Toxoplasma gondii* infection of fibroblasts causes the production of exosome-like vesicles containing a unique array of mRNA and miRNA transcripts compared to serum starvation. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 1, p. 1–8, 2013.
- PRANDOVSKY, E. *et al.* The neurotropic parasite *Toxoplasma gondii* increases dopamine metabolism. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, 2011.
- RADKE, J. R. *et al.* A change in the premitotic period of the cell cycle is associated with bradyzoite differentiation in *Toxoplasma gondii*. **Molecular and Biochemical Microbiology**, v. 131, p. 119–127, 2003.
- RAMIREZ, M. I. *et al.* Technical challenges of working with extracellular vesicles. **Nanoscale**, v. 10, n. 3, p. 881–906, 2018.

- RECKLINGHAUSEN, F. D. VON. FRIEDRICH DANIEL VON RECKLINGHAUSEN (1833-1910). **Journal Storage**, p. 872–875, 1898.
- REGEV-RUDZKI, N. *et al.* Cell-cell communication between malaria-infected red blood cells via exosome-like vesicles. **Cell**, v. 153, n. 5, p. 1120–1133, 2013.
- RIEDEL, G.; PLATT, B.; MICHEAU, J. Glutamate receptor function in learning and memory. **Behavioural Brain Research**, v. 140, p. 1–47, 2003.
- ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. **Clin Microbiol Rev**, v. 25, n. 2, p. 264–296, 2012.
- RODRIGUES, M. L. *et al.* Extracellular Vesicles Produced by *Cryptococcus neoformans* Contain Protein Components Associated with Virulence. **Eukariotic Cell**, v. 7, n. 1, p. 58–67, 2008.
- ROSEN, H.; CROWLEY, J. R.; HEINECKE, J. W. Human neutrophils use the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system to chlorinate but not nitrate bacterial proteins during phagocytosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 34, p. 30463–30468, 2002.
- RUST, N. M. *et al.* Bradykinin enhances Sindbis virus infection in human brain microvascular endothelial cells. **Virology**, v. 422, n. 1, p. 81–91, 2012.
- SABIN, A. B.; OLITSKY, P. K. Toxoplasma and Obligate Intracellular Parasitism. **Science**, v. 85, n. 2205, p. 336–338, 1937.
- SAHU, A.; LAMBRIS, J. D. Structure and biology of complement protein C3 , a connecting link between innate and acquired immunity. **Immunological Reviews**, v. 180, p. 35–48, 2001.
- SANDERS, P. W. Salt Intake, Endothelial Cell Signaling, and Progression of Kidney Disease. **Hypertension**, v. 43, n. 2 I, p. 142–146, 2004.
- SASAI, M.; PRADIPTA, A.; YAMAMOTO, M. Host immune responses to *Toxoplasma gondii*. **International Immunology**, n. February, p. 3–9, 2018.
- SASONGKO, M. B. *et al.* Research: Complications Circulating markers of inflammation and endothelial function , and their relationship to diabetic retinopathy. **Diabetic Medicine**, v. 32, n. 5, p. 686–691, 2014.
- SAWYER, A. J. *et al.* The effect of inflammatory cell-derived MCP-1 loss on neuronal survival during chronic neuroinflammation. **Biomaterials**, v. 35, n. 25, p. 6698–6706, 2014.
- SCHARTON-KERSTEN, T. M. *et al.* Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 185, n. 7, p. 1261–1273, 1997.
- SCHOERGENHOFER, C. *et al.* Inhibition of Protease-Activated Receptor (PAR1) Reduces Activation of the Endothelium, Coagulation, Fibrinolysis and Inflammation during Human Endotoxemia. **Thrombosis and Haemostasis**, 2018.
- SEDDER, L. M. *et al.* Poxvirus Tumor Necrosis Factor Receptor (TNFR)-Like T2

