

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
IMUNOLOGIA E DIP/GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

Pollianne Garbero Rampinelli

**EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO NO REPARO DE MEMBRANA,
METABOLISMO LIPÍDICO E RESPOSTA INFLAMATÓRIA:
IMPLICAÇÕES NA INFECÇÃO POR *Trypanosoma cruzi***

TESE

JUIZ DE FORA

2025

POLLIANNE GARBERO RAMPINELLI

**EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO NO REPARO DE MEMBRANA,
METABOLISMO LIPÍDICO E RESPOSTA INFLAMATÓRIA:
IMPLICAÇÕES NA INFECÇÃO POR *Trypanosoma cruzi***

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas, da Universidade
Federal de Juiz de Fora, para
obtenção do Título de Doutora em
Ciências Biológicas.

Área de concentração: Imunologia e
Doenças Infecto-Parasitárias

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Elaine de Almeida

Co-orientadora: Profa. Dra. Heloísa da Silva D`Ávila Bizarro

Juiz de Fora

2025

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca
Universitária da UFJF,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Garbero Rampinelli, Pollianne .
EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO NO REPARO DE MEMBRANA,
METABOLISMO LIPÍDICO E RESPOSTA INFLAMATÓRIA: IMPLICAÇÕES
NA INFECÇÃO POR *Trypanosoma cruzi*/ Pollianne Garbero Rampinelli. --
2025.

134 p.

Orientadora: Patrícia Elaine de Almeida

Coorientadora: Heloísa D'Avila da Silva Bizarro

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora,
Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2025.

1. Tese. 2. Laser de Baixa Potência. 3. reparo de
membrana. 4. *Trypanosoma cruzi*. 5. Corpúsculos Lipídicos. I.
Elaine de Almeida, Patrícia, orient. II. D'Avila da Silva Bizarro,
Heloísa, coorient. III. Título.

POLLIANNE GARBERO RAMPINELLI

**Efeito da Fotobiomodulação no reparo de membrana, metabolismo lipídico e
resposta inflamatória: implicações na infecção por *Trypanosoma cruzi***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de
Fora como requisito parcial à obtenção do título de
Doutora em Ciências Biológicas. Área de concentração:
Imunologia e doenças infecto-parasitárias.

Aprovada em 28 de novembro de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Drª. Patrícia Elaine de Almeida - Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profª. Drª. Flavia Paoli
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Gilson Costa Macedo
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. José Raimundo Correa
Universidade de Brasília

Profª. Drª. Luciana Oliveira Andrade
UFMG

Juiz de Fora, 29/10/2025.



Documento assinado eletronicamente por **Luciana de Oliveira Andrade, Usuário Externo**, em 01/12/2025, às 11:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flavia de Paoli, Professor(a)**, em 01/12/2025, às 12:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **José Raimundo Corrêa, Usuário Externo**, em 01/12/2025, às 17:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gilson Costa Macedo, Professor(a)**, em 03/12/2025, às 08:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Conferência de Documentos, informando o código verificador **2709672** e o código CRC **82D23696**.

Dedico este Trabalho:

À minha mãe, Sônia, e ao meu pai, Jânio, pelo amor incondicional, pelo apoio constante e pelo incentivo em cada passo da minha trajetória. À Deus e a Jesus, cuja misericórdia, bondade e poder tornaram possível a realização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, Criador e Pai, e a Jesus, Intercessor e Salvador, por todo o amor, bondade, paciência e misericórdia que tenho recebido e que sustentaram a minha jornada;

À minha mãe, Sônia, e ao meu pai, Jânio, por quem eu vivo e luto, e que foram essenciais para a minha vitória, por meio de todo o amor, apoio, paciência e de suas orações;

Às minhas irmãs, Gabriele e Carolyne, por todo o apoio oferecido;

À minha família, pelo apoio e por torcerem pela minha vitória;

À minha orientadora, Dra. Patrícia Elaine de Almeida, e à minha coorientadora, Dra. Heloísa D'Ávila da Silva Bizarro, pela acolhida e pela oportunidade de aprendizado, por todo o incentivo, apoio e paciência;

À Profa. Dra. Flávia de Paoli, pela gentileza, presteza e valiosa contribuição ao meu projeto, sem a qual este trabalho não teria sido possível;

À Profa. Dra. Luciana de Oliveira Andrade, pela atenção, prontidão e relevante contribuição ao desenvolvimento deste trabalho;

A todos os professores da pós-graduação, pela dedicação e por toda a experiência compartilhada, que contribuiu para a minha formação;

À banca examinadora, Profa. Dra. Luciana de Oliveira Andrade, Prof. Dr. José Raimundo Correia, Prof. Dr. Gilson Macedo e Profa. Dra. Flávia de Paoli, pela disponibilidade, considerações e ressalvas, contribuindo para o aperfeiçoamento e a conclusão deste trabalho;

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Biologia Celular, pelo apoio, amizade e colaboração;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Imunologia e Doenças Parasitárias e à Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), pelos recursos e pela oportunidade de realizar e concluir este projeto de doutorado;

Às agências de fomento CAPES e FAPEMIG, pelo apoio financeiro indispensável à realização deste trabalho;

E, por fim, a todos que fizeram parte dessa caminhada.

RESUMO

A terapia com laser de baixa potência (LBP), ou fotobiomodulação, consiste na aplicação de uma fonte de luz sobre uma área específica, utilizando baixos valores de potência e energia com o objetivo de potencializar processos de regeneração e regulação de distúrbios funcionais. No entanto, o impacto do LBP sobre os mecanismos moleculares e celulares, bem como sobre a resposta imunológica frente a patógenos intracelulares, ainda não está completamente elucidado. Neste contexto, torna-se relevante compreender como o LBP interfere em mecanismos celulares essenciais, como o reparo de membrana (RM), a infecção por *T. cruzi* e o metabolismo lipídico. Um dos principais mecanismos de RM em células lesionadas tanto por estímulos químicos, quanto por estímulos mecânicos, envolve o processo de reparo por endocitose, mediado por influxo de cálcio e exocitose lisossomal, culminando na remoção por endocitose da área lesionada e no resselamento da membrana plasmática (MP). Patógenos como o protozoário *Trypanosoma cruzi* conseguem invadir as células hospedeiras através das vesículas endocíticas formadas durante a ativação deste processo específico de RM, além de manipular a biogênese de Corpúsculos Lipídicos (CLs), organelas celulares biologicamente ativas, envolvidas no metabolismo lipídico e na modulação da resposta inflamatória. Assim, sabendo-se do importante papel do mecanismo de RM e dos CLs nas respostas celulares, e frente à infecção por *T. cruzi*, o objetivo deste estudo foi analisar os efeitos da irradiação com o LBP na integridade da MP, no RM, na progressão da infecção por *T. cruzi*, como também no metabolismo lipídico, *in vitro*. Mioblastos da linhagem C2C12, foram irradiados com LBP, na dose de 30J/cm², potência de saída 100 mW, por 8 segundos, no modo contínuo de emissão de luz, em uma única sessão, sendo infectados posteriormente, ou não, com tripomastigotas de *T. cruzi*, cepa Dm 28c. Em seguida as células foram fixadas, processadas, e o sobrenadante coletado, para ensaios de fluorescência, imunomarcagem, Western Blot, Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), e quantificação de PGE₂ e citocinas. Nossos resultados demonstraram que a fotobiomodulação não alterou a viabilidade celular, mas interferiu na permeabilidade da MP. Além disso, a irradiação prévia com o LBP promoveu o influxo de cálcio, o recrutamento lisossomal e a formação de cavéolas, processos celulares associados ao RM por endocitose; assim como modulou a infecção por *T. cruzi*, favorecendo a invasão, a replicação e a sobrevivência do protozoário. Tanto a fotobiomodulação quanto a infecção por *T. cruzi* aumentaram a biogênese de CLs, evento modulado pela expressão de PPAR γ e SREBP-1, com consequente aumento nos níveis de PGE₂ em ambas as condições. A prévia irradiação com LBP também apresentou efeito modulador sobre mediadores inflamatórios, reduzindo IL-6 e TNF- α e aumentando IL-10, enquanto a infecção elevou IL-6, TNF- α , IL-12 e IL-10. Em conjunto, os achados indicam que o LBP induz microlesões na MP, capazes de ativar o RM mediado por endocitose, além de regular o metabolismo lipídico e a resposta imune, influenciando diretamente o curso da infecção por *T. cruzi*.

Palavras-chaves: Laser de Baixa Potência; reparo de membrana; *Trypanosoma cruzi*; Corpúsculos Lipídicos; mioblastos.

ABSTRACT

Low-level laser therapy (LLLT), also known as photobiomodulation (PBM), involves applying a light source to a specific area using low power and energy levels to enhance regenerative processes and regulate functional disorders. However, the impact of LLLT on molecular and cellular mechanisms, as well as on the immune response triggered by intracellular pathogens, remains largely unelucidated. In this context, it is crucial to elucidate how LBP modulates key cellular mechanisms, such as membrane repair (MR), *T. cruzi* infection, and lipid metabolism. One of the main MR mechanisms in cells injured by chemical or mechanical stimuli involves the repair process through endocytosis, mediated by calcium influx and lysosomal exocytosis, leading to endocytic removal of the damaged area and resealing of the plasma membrane (PM). Pathogens such as the protozoan *T. cruzi* can exploit endocytic vesicles formed during the activation of this MR process to invade host cells. Additionally, this parasite manipulates the biogenesis of lipid bodies (LBs), biologically active organelles involved in lipid metabolism and the modulation of inflammatory responses. Considering the crucial role of MR mechanisms and LBs in cellular responses during infection, this study aimed to investigate, *in vitro*, the effects of LLLT on PM integrity, MR, the progression of *T. cruzi* infection, and lipid metabolism. C2C12 myoblasts were irradiated with LLLT at a dose of 30 J/cm² (output power: 100 mW, exposure time: 8 s, continuous emission, single session) and subsequently infected, or not, with *T. cruzi* trypomastigotes (Dm28c strain). Afterward, the cells were fixed and processed, and the supernatants collected for fluorescence assays, immunolabeling, Western Blot, Transmission Electron Microscopy (TEM), and quantification of PGE₂ and cytokines. Photobiomodulation did not alter cell viability but affected PM permeability. Pre-irradiation with LLLT promoted calcium influx, lysosomal recruitment, and caveolae formation, cellular events associated with MR via endocytosis, as well as modulated *T. cruzi* infection, favoring parasite invasion, replication, and survival. Both photobiomodulation and *T. cruzi* infection increased LB biogenesis, a process modulated by PPAR γ and SREBP-1 expression, leading to elevated PGE₂ levels under both conditions. Pre-irradiation with LLLT also exhibited a modulatory effect on inflammatory mediators, reducing IL-6 and TNF- α while increasing IL-10, whereas infection alone elevated IL-6, TNF- α , IL-12, and IL-10. Altogether, these findings indicate that LLLT induces microlesions in the PM capable of activating MR via endocytosis, while also regulating lipid metabolism and immune responses, thereby directly influencing the course of *T. cruzi* infection.