- Proteins Contain a Conserved Preligand Assembly Domain That Inhibits Cellular TNFR1-Induced Cell Death. **Journal of Virology**, v. 80, n. 18, p. 9300–9309, 2006.
- SERBINA, N. V. *et al.* TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. **Immunity**, v. 19, n. 1, p. 59–70, 2003.
- SEVERANCE, E. G. *et al.* Complement C1q formation of immune complexes with milk caseins and wheat gluteins in schizophrenia. **Neurobiology of Disease**, v. 48, n. 3, p. 447–453, 2012.
- SIBLEY, L. D.; BOOTHROYD, J. C. Virulent Strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. **Nature**, v. 359, p. 710–713, 1992.
- SIKORSKI, P. M.; COMMODARO, A. G.; GRIGG, M. E. *Toxoplasma gondii* Recruits Factor H and C4b-Binding Protein to Mediate Resistance to Serum Killing and Promote Parasite Persistence in vivo. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. January, p. 1–16, 2020.
- SILVA, M. G. DA; VINAUD, M. C.; CASTRO, A. M. DE. Prevalence of toxoplasmosis in pregnant women and vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in patients from basic units of health from Gurupi, Tocantins, Brazil, from 2012 to 2014. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, p. 1–15, 2015.
- SILVA, S. N.; LIMA, M. G. Scientia Medica. **Scientia Medica**, v. 27, n. 3, p. 6, 2017.
- SILVA, V. O. *et al.* Extracellular vesicles isolated from *Toxoplasma gondii* induce host immune response. **Parasite Immunology**, v. 40, n. 9, p. 0–3, 2018.
- SKARIAH, S.; MCINTYRE, M. K.; MORDUE, D. G. *Toxoplasma gondii*: Determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. **Parasitology Research**, v. 107, n. 2, p. 253–260, 2010.
- SMYTHIES, L. E. *et al.* Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 1, p. 66–75, 2005.
- SOLDATI, D.; DUBREMETZ, J. F.; LEBRUN, M. Microneme proteins: Structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 12, p. 1293–1302, 2001.
- STURGE, C. R. *et al.* TLR-independent neutrophil-derived IFN- γ is important for host resistance to intracellular pathogens. **PNAS**, v. 110, n. 26, p. 10711–10716, 2013.
- SU, C. *et al.* Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. **Science**, v. 299, n. 5605, p. 414–416, 2003.
- TABET, F. *et al.* HDL-transferred microRNA-223 regulates ICAM-1 expression in endothelial cells. **Nature Communications**, v. 5, p. 1–14, 2014.
- TAKUMI, K.; JONGE, R. DE; HAVELAAR, A. Modelling inactivation of *Escherichia coli* by low pH: Application to passage through the stomach of young and elderly people. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 6, p. 935–943, 2000.

- TAMAS, I. *et al.* 50 Million Years of Genomic Stasis in Endosymbiotic Bacteria. **Science**, v. 28, n. 296(5577), p. 2376–2379, 2002.
- TAN, M. *et al.* Hydrocortisone-conjugated glycine inhibits TNF- α induced inflammatory response through glucocorticoids receptor independent mechanism in human umbilical vein endothelial cells. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 10, n. 6, p. 9047–9055, 2017.
- TANOMMAN, S. *et al.* Characterization of fatty acid delta-6 desaturase gene in Nile tilapia and heterogenous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 166, n. 2, p. 148–156, 2013.
- TAYLOR, G. A. *et al.* p47 gtpases: regulators of immunity to intracellular pathogens. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. February, p. 100–109, 2004.
- THÉRY, C. *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**, v. 7, n. 1, p. 1–43, 2018.
- UMEZU, T. *et al.* Leukemia cell to endothelial cell communication via exosomal miRNAs. **Oncogene**, v. 32, n. 22, p. 2747–2755, 2013.
- UPHOFF, C. C.; DREXLER, H. G. Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal**, v. 38, n. 2, p. 79–85, 2002.
- VESTAD, B. *et al.* Size and concentration analyses of extracellular vesicles by nanoparticle tracking analysis: a variation study. **Journal of Extracellular Vesicles**, 2017.
- VIÑALS, F.; POUYSSÉGUR, J. Confluence of Vascular Endothelial Cells Induces Cell Cycle Exit by Inhibiting p42/p44 Mitogen-Activated Protein Kinase Activity. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, n. 4, p. 2763–2772, 1999.
- VOMUND, A. N.; MAJERUS, E. M. ADAMTS13 Bound to Endothelial Cells Exhibits Enhanced Cleavage of von Willebrand Factor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 45, p. 30925–30932, 2009.
- WAHEED, H. J. *et al.* Vascular Endothelial Growth Factor as Predictive Marker for Hypertension in Iraqi Adults Patients. **Mustansiriya Medical Journal**, v. 15, n. 2, p. 56–59, 2016.
- WALLON, M. *et al.* Congenital toxoplasma infection: Monthly prenatal screening decreases transmission rate and improves clinical outcome at age 3 years. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n. 9, p. 1223–1231, 2013.
- WASHINGTON, R. *et al.* Expression of immunologically relevant endothelial cell activation antigens on isolated central nervous system microvessels from patients with multiple sclerosis. **Annals of Neurology**, v. 35, n. 1, p. 89–97, 1994.
- WAUBEN, M. H. M. Extracellular Vesicles. **Encyclopedia of Cell Biology**, v. 2, p. 302–310, 2015.

- WEBSTER, J. P. Prevalence and transmission of *Toxoplasma gondii* in wild brown rats, *Rattus norvegicus*. **Parasitology**, v. 108, n. 4, p. 407–411, 1994.
- WILHELMS, D. B. *et al.* Deletion of Prostaglandin E2 Synthesizing Enzymes in Brain Endothelial Cells Attenuates Inflammatory Fever. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 35, p. 11684–11690, 2014.
- WÓJCIAK-STOTHARD, B. *et al.* Rho and Rac but not Cdc42 regulate endothelial cell permeability. **Journal of Cell Science**, v. 114, n. 7, p. 1343–1355, 2001.
- WONG, D.; DOROVINI-ZIS, K. Expression of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) by Human Brain Microvessel Endothelial Cells in Primary Culture. **Microvascular Research**, v. 49, p. 325–339, 1995.
- WOODMAN, J. P.; DIMIER, I. H.; BOUT, D. T. Human endothelial cells are activated by IFN-gamma to inhibit *Toxoplasma gondii* replication. Inhibition is due to a different mechanism from that existing in mouse macrophages and human fibroblasts. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 147, n. 6, p. 2019–23, 1991.
- WOWK, P. F. *et al.* Proteomic profiling of extracellular vesicles secreted from *Toxoplasma gondii*. **Proteomics**, v. 17, n. 15–16, p. 15–16, 2017.
- XI, H. *et al.* Caspase-1 Inflammasome Activation Mediates Homocysteine-Induced Pyrop-Apoptosis in Endothelial Cells. **Circulation Research**, v. 118, n. 10, p. 1525–1539, 2016.
- XIAO, J. *et al.* Cerebral complement C1q activation in chronic *Toxoplasma* infection. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 58, p. 52–56, 2016.
- YAMAMOTO, M. *et al.* A Cluster of Interferon- γ -Inducible p65 GTPases Plays a Critical Role in Host Defense against *Toxoplasma gondii*. **Immunity**, v. 3, n. 2, p. 302–313, 2011.
- YAMAMOTO, S. *et al.* Inflammation-induced endothelial cell-derived extracellular vesicles modulate the cellular status of pericytes. **Scientific Reports**, v. 5, n. 8505, p. 1–10, 2015.
- YAMASHITA, Y. M. *et al.* RAD18 and RAD54 cooperatively contribute to maintenance of genomic stability in vertebrate cells. **EMBO Journal**, v. 21, n. 20, p. 5558–5566, 2002.
- YONASHIRO, R. *et al.* Mutant SOD1 and Attenuates Mutant SOD1-induced Reactive Oxygen Species Generation. **Molecular Biology of the Cell**, v. 20, p. 4524–4530, 2009.
- ZHANG, X. *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1 induces endothelial cell apoptosis in vitro through a p53-dependent mitochondrial pathway. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**, v. 43, n. 10, p. 787–795, 2011.
- ZIA-ALI, N. *et al.* Molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from bird hosts. **Iranian Journal of Public Health**, v. 34, n. 3, p. 27–30, 2005.
- ZOVEIN, A. C. *et al.* Article Fate Tracing Reveals the Endothelial Origin of Hematopoietic Stem Cells. **Stem Cell**, v. 3, n. 6, p. 625–636, 2008.