Keywords: Low Level Laser; membrane repair; *Trypanosoma cruzi*; Lipid Bodies; Low Level Laser; myoblasts.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração das principais características da radiação gerada por laser.....	22
Figura 2: Interações da luz laser com o tecido biológico.....	23
Figura 3: Exemplo de um dispositivo Laser de Baixa Potência.....	25
Figura 4: Desenho esquemático do mecanismo de ação do LBP.....	29
Figura 5: Mecanismo de ação da Fotobiomodulação na atividade celular e potenciais vantagens na biologia celular.....	30
Figura 6: Modelo de mosaico fluido da MP.....	33
Figura 7: Hipótese do mecanismo de reparo por “patching”	35
Figura 8: Mecanismo de reparo por brotamento.....	37
Figura 9: Mecanismo proposto para o RM através da modulação da exocitose lisossomal.....	38
Figura 10: Modelo de reparo de MP mediado por endocitose caveolar.....	40
Figura 11: Modelo de invasão de células por <i>T. cruzi</i> mediada por reparo da MP por endocitose.....	45
Figura 12: Microscopia eletrônica de varredura das principais formas evolutivas do <i>T. cruzi</i>	46
Figura 13: Ciclo evolutivo do <i>T. cruzi</i> em hospedeiro intermediário e hospedeiro definitivo.....	48
Figura 14: Distribuição do número de casos estimados da Doença de Chagas no mundo em 2018.....	49
Figura 15: Formação de Corpúsculos Lipídicos em resposta à interação macrófago - <i>T. cruzi</i>	53

Figura 16: Aspectos morfológicos de Corpúsculos lipídicos.....	55
Figura 17: Desenho esquemático do modelo de biogênese de Corpúsculos Lipídicos	57
Figura 18: Delineamento Experimental.....	64
Figura 19. Imagem ilustrativa da definição das áreas ao redor do núcleo utilizadas para quantificação da distribuição de lisossomos marcados com fluorescência.....	68
Figura 20: Viabilidade celular de mioblastos após a irradiação prévia com LBP e infecção por <i>T. cruzi</i>	75
Figura 21: Mioblastos previamente irradiados com LBP na presença ou ausência de Ca^{2+} , corados com Iodeto de Propídio.....	77
Figura 22: Mioblastos previamente irradiados com LBP na presença ou ausência de Ca^{2+} , corados com Iodeto de Propídio, imagens sobrepostas.....	78
Figura 23: Aumento do Ca^{2+} intracelular em mioblastos previamente irradiados com LBP.....	80
Figura 24: Dispersão dos lisossomos, em mioblastos previamente irradiados, observada através da imunomarcação com anticorpo anti-LAMP1.....	81
Figura 25: Comparação da distribuição lisossomal entre mioblastos controle e previamente irradiados com LBP.....	82
Figura 26: MET de mioblastos previamente irradiados, ou não, com LBP.....	83
Figura 27: A irradiação prévia com LBP modula a invasão do <i>T. cruzi</i> em mioblastos.....	84
Figura 28: Replicação e sobrevivência de <i>T. cruzi</i> em mioblastos infectados, previamente irradiados, ou não, com LBP.....	85

Figura 29: Imunofluorescência de Corpúsculos Lipídicos em mioblastos previamente irradiados, ou não, com LBP, infectados, ou não, por <i>T. cruzi</i>	86
Figura 30: Quantificação de PGE ₂ em mioblastos previamente irradiados, ou não, com LBP, infectados, ou não, por <i>T. cruzi</i>	88
Figura 31: Expressão de PPAR γ e SREBP-1 em mioblastos previamente irradiados, ou não, com LBP, infectados, ou não, por <i>T. cruzi</i>	89
Figura 32: Quantificação de IL-6, TNF- α , IL-12 e IL-10 em mioblastos previamente irradiados, ou não, com LBP, infectados ou não por <i>T. cruzi</i>	91
Figura 33: Desenho esquemático do efeito da fotobiomodulação em mioblastos previamente irradiados, infectados, ou não, com <i>T. cruzi</i>	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais proteínas envolvidas nos diversos mecanismos de RM.....41

Tabela 2 - Parâmetros dosimétricos utilizados para irradiação com o LBP.....63

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

15-LO: 15-lipoxigenase

5-LO: 5-lipoxigenase

A1: Anexina 1

A2: Anexina 2

A5: Anexina 5

A6: Anexina 6

AA: Ácido Araquidônico

ADRP: Proteína relacionada com a diferenciação de adipócitos
ALG-2: Apoptosis-linked gene-2 protein

ALIX: ALG-2-interacting protein X

AMP cíclico: Monofosfato de adenosina cíclico

AP-1: Proteína ativadora-1

ARF: Fator de ribosilação de ADP

ASM: Esfingomielinase Ácida

ATP: Adenosina trifosfato

BIN1: Myc box-dependent-interacting protein 1

CLs: Corpúsculos Lipídicos

Ca²⁺: Cálcio

Cav-1: Caveolina 1

Cav-2: Caveolina 2

Cav-3: Caveolina 3

CCO: Citocromo c oxidase

CE: Éstereis de Colesterol

Complexo ESCRT: Complexo de Triagem Endossomal Necessários para o Transporte

COX: ciclooxigenase

EE: Éstereis de Esterol

EHD: Eps15 Homology Domain

FGF-2: Fator de crescimento de fibroblasto-2

FIT1: Proteína Transmembranar indutora do armazenamento lipídico 1

FIT2: Proteína Transmembranar indutora do armazenamento lipídico 2

GPI: Proteínas ligadas a glicosilfosfatidil inositol

H⁺: Hidrogênio

HILT: High-Intensity Laser Treatment

HSPGs: Heparana sulfato

IFN-γ: Interferon – gama

IGF-1: Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

IL-4: Interleucina 4

IL-6: Interleucina 6

IL-7: Interleucina 7

IL-8: Interleucina 8

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

IL-15: Interleucina 15

IL-18: Interleucina 18

IL-1 β : Interleucina 1 β

IP: Iodeto de Propídio

LAMP-1: Lysosome-Associated Membrane Protein-1

LBP: Laser de baixa potência

LLLT: Terapia com laser de baixa intensidade

MET: Microscopia eletrônica de transmissão

MG53: Mitsigumin-53

MOI: Multiplicidade de infecção

MP: Membrana Plasmática

MVBs: Corpos multivesiculares

Na⁺: Sódio

NF- κ B: Fator nuclear kappa B

NGF: Fator de crescimento nervoso

NO: Óxido Nítrico

PAT: Família composta por perilipina, ADRP e TIP47

PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas

PGE's: Prostaglandinas

PGE 2: Prostaglandinas 2

PLIN 1: Perilipina 1

PLIN 2: Perilipina 2

PLIN 3: Perilipina 3

PPAR γ : Receptor γ ativado por proliferadores de peroxissomos

RE: Retículo Endoplasmático

ROS: Espécies reativas de oxigênio

SFB: Soro Fetal Bovino

SFC: Soro Fetal de Cavalo

SREBP-1: Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1

TAGs: Triacilgliceróis

TAUP: Meio de cultura ácido que mimetiza a urina de triatomíneos

Tc-Tox: proteína formadora de poros

TGF β : Fator de crescimento tumoral

TrkA e TrkC: Receptores tirosina-quinase

TIP47: Proteína de interação da porção terminal de 47 quilodaltons

TLR2: Receptor Toll-like 2

TNF- α : Fator de necrose tumoral – alfa

Vps4: Vacuolar sorting protein 4

WHO: Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1- Laser de Baixa Potência.....	21
1.1.1 - Características Gerais.....	21
1.1.2 – Mecanismos de ação e efeitos biológicos.....	28
1.2 – Mecanismos de Reparo de Membrana.....	32
1.2.1 – Características Gerais.....	32
1.2.2 – A sinalização de cálcio no Reparo de Membrana.....	34
1.2.3 – Principais mecanismos intracelulares de Reparo de Membrana.....	35
1.2.4 – Papel do Reparo de Membrana na interação patógeno-hospedeiro.....	42
1.3 – <i>Trypanosoma cruzi</i>	46
1.3.1 – Características Gerais.....	46
1.3.2 – Doença de Chagas: Epidemiologia, Imunologia e Tratamento.....	48
1.3.3 – Importância do metabolismo lipídico na resposta imune durante a infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i>	51
1.4 – Corpúsculo Lipídico: Uma organela dinâmica.....	54
2. JUSTIFICATIVA.....	60
3. OBJETIVOS.....	61
3.1 - Objetivo Geral	61
3.2 - Objetivos Específicos	61
4. MATERIAL E MÉTODOS	62

4.1- Cultura <i>in vitro</i> de C2C12.....	62
4.2 – Laser de Baixa Potência.....	62
4.3 – <i>Trypanosoma cruzi</i> e infecção <i>in vitro</i>	63
4.4 – Grupos Experimentais.....	64
4.5 - Análise da viabilidade celular com Azul de Trypan.....	65
4.6 – Ensaio com Iodeto de Propídio.....	65
4.7 - Ensaio de influxo de cálcio.....	66
4.8 - Análise de dispersão de lisossomos.....	67
4.9 - Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	68
4.10 - Quantificação da infecção por <i>T. cruzi</i>	69
4.11 - Ensaio de replicação e sobrevivência do <i>Trypanosoma cruzi</i>	70
4.12 - Análise e contagem de Corpúsculos Lipídicos.....	71
4.13 - Western Blot.....	71
4.14 - Dosagem de PGE ₂	73
4.15 – Dosagem de citocinas.....	73
4.16 - Análise Estatística	74
5. RESULTADOS.....	75
5.1 - Viabilidade celular.....	75
5.2 – Permeabilidade celular.....	76
5.3 – Influxo de Ca ²⁺	79
5.4 – Dispersão lisossomal.....	80
5.5 - Análise ultraestrutural da Membrana Plasmática.....	82
5.6 - Internalização de <i>T. cruzi</i>	83

5.7 - Replicação e sobrevivência do <i>T. cruzi</i>	84
5.8 – Biogênese de Corpúsculos Lipídicos.....	85
5.9 - Produção de PGE ₂	87
5.10 - Expressão de PPAR γ e SREBP-1.....	88
5.11 – Produção de citocinas.....	90
6. DISCUSSÃO	92
7. CONCLUSÕES.....	109
7.1 - Efeito da fotobiomodulação prévia sobre o Reparo de Membrana.....	109
7.2 - Efeito da fotobiomodulação prévia sobre a infecção por <i>T. cruzi</i> , no metabolismo lipídico e na resposta inflamatória.....	109
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111

1- INTRODUÇÃO

1.1) LASER DE BAIXA POTÊNCIA

1.1.1) Características Gerais

O laser é um dispositivo que emite luz através de um processo de amplificação óptica baseado na emissão estimulada de fótons (Perveen, *et al.*, 2018). Einstein com a publicação de seu tratado “*Zur Quantentheorie der Strahlung*” em 1916, propiciou o desenvolvimento teórico do laser, ao descrever o conceito que demonstrou que a energia de um feixe de luz era concentrada em pequenos conjuntos de energia, denominados fótons, explicando assim o fenômeno da emissão fotoelétrica, onde um fóton ao colidir com um elétron estimula a liberação de outro fóton, amplificando a emissão inicial (Patil, *et al.*, 2008).

O primeiro laser funcional foi desenvolvido por Theodore Maiman em 1960 (Maiman, 1960). Em 1967, Endre Mester, médico húngaro da Universidade Médica de Semmelweis, Hungria, descobriu a terapia com Laser de Baixa Potência (LBP) ao observar, em experimentos com camundongos, que a irradiação com laser de rubi de baixa intensidade não induzia carcinogênese, mas sim, promoveu uma melhor cicatrização de feridas e aumento no crescimento capilar nos animais irradiados. Esta foi a primeira demonstração de "bioestimulação a laser" (Mester *et al.*, 1967; Mester *et al.*, 1968; Hamblin, 2016).

Estes resultados foram indicativos de que a luz laser de baixa intensidade (assim como os lasers térmicos de alta potência) poderia ter suas próprias aplicações benéficas na medicina e motivaram os primeiros ensaios clínicos a partir da década de 1970, em pacientes com úlceras cutâneas de difícil cicatrização, nos quais a terapia com LBP demonstrou acelerar a regeneração tecidual e reduziu processos inflamatórios locais (Mester *et al.*, 1967; Kleinman *et al.*, 1996; Hamblin, 2016). Atualmente, a terapia com o LBP também é chamada de Fototerapia ou Fotobiomodulação, é amplamente utilizada nas diversas áreas da saúde como dermatologia, odontologia e fisioterapia para promoção da analgesia, redução da

inflamação e regeneração tecidual (Huang *et al.*, 2009, Farivar *et al.*, 2014; Rathod *et al.*, 2022).

A luz ou radiação eletromagnética de um laser caracteriza-se por ser um fluxo luminoso altamente colimado (feixes de luz paralelos); de alta intensidade de energia e: altamente concentrado (Figura 1), que em contato com os diferentes tecidos resulta, de acordo com o tipo do laser, em efeitos fotoquímicos, fototérmicos, fotomecânicos e fotoelétricos (Azagdoli, *et al.*, 2016); monocromático (fótons de mesmo comprimento de onda); capaz de atingir altas intensidades e ser coerente e unidirecional (fótons se propagam na mesma direção sem divergência significativa) (Husain, *et al.*, 2016).

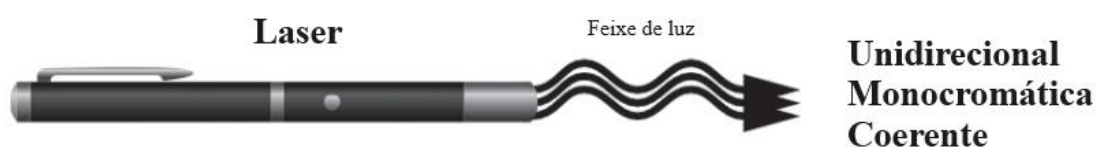


Figura 1: Ilustração das principais características da radiação gerada por laser. Figura adaptada (Jelínková; Sulc, 2013).

Os lasers são nomeados de acordo com o meio ativo pelo qual são estimulados. Os aparelhos existentes podem ser classificados segundo o tipo do seu meio ativo (um amplificador óptico), que pode ser sólido, líquido, semicondutor de gás e de fibra (Perveen, *et al.*, 2018). Os parâmetros utilizados rotineiramente em aplicações clínicas incluem comprimento de onda (nanômetro) que varia entre o vermelho e o infravermelho; frequência; energia (Joules); fluência ou dose (J / cm^2); potência (Watts); irradiância (W / cm^2) e tempo (segundos). As principais interações laser-tecido são: fotoquímicas, fototérmicas e fotomecânicas, e dependem do tempo de irradiação e da densidade de potência (Freitas, *et al.*, 2016).

Ao atingir o tecido biológico, parte da luz irradiada é absorvida, enquanto a outra parte é refletida, transmitida e dispersada (Figura 2). O efeito de absorção depende das propriedades do tecido, como estrutura, conteúdo de água, condutividade térmica, capacidade de calor, densidade e capacidade de absorver, dispersar ou

refletir a energia emitida. Além disso, também depende das propriedades do laser, que incluem o modo de emissão da luz, a potência, a densidade de energia e o comprimento de onda. Comprimentos de onda maiores, como o infravermelho próximo, apresentam maior capacidade de penetração tecidual, enquanto comprimentos menores são mais absorvidos nas camadas superficiais (Azagdoli, *et al.*, 2016).

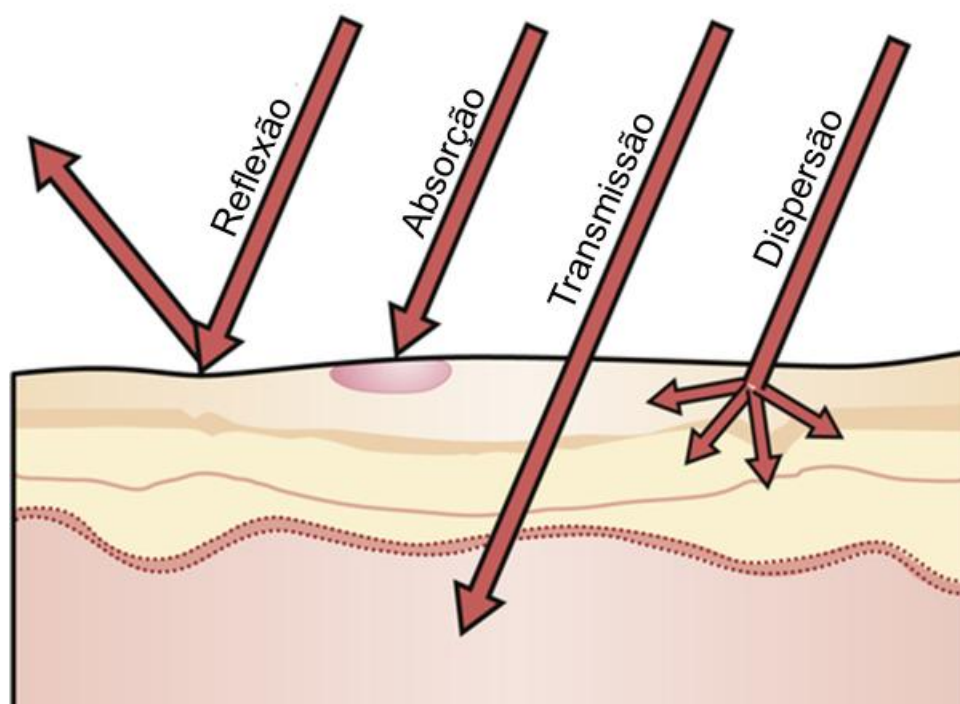


Figura 2: Interações da luz laser com o tecido biológico. Desenho esquemático demonstrando as interações da luz laser com a superfície do tecido, ilustrando os processos de reflexão, absorção, transmissão e dispersão da radiação no tecido. Figura adaptada (Mrzezo, 2015).

A efetividade do laser é vinculada à absorção da luz irradiada pelos tecidos. No caso dos lasers de alta potência (HILT- High-Intensity Laser Treatment), que variam entre 1 a 30 Watts, a luz laser é absorvida e age através dos efeitos térmicos produzidos, e seu uso no tecido biológico tem o objetivo de corte tecidual, coagulação, redução microbiana, vaporização e hemostasia (Sant'Anna, *et al.*, 2017). Já no caso dos lasers de baixa potência (LBP) a variação fica entre 0,001 a 0,1 Watts e a luz laser absorvida gera um efeito biomodulador (Freitas, *et al.*, 2016).