APÊNDICE A – INICIADORES SELECIONADOS PARA QPCR

Apêndice A – Iniciadores selecionados para qPCR

Gene	Fragmento (pb)	Sequência (senso e antisenso)	Melting(°C)	Intron entre iniciadores
<i>ACTINAB</i>	224	5'- AGGATGCAGAAGGAGATCACT-3' 5'- GGGTGTAACGCAACTAAGTCATAG-3'	62,3 62,8	Sim
<i>ADAMTS13</i>	84	5'- CACAGGCCTCTCTTCACACA-3' 5'- GGTGTTAGGGGAGATGCTCA-3'	64,7 64,4	Sim
<i>ANG1</i>	99	5'- CAATGGGGGAGGTTGGACTGTA-3' 5'- GAGGGATTTCCAAAACCCATTTTAT-3'	69,2 66,6	Sim
<i>ANG2</i>	69	5'- ACGTGAGGATGGCAGCGTT-3' 5'- GAAGGGTTACCAAATCCCACCTTAT-3'	68,5 65,0	Sim
<i>ENOS</i>	235	5'- TGCTGGCATAACAGGACTCAG-3' 5'- AGCCCTTTGCTCTCAATGTC-3'	64,6 63,7	Sim
<i>GAPDH</i>	99	5'- GGCCTCCAAGGAGTAAGACC-3' 5'- GACTGAGTGTGGCAGGGACT-3'	64,2 64,9	Sim
<i>ICAM1</i>	217	5'- GGCCTCAGTCAGTGTGA-3' 5'- AACCCCATTCAGCGTCA-3'	58,9 63,4	Sim
<i>IL1A</i>	189	5'- ATCAGTACCTCACGGCTGCT-3' 5'- TGGGTATCTCAGGCATCTCC-3'	64,2 64,4	Sim
<i>IL1B</i>	132	5'- ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA -3' 5'- GTCGGAGATTCGTAGCTGGA -3'	64,5 64,7	Sim
<i>IL6</i>	149	5'- ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG-3' 5'- CCATCTTTGGAAGGTTTCAGGTTG-3'	62,5 63,5	Sim
<i>IL8</i>	229	5'- TCTGCAGCTCTGTGTGAAGG-3' 5'- ACTTCTCCACAACCCTCTGC-3'	65,0 63,7	Sim
<i>IL10RB</i>	183	5'- CTTAGCGGGGATGTCTGGAAC-3' 5'- TCCGTGGAGAGATGTGTAGGG-3'	64,1 64,6	Sim
<i>IL12P40</i>	282	5'- GTACTCCACATTCCTACTTCT-3' 5'- TTTGGGTCTATTCCGTTGTGT-3'	58,7 62,0	Sim
<i>Mycoplasma</i>	270	5'- GGGAGCAAACAGGATAGATACCCT -3' 5'- TGCACCATCTGTCACTCTGTAAACCTC -3'	66,4 70,2	Não
<i>SDC1</i>	71	5'- AGGACGAAGGCAGCTACTCCT-3' 5'- TTTGGTGGGCTTCTGGTAGG-3'	65,8 66,4	Sim

(continua)

(Conclusão)

Gene	Fragmento (pb)	Sequência (senso e antisenso)	Melting(°C)	Intron entre iniciadores
<i>SELECTINAE</i>	199	5'- ACTTCACCTGTGAGGAAGGCTTC-3'	67,1	Sim
		5'- GGTCCAGCTGTGAGTTCTCCTG-3'	67,7	
<i>SELECTINAP</i>	130	5'- CTGTTACCCTGGATTCTATGGGC -3'	66,7	Sim
		5'- GCTGCACTGCCAGTTAAAAGAG -3'	65,4	
<i>SOCS3</i>	109	5'- GGCCACTCTTCAGCATCTC-3'	63,1	Sim
		5'- ATCGTACTGGTCCAGGAACTC-3'	62,4	
<i>TNF</i>	272	5'- CTG GGCAGGTCTACTTTGGG-3'	64,0	Sim
		5'- CTGGAGGCCCCAGTTTGAAT-3'	64,3	
<i>VCAM1</i>	132	5'- AGTTGAAGGATGCGGGAGTA-3'	63,9	Sim
		5'- AGAGCACGAGAAGCTCAGGA-3'	64,9	
<i>VEGF</i>	81	5'- TGCAGATTATGCGGATCAAACC-3'	68,1	Sim
		5'- TGCATTCACATTTGTTGTGCTGTAG-3'	68,0	
<i>VWF</i>	305	5'-TCGGACCCTTATGACTTTGC-3'	64,3	Sim
		5'-TACAGCACCATTCCCTCCTG-3'	65,4	

Fonte: do autor, 2020.