A Fotobiomodulação consiste na aplicação de uma fonte de luz sobre uma área determinada, utilizando-se baixos valores de densidade de potência (mW/cm^2) e doses de energia (J/cm^2) como método seguro e não invasivo para potencialização do processo de regeneração e regulação de distúrbios funcionais (Huang, *et al.*, 2009; Farivar, *et al.*, 2014).

Essa terapêutica utiliza-se de dispositivos conhecidos como Lasers de Baixa Potência (LBP), que emitem uma radiação próxima ao espectro da luz vermelha ou infravermelha, não térmica e uniforme em comprimento de onda, fase e polarização. Desse modo, os efeitos biológicos não são causados por calor perceptível, e sim por efeitos fotofísicos, fotoquímicos e fotomecânicos nas células dos tecidos irradiados (Rola *et al.*, 2022). A base desse fenômeno está fortemente ligada à influência da luz do laser nas organelas celulares, bem como aos processos bioquímicos realizados dentro das mesmas, gerando alterações químicas (Rola, *et al.*, 2022).

Os métodos mais comuns de administração da radiação de laser de baixa intensidade incluem os lasers à base de rubi (694 nm), argônio (Ar) (488 e 514 nm), hélio-neônio (He-Ne) (632,8 nm), criptônio (521, 530, 568 e 647 nm), arseneto de gálio associado a alumínio (GaAlAs) (805 ou 650 nm) e arseneto de gálio (Ga-As) (904 nm) (Lin Feng *et al.*, 2010; Arjmand *et al.*, 2021). Também são amplamente empregados os diodos emissores de luz (LED), que apresentam menor colimação e coerência quando comparados aos LBPs convencionais. Consequentemente, exibem bandas de emissão mais largas (Figura 3) (Müller *et al.*, 2013; Arjmand *et al.*, 2021).

Cada um desses dispositivos possui parâmetros específicos de importância, incluindo a potência de saída do laser, que varia de 0,001 a 0,1 Watts, e o comprimento de onda, que pode variar de 300 a 10.600 nm. Além disso, a taxa de pulso pode variar de 0, caracterizando emissão contínua, até 5000 Hertz (ciclos por segundo). Outros parâmetros relevantes incluem a densidade e a intensidade de energia, que variam de 10^{-2} a $10 \text{ W}/\text{cm}^2$, bem como a dose, que pode oscilar entre 0,01 e $100 \text{ J}/\text{cm}^2$. Por fim, também são considerados o tipo de exposição e a duração do tratamento (Posten *et al.*, 2005; Zein *et al.*, 2018).



Figura 3: Exemplo de um dispositivo Laser de Baixa Potência. Laser de Diodo Modelo Photon Laser III DMC (DMC, s.d).

Os principais parâmetros utilizados na Fotobiomodulação são o comprimento de onda; a densidade de energia; a potência (pico e média); modo de aplicação e tamanho da área; características temporais e a quantidade de aplicações (Jelinková; Sulc, 2013). Os diferentes parâmetros utilizados promovem um efeito biológico heterogêneo em cada tratamento, gerando respostas celulares bastante específicas e particulares.

O comprimento de onda é a distância entre dois pontos em fase consecutivos, como picos ou vales, característica fundamental das ondas eletromagnéticas. No LBP uso dos lasers é diretamente impactado pelo comprimento de onda, que determina a cor da luz visível ou a região do espectro eletromagnético em que a luz se encontra determinando na Fotobiomodulação a eficácia da penetração nos tecidos biológicos sem causar danos térmicos (Yang, *et al.*, 2024). A densidade de energia, também chamada de fluência, é a quantidade de energia entregue por unidade de área, medida em joules por centímetro quadrado (J/cm^2). A aplicação da densidade de energia adequada permite a estimulação celular sem causar danos, promovendo processos como a redução da inflamação, alívio da dor e aceleração da cicatrização (Taylor, *et al.*, 2020).

Esses dois parâmetros da irradiação influenciam a biologia celular, pois determinam a profundidade de penetração (comprimento) e a quantidade de energia irradiada (densidade de energia). Dessa forma, a fotobiomodulação é capaz de

modular processos celulares distintos, como a produção de ATP e de espécies reativas de oxigênio (ROS), além da ativação das vias de proliferação, diferenciação e reparo tecidual (Chung *et al.*, 2011; Zein *et al.*, 2018). Comprimentos de onda mais longos (600 nm até 1070 nm) são absorvidos pela água e têm maior impacto na promoção da proliferação celular (Hashmi, *et al.*, 2010). Por sua vez uma menor densidade de energia aplicada ($0,05 \text{ J/cm}^2$ – 10 J/cm^2) promove a proliferação celular, enquanto uma maior densidade de energia (acima de 50 J/cm^2) aumenta os processos apoptóticos (Rola, *et al.*, 2022).

A transição mútua de ambos os fenômenos tem uma natureza contínua, apresentando um efeito bifásico de dose-resposta, no qual existe uma dose de energia ou um intervalo entre doses ideais, com um efeito bioestimulatório capaz de promover melhores resultados e isso varia para cada tipo de patologia, tecido e profundidade. Com isso um estímulo pequeno pode não ter efeito biológico e um estímulo grande pode ter um efeito bioinibidor ou até mesmo citotóxico. Essa resposta bifásica também é conhecida como “lei de Arndt-Schulz” (Huang *et al.*, 2009; Su *et al.*, 2022).

Sobre as definições dos parâmetros do LBP mencionados anteriormente temos ainda: a potência e o tamanho do ponto, os quais, combinados, fornecem a densidade de potência e irão ditar quanta energia e calor são fornecidos ao alvo desejado. Clinicamente, este ajuste é essencial, pois densidades de potência mais baixas são frequentemente utilizadas em processos inflamatórios e de cicatrização superficiais, enquanto densidades mais elevadas podem ser necessárias para atingir estruturas mais profundas, como músculos ou articulações (Farkas *et al.*, 2013). O modo de aplicação do LBP, por sua vez, refere-se à forma como o laser é utilizado durante o tratamento, destacando-se dois modos principais: contínuo e pulsado (Hashmi *et al.*, 2010).

No modo contínuo, o laser emite uma luz constante, sem interrupções. A emissão contínua permite uma entrega uniforme de energia ao tecido, o que pode ser benéfico, por exemplo, em condições crônicas que exigem estimulação prolongada, como tendinopatias ou úlceras cutâneas. Já no modo pulsado, a luz é emitida em intervalos, alternando entre períodos de emissão e pausa (Chaki *et al.*, 2025). A aplicação pulsada é útil em situações que requerem maior controle da

energia aplicada, como no manejo de inflamações agudas, edemas ou dores mais localizadas (Zein *et al.*, 2018).

A espessura do tecido é um importante parâmetro que irá influenciar na penetração da luz, uma vez que tecidos mais espessos podem exigir ajustes na intensidade ou tempo de aplicação para que a luz alcance as camadas mais profundas; e a área corporal, por sua vez, determina a quantidade de energia necessária e o tempo de exposição, pois áreas maiores podem necessitar de sessões mais longas ou repartidas para garantir a cobertura adequada e eficaz (Steiner, 2011; Taylor *et al.*, 2020).

Por fim, o parâmetro temporal do Laser de Baixa Potência (LBP) refere-se à forma como a energia do laser é distribuída ao longo do tempo durante o tratamento. Essa característica inclui aspectos como a duração de cada sessão, a frequência de aplicação e o tempo de exposição em cada área tratada (Taylor *et al.*, 2020). Do ponto de vista clínico, tais variáveis são fundamentais para o planejamento terapêutico: protocolos com sessões mais frequentes são indicados em condições agudas, como traumas musculares recentes, enquanto quadros crônicos, como artrite ou fibromialgia, geralmente requerem maior tempo de exposição por sessão, porém com menor frequência semanal (Maia *et al.*, 2012; Gökçe. *et al.*, 2023).

Na prática clínica, isso se traduz, por exemplo, na recomendação de sessões diárias ou em dias alternados em processos inflamatórios agudos, enquanto em condições crônicas costuma-se empregar aplicações de duas a três vezes por semana, com maior tempo de exposição em cada área tratada para promover efeitos cumulativos (Oliveira-Souza *et al.*, 2022). A duração e a frequência influenciam diretamente os efeitos biológicos do laser, como a estimulação celular e a modulação inflamatória (Rola *et al.*, 2022). Um tempo de exposição muito curto pode não fornecer energia suficiente para efeito terapêutico, enquanto tempos excessivos aumentam o risco de aquecimento indesejado do tecido (Taylor *et al.*, 2020).

Observa-se que os diferentes parâmetros ajustáveis no LBP contribuem para a variabilidade metodológica, tornando a interpretação das pesquisas publicadas desafiadora. Soma-se a essa questão a ampla diversidade de patologias e as características individuais de cada paciente, que exigem abordagens personalizadas e inviabilizam a padronização de um único critério de aplicação capaz de abranger

todos os casos. Consequentemente, cada estudo pode adotar configurações distintas, o que dificulta a consistência e comparabilidade entre os resultados, tornando complexo o estabelecimento de conclusões universais.

1.1.2) Mecanismos de ação e efeitos biológicos

O mecanismo biológico de ação do LBP conhecido ocorre através da absorção da luz irradiada por cromóforos celulares específicos localizados nas mitocôndrias, como o complexo enzimático citocromo c oxidase (CCO), cuja atividade é inibida pelo óxido nítrico (NO) (Srinivasan *et al.*, 2012) (Figura 4). Estudos sugerem que a irradiação com o LBP é capaz de reverter a inibição da CCO por fotodissociação do NO de seus locais de ligação, ocasionando o aumento do nível de NO, que em contrapartida aumenta o potencial de membrana mitocondrial e consequentemente promove o aumento na produção de adenosina trifosfato (ATP), (Hu *et al.*, 2007; Karu, 2008; Zhang *et al.*, 2008).

A alteração na produção de ATP promove um acréscimo na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), que participam da ativação da cascata biológica que regula diversos mecanismos celulares (Farivar *et al.*, 2014; Lipovsky *et al.*, 2008). A irradiação com o LBP também gera mudanças na ultraestrutura da mitocôndria induzindo alterações no pH, nos níveis de monofosfato de adenosina cíclico (AMP cíclico) e de Ca^{2+} (Freitas *et al.*, 2016).

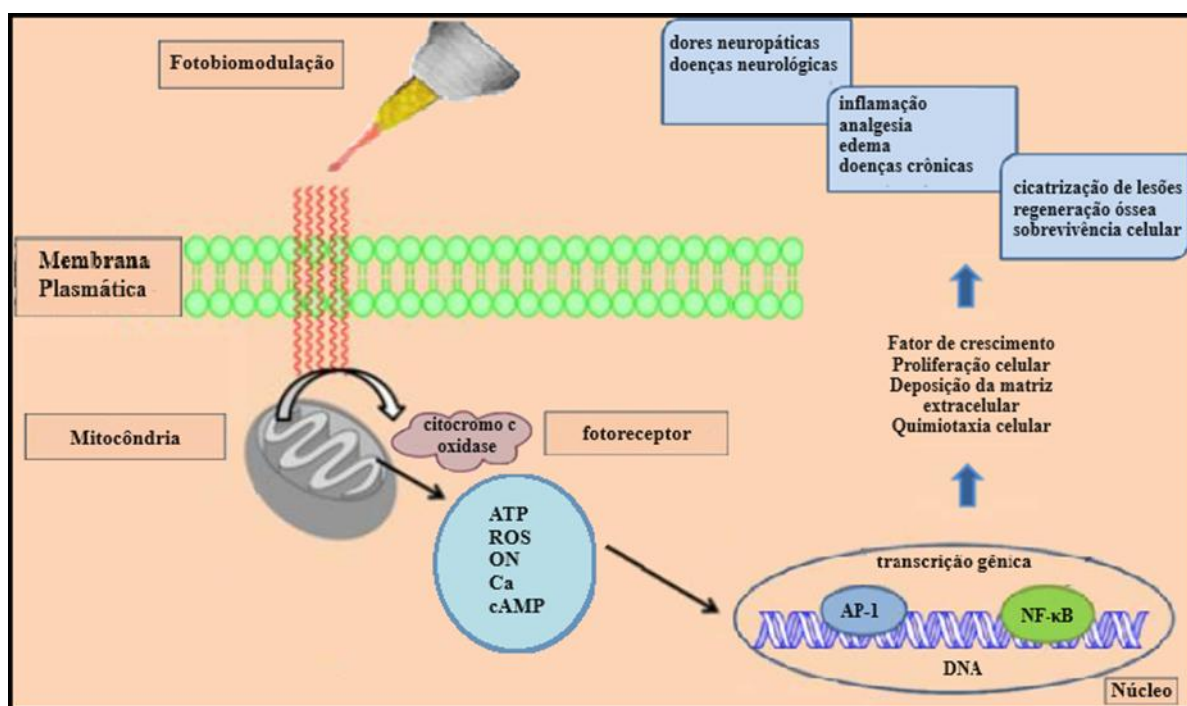


Figura 4: Desenho esquemático do mecanismo de ação do LBP. Ação da luz irradiada pelo LBP sobre a mitocôndria, desencadeando vias de sinalização que alteram a transcrição gênica. Figura adaptada (Karoussis., 2018).

Como moléculas quimicamente ativas, ATP, AMP cíclico, NO, Ca^{2+} e ROS, desempenham um papel importante na sinalização celular, na regulação da progressão do ciclo celular, na ativação enzimática e na síntese de ácidos nucleicos e proteínas. Elas ativam diversos fatores de transcrição, sendo o mais importante o fator nuclear kappa B (NF-κB) e a proteína ativadora-1 (AP-1), fatores de transcrição que regulam a expressão de diversos genes estimuladores e protetores relacionados com a proliferação e migração celular, à sobrevivência, ao reparo e à regeneração tecidual, a produção de citocinas e fatores de crescimento (Figura 5) (Karu, 2008; Chung, *et al.*, 2011).

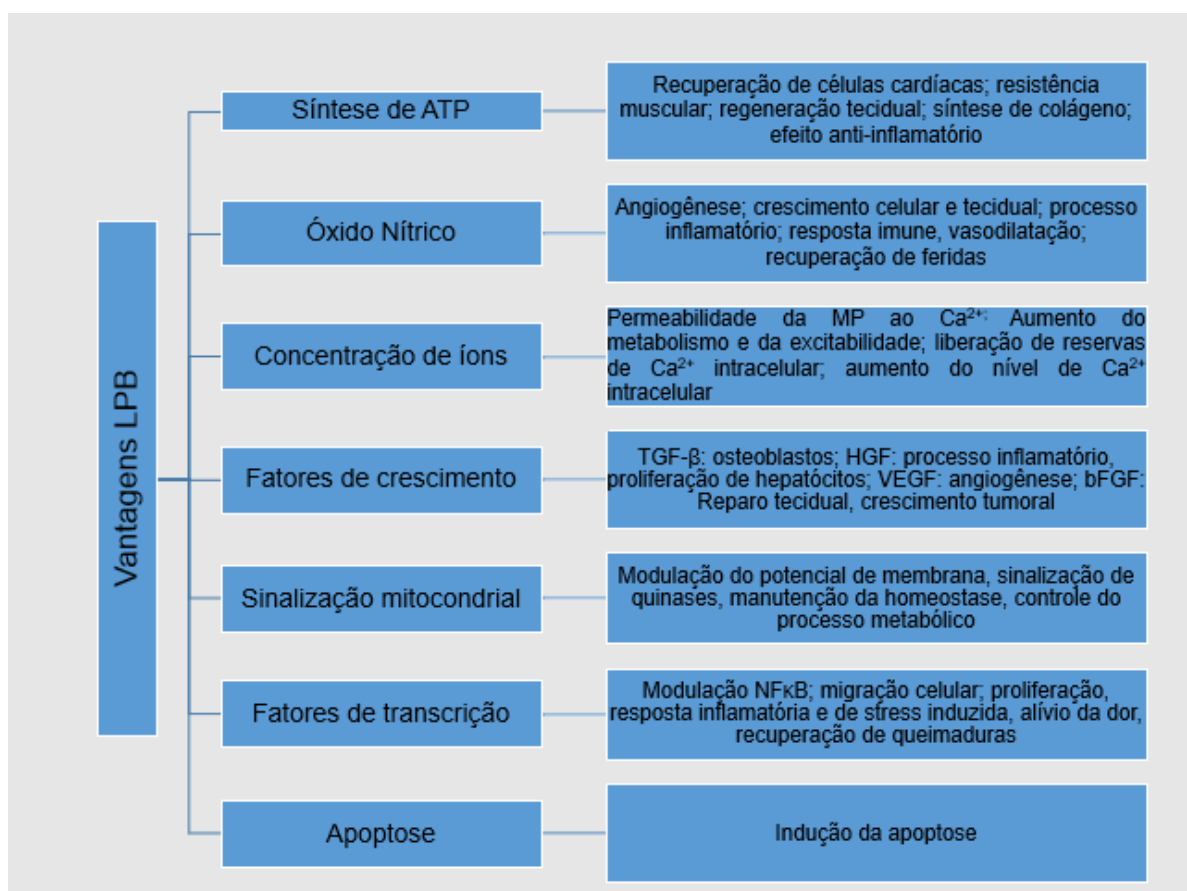


Figura 5: Mecanismo de ação da Fotobiomodulação na atividade celular e potenciais vantagens na biologia celular. A influência da luz do LBP nas organelas celulares desencadeia reações biológicas promovendo alterações fisiológicas. Figura própria, elaborada com base em Rola, *et al.*, 2022.

Trabalhos previamente publicados demonstraram alterações em diversos mecanismos biológicos após o tratamento com o LBP, incluindo a supressão de citocinas inflamatórias, como TNF-alfa e IL-6 (Yamaura *et al.*, 2009), e o aumento da produção de fatores de crescimento, tais como PDGF, IGF-1, NGF e FGF-2 (Saygun *et al.*, 2008; Safavi *et al.*, 2008). Além disso, foi relatada a regulação de vias de sinalização intracelular responsáveis pelo controle da expressão gênica e pela modulação de fatores de transcrição associados à proliferação celular, à sobrevivência, ao reparo e à regeneração tecidual, em diferentes tipos de tecido, como o epitelial e o ósseo (Liu *et al.*, 2005; Hamblin, 2006; Snirivasan *et al.*, 2012).

Os efeitos biológicos promovidos pela fotobiomodulação resultam em diversos benefícios em nível tecidual. Entre eles, destacam-se o aumento da atividade da fosfatase alcalina, enzima envolvida na mineralização óssea, e a melhora da expressão gênica da osteocalcina, um marcador biológico do metabolismo ósseo e

participante da mineralização do esqueleto, além da proliferação celular em células ósseas (Renno *et al.*, 2010; Huertas *et al.*, 2014). Também foram observados o aumento da sobrevivência de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo e de fatores de crescimento em tecido epitelial lesionado (Kim *et al.*, 2008), a redução da dor e da inflamação (El-Maghraby *et al.*, 2013), bem como o estímulo à síntese de colágeno e à regeneração nervosa (Schultz *et al.*, 1985; Shen *et al.*, 2013). No tecido muscular a fotobiomodulação tem sido associada à modulação da resposta inflamatória, à redução da dor muscular, regeneração muscular, e melhora da recuperação estrutural e funcional do músculo esquelético, tanto em modelos experimentais quanto clínicos (Costa *et al.*, 2018).

O mecanismo de ação da terapia com LBP não está apenas relacionado ao aumento do metabolismo e proliferação celular, pois também mostra a capacidade de induzir a apoptose com a aplicação de doses mais altas de energia (Rola *et al.*, 2022). O mecanismo exato desse fenômeno ainda não foi totalmente compreendido. No entanto, há evidências de que possa estar indiretamente relacionado à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), à alteração da atividade de diferentes quinases, como a C-quinase, e à modulação da atividade da caspase-3, uma mediadora chave da morte celular programada envolvida na clivagem de diversas proteínas essenciais (Rola *et al.*, 2022).