APÊNDICE B – PROTEÍNAS EXCLUSIVAS DE TGVE

Apêndice B – Proteínas exclusivas de TGVE

ID	Proteína
A0A087WX92	Monocarboxylate transporter 7
F5H8K3	PHD finger protein 19
A0A0F7UY60	Proteína não caracterizada
A0A140T955	HLA class I histocompatibility antigen, A alpha chain
A0A494C0J7	Proteína não caracterizada
M0QZK8	Gamma-glutamylcyclotransferase
C9JR96	metallo-endopeptidase
C9JZ65	Serpin B4
H3BST5	Mitochondrial Rho GTPase 2
J3KPS3	Fructose-biphosphate aldolase A
P01834	Ig kappa chain C region
P04040	Catalase
P08133	Annexin A6
P11279	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1
P48741	Putative heat shock protein 70 kDa protein 7
P31949	Protein S100-A11
Q53FA3	HSPA1L
Q08554	Desmocollin-1
Q5T749	Keratinocyte proline-rich protein
Q5TBG5	Proteasome subunit beta
Q8WVV4	Protein POF1B
Q9NZM1	Myoferlin
V5B6B7	Proteína não caracterizada
V5BE23	Proteína não caracterizada

Fonte: do autor, 2020.

APÊNDICE C – PROTEÍNAS EXCLUSIVAS DE HBTGVE

Apêndice C. Proteínas exclusivas de HBTGVE

ID	Proteína
F8WBC0	Ras-related protein Rap-1A
F5H5G7	L-lactate dehydrogenase
A0A0A0MRQ5	Peroxiredoxin-2
C9J0D1	Histone H2A
F8W6P5	Hemoglobin subunit beta
A0A3B3ISJ8	CAP-Gly domain-containing linker protein 1
B9PNK6	Histone H4
F8WBR5	Calmodulin-2
C9JIS1	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2
D6R9X8	Integrin alpha-3
E7EX29	14-3-3 protein zeta/delta
E9PLJ3	Cofilin-2
I3L3F5	Unconventional myosin-Ic
F8WF27	Transmembrane 4 L6 family member 1
G3V4K2	GTPase KRas
I3L0Z8	Segment polarity protein dishevelled homolog DVL-2
U3KQK0	Histone H2B
P06702	Protein S100-A9
P62937	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A
Q01650	Large neutral amino acids transporter small subunit 1
Q96NT1	Nucleosome assembly protein 1-like 5
Q9C0D4	Zinc finger protein 518B
Q9HA90	EF-hand and coiled-coil domain-containing protein 1
Q9UGI0	Ubiquitin thioesterase ZRANB1
Q9Y5R8	Trafficking protein particle complex subunit 1
A0A1B0GVJ7	Proteína não caracterizada
V5BF03	Proteína não caracterizada

Fonte: do autor, 2020.

APÊNDICE D – PROTEÍNAS EXCLUSIVAS DE HUVE

Apêndice D – Proteínas exclusivas de HUVE.

ID.	Proteína
F5H6E2	Unconventional myosin-Ic
H3BNE1	Synaptosomal-associated protein 23
O00299	Chloride intracellular channel protein 1
O00622	CCN family member 1
O14672	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10
P19105	Myosin regulatory light chain 12A
O15427	Monocarboxylate transporter 4
O15511	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5
O43854	EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3
C9JZR2	Catenin delta-1
Q99880	Histone H2B type 1-L
O75083	WD repeat-containing protein 1
E7EN95	Filamin-B
F8VXD2	Cyclin-dependent kinase 4 (Fragment)
O95183	Vesicle-associated membrane protein 5
H0Y7N1	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 (Fragment)
B1AHF3	NADH-cytochrome b5 reductase 3 (Fragment)
A0A0A0MS07	Immunoglobulin heavy constant gamma 1 (Fragment)
A0A140T9S9	HLA class I histocompatibility antigen, B-46 alpha chain (Fragment)
P02452	Collagen alpha-1(I) chain
G3V0E5	Transferrin receptor (P90, CD71), isoform CRA
P04040	Catalase
E7EUT5	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
F8WE04	Heat shock protein beta-1
P05109	Protein S100-A8
P05121	Plasminogen activator inhibitor 1
F8VWV4	60S acidic ribosomal protein P0 (Fragment)
P05534	HLA class I histocompatibility antigen, A-24 alpha chain
P06702	Protein S100-A9
R4GN98	Protein S100 (Fragment)
A0A2R8Y6G6	Alpha-enolase
P07195	L-lactate dehydrogenase B chain
P07900	Heat shock protein HSP 90-alpha
H3BLV0	Complement decay-accelerating factor (Fragment)
F5GZS6	4F2 cell-surface antigen heavy chain
B0YJC4	Vimentin
F8VNT9	CD63 antigen (Fragment)
A8MX94	Glutathione S-transferase P
P09382	Galectin-1
D6R974	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase
C9J0D1	Histone H2A