A Fotobiomodulação também demonstrou efeitos significativos no metabolismo lipídico (Avci *et al.*, 2013). Estudos revelaram que a irradiação com o LBP pode modular a atividade de enzimas envolvidas na síntese e degradação de lipídios, promovendo a formação e maturação de corpúsculos lipídicos (CLs) (Levchenko *et al.*, 2019). Essas organelas, além de atuarem no armazenamento de lipídios, desempenham papel ativo na regulação do metabolismo celular, na sinalização inflamatória e na interação com outros compartimentos intracelulares (Levchenko *et al.*, 2019). Além disso, o LBP demonstrou influenciar a produção de prostaglandina E2 (PGE₂), um mediador inflamatório derivado do ácido araquidônico e produzido pelos CLs (Sakurai *et al.*, 2000).

Importante no processo terapêutico, a Fotobiomodulação tem recebido destaque nos últimos anos e os estudos sobre este tratamento aumentaram e ganharam relevância, proporcionando esclarecimento sobre os mecanismos de ação

do LBP e sobre seus efeitos a nível celular e tecidual (Freitas *et al.*, 2016; Hamblin, 2016; Karoussis *et al.*, 2018; Rola *et al.*, 2022). Contudo, apesar de amplamente utilizada em contextos clínicos, os efeitos celulares e moleculares do LBP, especialmente frente a infecções por patógenos intracelulares, ainda não estão completamente compreendidos. Nesse contexto, torna-se essencial investigar de que forma a fotobiomodulação interfere em processos fundamentais da biologia celular. Assim, este estudo busca compreender sua atuação em três aspectos principais: o reparo de membrana (RM), a infecção por *Trypanosoma cruzi* e o metabolismo lipídico. Cada um desses eventos representa um componente-chave da resposta celular, cuja modulação pelo LBP pode revelar novos mecanismos de ação dessa terapia.

A compreensão aprofundada desses efeitos contribui para a melhoria da segurança e da eficácia dos tratamentos, ajuda a prevenir efeitos adversos e aumenta a precisão das intervenções. Além disso, contribui para o avanço do conhecimento sobre os mecanismos celulares modulados pela fotobiomodulação, oferece bases para a padronização de protocolos experimentais e estabelece fundamentos para futuras aplicações clínicas e pesquisas na área da fotobiomodulação.

1.2) MECANISMOS DE REPARO DE MEMBRANA

1.2.1) Características gerais

A célula eucariótica é separada do ambiente extracelular por uma membrana plasmática (MP), estrutura lamelar, fluida, composta por duas camadas de fosfolípidios com características anfipáticas, os quais se distribuem de forma heterogênea por toda a membrana (Bernardino de la Serra, *et al.*, 2016). Os principais fosfolípidios presentes na MP são a fosfatidilcolina e esfingomiélin, que compõem predominantemente o folheto externo, enquanto o folheto interno contém fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e fosfatidilinositol (Van Meer, *et al.*, 2008). Na composição da MP tem-se ainda lípidios (colesterol), carboidratos e proteínas especializadas (Figura 6) (Goñi, 2014; Bernardino de la Serra *et al.*, 2016).

Por apresentar numerosas funções vitais necessárias a sobrevivência da célula, a manutenção da integridade da MP é crucial para a preservação da viabilidade e da função celular normal. A natureza bioquímica desta estrutura celular torna-a susceptível a várias formas de lesões, ocasionadas por patógenos, substâncias químicas, radiação, respostas inflamatórias e estresse mecânico (Beller, *et al.*, 1976; McNeil, 1993; Iacovache, *et al.*, 2008; Corrotte, *et al.*, 2013; Zhen, *et al.*, 2021). De fato, a restauração defeituosa da MP está associada a um grande número de doenças, incluindo miopatias, distúrbios neurológicos centrais e periféricos e doenças coronarianas (Cooper, *et al.*, 2015).

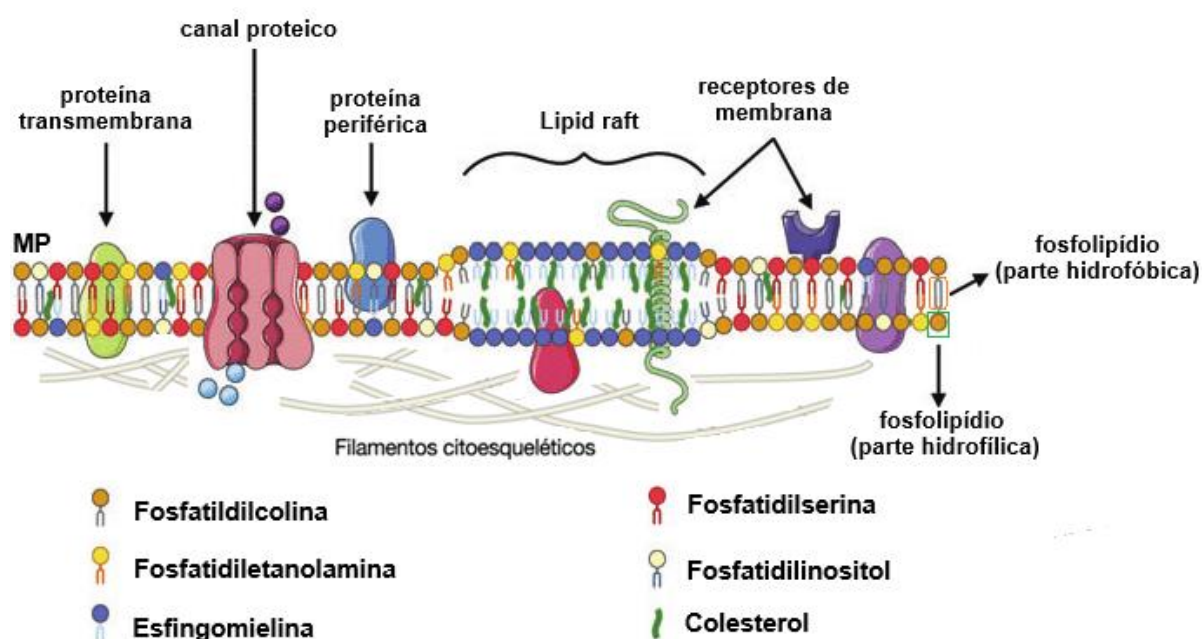


Figura 6: Modelo de mosaico fluido da MP. Representação esquemática do modelo de mosaico fluido da membrana plasmática (MP), evidenciando a diversidade de fosfolípidios e proteínas de membrana, bem como a presença de microdomínios lipídicos (lipid rafts) e a organização das regiões hidrofóbicas e hidrofílicas que caracterizam a bicamada lipídica. Figura adaptada (Chabanon *et al.*, 2016).

Assim, para assegurar a homeostasia celular após uma lesão, mecanismos moleculares e celulares foram adaptados evolutivamente para restaurarem a barreira entre os ambientes intracelulares e extracelulares, ao ressellar a bicamada lipídica. Diferentes vias de reparo de membrana (RM) têm sido descritos e são ativados de acordo com a espécie celular e ao tipo, local e extensão da lesão na MP, não sendo exclusivos nem restritos a certos tipos de células (Dias, *et al.*, 2021).

1.2.2) A sinalização de cálcio no Reparo de Membrana

Independentemente do(s) mecanismo(s) empregado(s), e do tipo de dano e célula afetada, o fator primordial de acionamento da maquinaria de reparo descrito tem sido o mesmo: o aumento no cálcio (Ca^{2+}) intracelular (McNeil, *et al.*, 2001; Reddy, *et al.*, 2001; Idone, *et al.*, 2008; Babiychuk, *et al.*, 2009; Corrotte *et al.*, 2013; Scheffer, *et al.*, 2015). O íon Ca^{2+} é uma molécula de sinalização celular evolutivamente conservada com diversas vias de sinalização dependentes que conferem ao cálcio diferentes funções celulares. Dentre elas a capacidade de iniciar mudanças conformacionais que sinalizam a contração muscular, transmissões sinápticas e função enzimática (Horn, *et al.*, 2018). As concentrações intracelulares de Ca^{2+} são rigidamente reguladas, porém diante de uma ruptura na MP ocorre um aumento intenso nos níveis de cálcio citosólico devido a um influxo de cálcio, do exterior para o interior da célula, através da lesão gerada (Ammendolia, *et al.*, 2021).

Este influxo de Ca^{2+} transitório, eleva o gradiente deste íon no interior celular e com isso ativa respostas celulares dependentes de diversas proteínas sensíveis ao Ca^{2+} e com uma ampla gama de afinidades de ligação com o mesmo, o que lhes permite montar variáveis respostas espacial e temporalmente localizadas (Horn, *et al.*, 2018). Estas respostas conduzem à remodelação do citoesqueleto, ao recrutamento de fatores de reparo e o tráfego de vesículas, que cooperativamente facilitam o fechamento da lesão (Raj; Gerke, 2025). A entrada de Ca^{2+} é proporcional ao tamanho e quantidade das lesões, e a magnitude e o momento em que este aumento precisa ocorrer para desencadear uma resposta de reparo eficiente são variáveis (Ammendolia, *et al.*, 2021).

Lesões de membrana menores que um nanômetro de diâmetro sofrem resselagem espontânea através da difusão dos lipídios ao redor da abertura, os quais fornecem a força motriz para selar a MP (Cooper *et al.*, 2015). No entanto lesões maiores impedem o reparo espontâneo da MP, pela força oposta da tensão da membrana ligada ao citoesqueleto ou a lâmina nuclear, sendo necessário o reparo ativo por constituintes celulares internos, para a restauração da integridade da membrana celular (Zhen, *et al.*, 2021). Os principais mecanismos de RM responsivos ao influxo de cálcio já descritos são o reparo por “patching”, por

brotamento e por endocitose (Miyake, *et al.*, 1995; Corrotte, *et al.*, 2013; Jimenez, *et al.*, 2014; Castro-Gomes *et al.*, 2014; Corrote; Castro-Gomes, 2019).