(Continua)

(Continuação)

ID.	Proteína
J3QS39	Polyubiquitin-B (Fragment)
A0A140T975	HLA class I histocompatibility antigen, A-3 alpha chain
A0A1W2PRU9	HLA class I histocompatibility antigen, Cw-6 alpha chain
P11021	Endoplasmic reticulum chaperone BiP
E9PKE3	Heat shock cognate 71 kDa protein
H7C3P7	Ras-related protein Ral-A (Fragment)
P12429	Annexin A3
H9KV75	Alpha-actinin-1
H7BYV1	Interferon-induced transmembrane protein 2 (Fragment)
E9PMA9	Ribonuclease inhibitor
P13639	Elongation factor 2
A0A0A0MSQ0	Plastin-3
P14625	Endoplasmin
A0A0A0MSA9	Poliovirus receptor
P17066	Heat shock 70 kDa protein 6
P18077	60S ribosomal protein L35a
A8MUD9	60S ribosomal protein L7
E7ERY9	Calcium-transporting ATPase
P20073	Annexin A7
C9JB90	Ras-related protein Rab-6B (Fragment)
A0A087WWY3	Filamin-A
P21397	Amine oxidase [flavin-containing] A
E9PPJ5	Midkine (Fragment)
A6NNI4	Tetraspanin (CD9)
P23284	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B
H0YEU2	40S ribosomal protein S3 (Fragment)
E9PP50	Cofilin-1 (Fragment)
P26373	60S ribosomal protein L13
P27105	Erythrocyte band 7 integral membrane protein
E9PG15	14-3-3 protein theta (Fragment)
P27797	Calreticulin
P29992	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11
P30041	Peroxiredoxin-6
P30050	60S ribosomal protein L12
C9J0K6	Sorcin
Q5VSP4	Putative lipocalin 1-like protein 1
P31949	S100 calcium-binding protein A11
P32455	Guanylate-binding protein 1
I3L4X2	Multidrug resistance-associated protein 1 (Fragment)
A0A2R8Y804	Catenin beta-1
K7EJT5	60S ribosomal protein L22 (Fragment)
X6RJP6	Transgelin-2 (Fragment)
B4DKB2	Endothelin-converting enzyme 1
B5MCT8	40S ribosomal protein S9
P46940	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1

(Continua)

(Continuação)

ID.	Proteína
P47756	F-actin-capping protein subunit beta
C9JMA2	Mannan-binding lectin serine protease 1 (Fragment)
E7ESG1	Deoxyribonuclease-1-like 1 (Fragment)
P50281	Matrix metalloproteinase-14
E9PKH2	Serpin H1
E7EPB3	60S ribosomal protein L14
P50995	Annexin A11
P51148	Ras-related protein Rab-5C
C9IZZ0	Ras-related protein Rab-7a (Fragment)
K7EMN2	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating (Fragment)
F5H2R5	Rho GDP-dissociation inhibitor 2 (Fragment)
Q5T8R3	Monocarboxylate transporter 1 (Fragment)
P55072	Transitional endoplasmic reticulum ATPase
P60953	Cell division control protein 42 homolog
P61026	Ras-related protein Rab-10
P84077	ADP-ribosylation factor 1
E7ESV4	Ras-related protein Rap-1b (Fragment)
P61225	Ras-related protein Rap-2b
E7EX53	Ribosomal protein L15 (Fragment)
F8VV32	Lysozyme
P61981	14-3-3 protein gamma
P62070	Ras-related protein R-Ras2
Q5JR95	40S ribosomal protein S8
I3L3P7	40S ribosomal protein S15a
E9PS50	40S ribosomal protein S13 (Fragment)
P62701	40S ribosomal protein S4, X isoform
B4DV51	GTP-binding nuclear protein Ran
P62851	40S ribosomal protein S25
Q5JNZ5	Putative 40S ribosomal protein S26-like 1
P62873	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1
B8ZZK4	60S ribosomal protein L31
E9PP36	60S ribosomal protein L8
P62937	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A
Q1JUQ3	FK506 binding protein12
K7ENK9	Vesicle-associated membrane protein 2
P63092	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms short
P63104	14-3-3 protein zeta/delta
Q5VTE0	Putative elongation factor 1-alpha-like 3
Q9BQE3	Tubulin alpha-1C chain
P68366	Tubulin alpha-4A chain
A0A2R8Y7C0	Hemoglobin subunit alpha (Fragment)
P81605	Dermcidin
B1APP6	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, platelet type
Q01995	Transgelin
M0R0P7	60S ribosomal protein L18a