1.2.3) Principais mecanismos intracelulares de Reparo de Membrana

Os primeiros estudos sobre o RM conceberam como primeira hipótese para o resselamento da MP a formação de um bloqueio dinâmico temporário formado por vesículas citoplasmáticas e fusionadas entre si e com a MP (Figura 7). Neste processo celular, denominado de reparo de membrana por “patching”, o influxo de cálcio ativa o recrutamento das proteínas anexinas 6, 1, 2 e 5 (A6, A1, A2 e A5), que participam do reparo ao se unirem e formarem juntas um subdomínio externo (Croissant *et al.*, 2022). Outras proteínas como as Homology Domain (EHD), Myc box-dependent-interacting protein 1 (BIN1), denominadas proteínas de reparo, Mitsigumina-53 (MG53) e disferlina - em células musculares- também são translocadas e se organizam, compondo uma estrutura de suporte onde o subdomínio externo se fixa (Demonbreun, *et al.*, 2016).

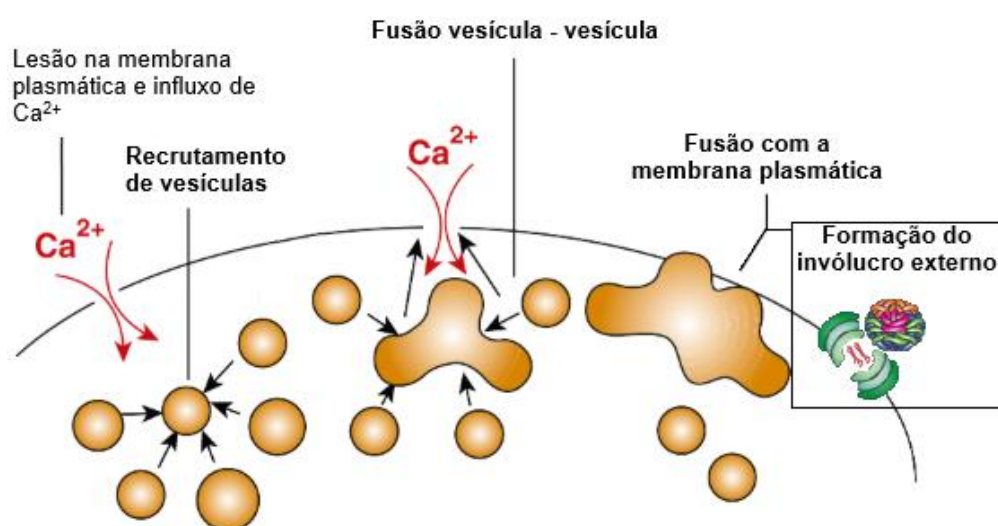


Figura 7: Hipótese do mecanismo de reparo por “patching”. O influxo de Ca^{2+} através da lesão da MP desencadeia o recrutamento de vesículas citoplasmáticas, as quais se fusionam com a MP e entre si, formando um bloqueio dinâmico temporário. Simultaneamente, ocorre o translocamento e a organização de diversas proteínas como Anexinas, EHD, BIN1, MG53 e disferlinas (em células musculares) que irão formar um subdomínio externo (em destaque). A integridade da MP é restaurada pela reconstituição da membrana e eliminação do subdomínio por exocitose. Figura adaptada (Andrews; Corrotte, 2018; Ebstrup *et al.*, 2021).

Simultaneamente a formação desse “invólucro”, o citoesqueleto e a bicamada lipídica passam por remodelamento, induzido pela exocitose lisossomal, que diminui a tensão da membrana e a ativação local das GTPases Rho, ocorrendo o recrutamento de filamentos de F-actina e miosina-2 para a borda da lesão, promovendo o fechamento da matriz de forma contrátil (Godin, *et al.*, 2011). Concluindo o reparo, o revestimento temporário é removido por exocitose (Idone, *et al.*, 2008; Bi, *et al.*, 1995). Embora os estudos sobre este mecanismo em células de mamíferos continuem escassos, o RM por “patching” continua a ser uma hipótese sugerida para o resselamento de danos maiores na MP, dado o acúmulo de compartimentos membranosos observados em locais da MP com lesões extensas (Ammendolia *et al.*, 2021).

Outro mecanismo proposto no âmbito de investigação sobre o RM celular, foi denominado “mecanismo de reparo por brotamento”. Pesquisas demonstraram que no RM por brotamento as áreas lesionadas da MP eram removidas e liberadas como vesículas extracelulares (Jimenez, *et al.*, 2014). Neste mecanismo ocorre o recrutamento e a participação do Complexo de Triagem Endossomal Necessário para o Transporte (complexo ESCRT) (Jimenez, *et al.*, 2014).

O complexo ESCRT, composto por cinco subcomplexos, ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III e a VPS4 ATPase, é fundamental na catalisação da fissão de membrana. Esse processo é indispensável para diversas funções celulares, entre elas a triagem endossomal. Nessa via, receptores ubiquitinilados são endocitados, agrupados na membrana endossômica e, em seguida, segregados em compartimentos que invaginam e brotam para a luz endossomal, originando os corpos multivesiculares (MVBs) (Odorizzi *et al.*, 1998; Vietri *et al.*, 2019). Além disso, o complexo ESCRT participa do fechamento do envelope nuclear após a divisão celular, da formação de vesículas durante a replicação viral e da abscisão da ponte intercelular no final da citocinese (McCullough, *et al.*, 2013; Vietri, *et al.*, 2020).

Durante o RM por brotamento, o cálcio liga-se a proteína ligante de cálcio ALG-2-interacting protein X (ALIX), ativando a translocação e o acúmulo do complexo ESCRT, em especial o ESCRTIII, na região lesionada, o qual será responsável por facilitar as alterações na arquitetura da membrana. O influxo de cálcio também irá promover o recrutamento e o acúmulo de proteínas “Vacuolar sorting protein 4”

(Vps4). Este conjunto irá promover a clivagem da membrana celular lesionada, gerando o desenvolvimento de pequenas vesículas extracelulares que sofrem eliminação através da excreção exocítica, permitindo assim, o resselamento da MP (Figura 8) (Scheffer, *et al.*, 2014; Castro-Gomes, *et al.*, 2014).

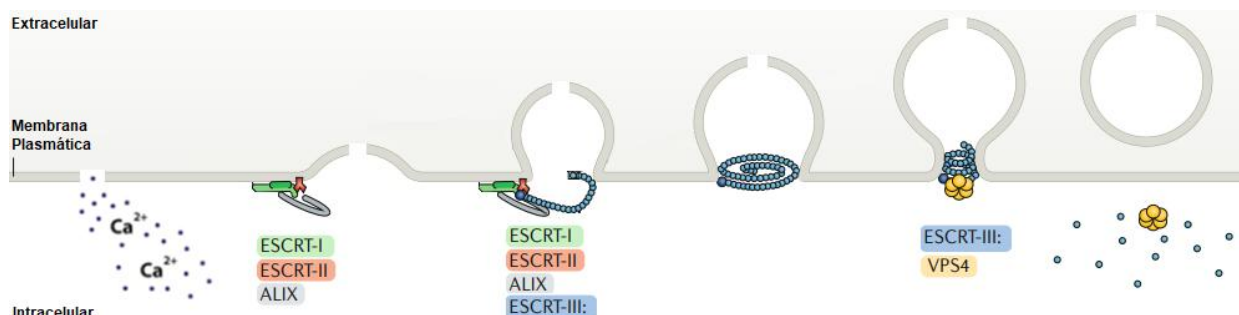


Figura 8: Mecanismo de reparo por brotamento. O influxo de Ca^{2+} liga-se a ALX ativando o recrutamento do complexo ESCRT e a subsequente translocação da proteína Vps4 para a região lesionada. Este conjunto irá promover alterações na arquitetura da MP gerando o desenvolvimento de pequenas vesículas extracelulares, e a clivagem da região lesionada, que será eliminada através da excreção exocítica, permitindo assim, o resselamento da MP. Figura adaptada (Vietri, *et al.*, 2020).

Por fim, o mecanismo de reparo por endocitose, o melhor descrito atualmente, demonstrou que a resselagem da MP também ocorria através da endocitose da região lesionada (Corrotte *et al.*, 2013). Este mecanismo de reparo inicia-se após o influxo de cálcio promover a migração e fusão de lisossomos na região da MP lesionada. Após essa ligação ocorre exocitose e liberação do conteúdo lisossomal (Rodriguez *et al.*, 1997; Söllner *et al.*, 1993, Bi *et al.*, 1995), resultando na formação de uma invaginação no local da lesão, inicialmente gerada por ceramidas resultantes da ação da esfingomielinase ácida (ASM) sobre a esfingomielina da MP (Tam *et al.*, 2010; Corrotte *et al.*, 2013; Castro-Gomes *et al.*, 2016).

A participação lisossomal nesse processo tem sido amplamente evidenciada pelo marcador LAMP-1 (Lysosome-Associated Membrane Protein-1), uma glicoproteína de membrana lisossomal utilizada para monitorar sua redistribuição (Rodríguez *et al.*, 1997; Couto *et al.*, 2020). Em condições basais, LAMP-1 apresenta um padrão predominantemente perinuclear, refletindo a localização habitual dos lisossomos. Entretanto, após a lesão da MP, ocorre sua mobilização para a periferia

celular, acompanhada da fusão lisossomal com a membrana plasmática e subsequente exocitose (Zhong *et al.*, 2023).

As proteases liberadas durante a exocitose lisossomal como cisteino protease (cisteína, catépsinas B e L) atuam na proteólise extracelular, ao agir sobre proteínas associadas à superfície celular e na remodelação e degradação da matriz extracelular, e facilitam o acesso da esfingomielinase ácida (ASM), enzima lisossomal, ao folheto externo da MP. A ASM é uma das enzimas que permanecem ativas extracelularmente após a secreção, e atua sobre a esfingomielina dos fosfolípidos da MP, removendo de forma hidrolítica a região da fosforilcolina da esfingomielina, gerando ceramida como produto, as quais auxiliam na curvatura e brotamento da região lesionada da MP dando progressão ao processo de RM por endocitose (Figura 9) (Castro-Gomes, *et al.*, 2016).