(Continua)

(Conclusão)

ID.	Proteína
Q02763	Angiotensin-1 receptor
Q04941	Proteolipid protein 2
G3V2P7	Kinesin light chain 1 (Fragment)
Q08554	Desmocollin-1
Q08752	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D
E7EPG1	Multimerin-1
Q9BVA1	Tubulin beta-2B chain
D6RDG0	Lysosome membrane protein 2
Q14344	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13
Q14520	Hyaluronan-binding protein 2
Q15404	Ras suppressor protein 1
Q2L6G8	Corneodesmosin
M0QXM4	Amino acid transporter
Q5VVH5	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1-binding protein 1
Q6UWP8	Suprabasin
F5H1C6	Fermitin family homolog 3 (Fragment)
Q8IWA5	Choline transporter-like protein 2
Q8N4B4	F-box only protein 39
Q92626	Peroxidasin homolog
H7C229	Cytoplasmic FMR1-interacting protein 2
A0A0A6YYA4	Coiled-coil domain-containing protein 7 (Fragment)
Q96P63	Serpin B12
Q96QV1	Hedgehog-interacting protein
Q96TA1	Protein Niban 2
F8VZB1	Extended synaptotagmin-1 (Fragment)
A0A0J9YXT0	ADP-ribosylation factor-like protein 6 (Fragment)
Q9H223	EH domain-containing protein 4
C9JDQ8	EH domain-containing protein 1 (Fragment)
Q9NZN4	EH domain-containing protein 2
Q9P2B2	Prostaglandin F2 receptor negative regulator
Q9UBI6	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-12
B7Z5J4	Carboxypeptidase A4
J3QS83	Band 4.1-like protein 3 (Fragment)
Q9Y490	Talin-1
Q9Y696	Chloride intracellular channel protein 4
E5RK69	Annexin

Fonte: do autor, 2020.

APÊNDICE E – PROTEÍNAS EXCLUSIVAS DE HUTGVE

Apêndice E – Proteínas exclusivas de HUTGVE.

ID	Proteína
E5RJ09	Erlin-2 (Fragment)
E7EQB2	Lactotransferrin (Fragment)
A0A1B0GW44	Cathepsin D
P07814	Bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase
F5GXS0	Complement C4-B
P22492	Histone H1t
P11279	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1
P15153	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2
P16401	Histone H1.5
C9JPM4	ADP-ribosylation factor 4 (Fragment)
J3KSJ0	60S ribosomal protein L17 (Fragment)
P21589	5-nucleotidase
P29279	CCN family member 2
H0Y5H9	Serpin B4 (Fragment)
P31946	14-3-3 protein beta/alpha
P32119	Peroxiredoxin-2
A0A087WUV8	Basigin
Q6NVV1	Putative 60S ribosomal protein L13a
P42766	60S ribosomal protein L35
H0YLP6	60S ribosomal protein L28
P47929	Galectin-7
A0A2R8Y5M6	B-cell receptor-associated protein 31
H0Y8L7	40S ribosomal protein S3a (Fragment)
J3QR17	60S ribosomal protein L26 (Fragment)
P61353	60S ribosomal protein L27
A0A2R8Y811	40S ribosomal protein S14 (Fragment)
K7ERG4	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2
P62424	60S ribosomal protein L7a
P62750	60S ribosomal protein L23a
P62913	60S ribosomal protein L11
J3QR09	Ribosomal protein L19
Q04917	14-3-3 protein eta
Q08188	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E
Q12907	Vesicular integral-membrane protein VIP36
Q15828	Cystatin-M
Q8NBS9	Thioredoxin domain-containing protein 5
Q99808	Equilibrative nucleoside transporter 1
H0YAB2	Plexin-D1 (Fragment)
M0QZK8	Proteína não caracterizada

Fonte: do autor, 2020.