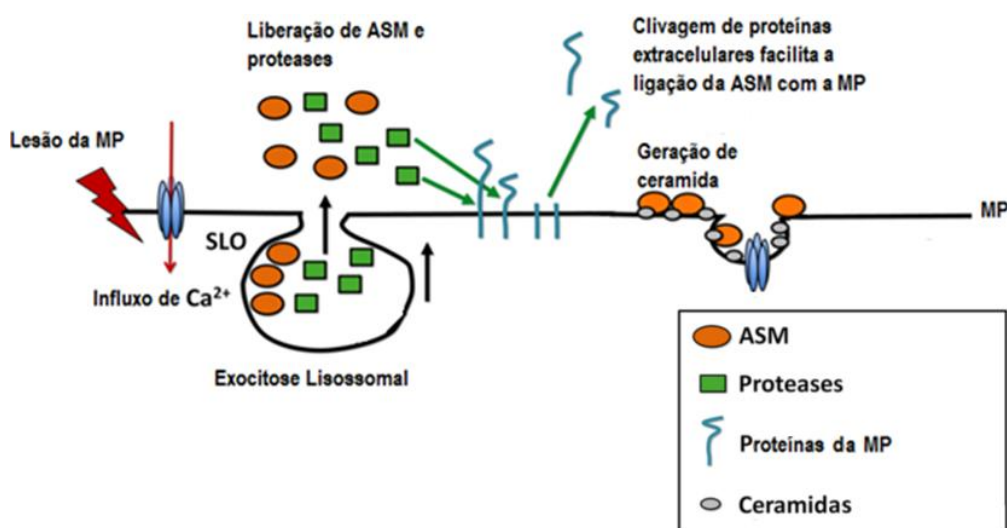


Figura 9: Mecanismo proposto para o RM através da modulação da exocitose lisossomal. O influxo de Ca^{2+} , através das lesões na MP, desencadeia rapidamente a exocitose lisossomal, a qual libera diversas proteases juntamente com a lipase ASM. As proteases clivam proteínas da superfície celular e contribuem para o acesso da ASM à MP e/ou a ativação da ASM. A ASM hidrolisa a esfingomielina no folheto externo do PM gerando ceramida, que promove o início da endocitose da lesão e o reparo da MP. Figura adaptada (Castro-Gomes, *et al.*, 2016).

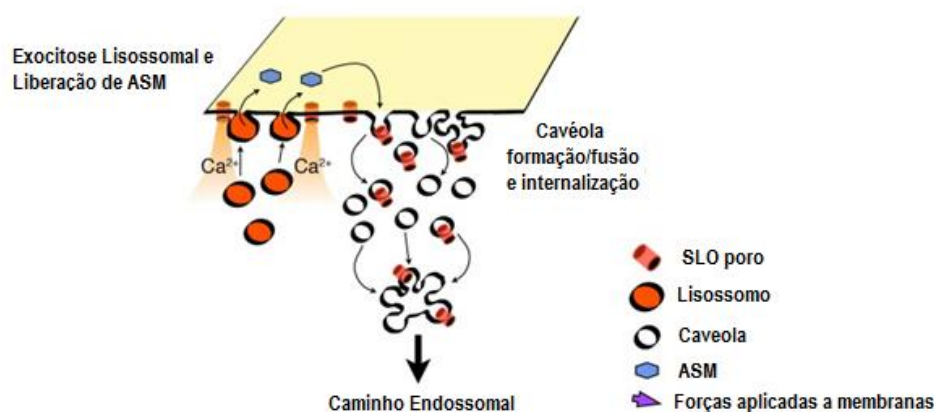
Nesse contexto, as alterações lipídicas induzidas pela ação da ceramida e a consequente reorganização da MP criam microdomínios especializados que favorecem o recrutamento de proteínas estruturais. Entre elas destacam-se as

caveolinas da família Cav-1 e Cav-2, amplamente distribuídas em diferentes tipos celulares, e as caveolinas da família Cav-3, restritas às células musculares (Corrotte *et al.*, 2013; Fridolfsson *et al.*, 2014). Essas proteínas são direcionadas para a área de invaginação recém-formada, onde desempenham papel essencial na estabilização e na dinâmica das vesículas envolvidas no reparo (Figura 10) (Corrotte *et al.*, 2013; Fridolfsson *et al.*, 2014).

Presentes principalmente na MP, mas também no complexo de Golgi, no retículo endoplasmático, nas vesículas e em localizações citosólicas, as caveolinas participam de vários processos celulares como o transporte vesicular, a homeostase do colesterol, a transdução de sinal e a supressão tumoral (Fridolfsson, *et al.*, 2014). No processo endocítico do RM essas proteínas se agregam na invaginação formada pela ceramida e conferem a continuação da invaginação, gerando uma vesícula que recebe o nome de cavéola (Palade, 1953; Rothberg, *et al.*, 1992; Scherer, *et al.*, 1996; Tang, *et al.*, 1996). Identificando-se como pequenas invaginações em forma de bulbo localizadas perto ou próximas a superfície da MP, as cavéolas são caracterizadas como micro domínios de membrana, regiões especialmente ricas em glicosíngolipídios, colesterol, proteínas ligadas a glicosilfosfatidil inositol (GPI-ancoradas) e caveolinas (Lo, *et al.*, 2016). Participam de vários papéis na fisiologia celular, servindo de plataforma para diferentes caminhos de sinalização tais como: pinocitose, transcitose e endocitose independente de clatrina.

A cavéola formada durante o processo de reparo pode ser única e estruturada sobre a lesão, de pequena extensão, entre 50–100 nm de diâmetro, (Figura 100A), ou múltiplas e estruturadas ao redor da lesão, quando esta é extensa, maiores que 100 nm de diâmetro (Rothberg *et al.*, 1992; Parton; Pozo; 2013). Neste último caso, as cavéolas fundem-se em determinado momento, formando uma vesícula endocítica única (Figura 10 B). A força gerada pela internalização das cavéolas realiza a constrição das bordas da membrana lesionada, propiciando o resselamento da MP, ao passo que a vesícula internalizada desvincula-se da MP levando consigo a região danificada para a via endocítica (Corrote *et al.*, 2013; Corrote *et al.*, 2014).

A Poros Transmembranares



B Lesão Mecânica

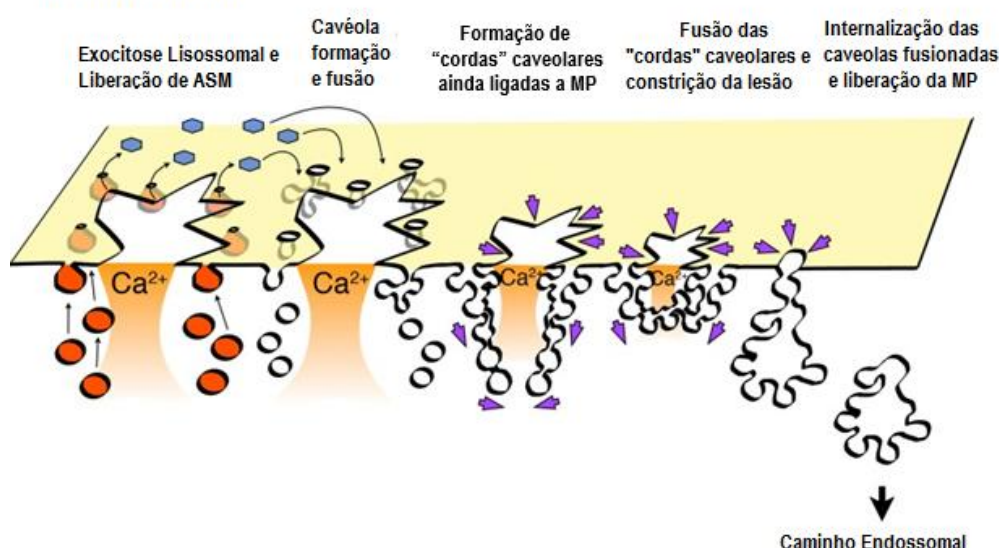


Figura 10: Modelo de reparo de MP mediado por endocitose caveolar. Em (A) a permeabilização com toxina formadora de poro ou em (B) uma lesão mecânica, desencadeiam o influxo de Ca^{2+} , a exocitose lisossomal e liberação de ASM, geram ceramidas no folheto externo da MP, processo que promove a internalização e fusão das cavéolas. A toxina é removida por endocitose caveolar (A), enquanto uma maior extensão da lesão na bicamada lipídica seria gradualmente constricta e resselada pelo resultado das forças geradas do agrupamento intracelular, fusão e internalização de cavéolas fusionadas (B). Figura adaptada (Corrotte, *et al.*, 2013).

Conforme destacado acima, existem vários mecanismos pelos quais as células promovem o reparo da MP. No entanto há diversas evidências sugerindo que diferentes mecanismos de reparo ocorrem em combinação para que uma resposta de reparo adequada seja elaborada (Dias, *et al.*, 2021). Além disso, os mecanismos de reparo celular não apenas cooperam durante a restauração da MP, mas as proteínas que participam desse processo também são compartilhadas (Dias, *et al.*,

2021). Assim, há diversas outras proteínas participantes do processo de RM, não limitadas a apenas um único mecanismo de reparo, resumidas por nome e função na Tabela 1 a seguir (Cooper, *et al.*, 2015; Zhen *et al.*, 2021).

TABELA 1. PRINCIPAIS PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NOS DIVERSOS MECANISMOS DE RM		
Proteínas	Principais Funções no RM	Tipos celulares/modelos experimentais
SNAREs	Mediação da fusão de vesículas intracelulares com a MP durante o reparo dependente de Ca^{2+}	Fibroblastos, mioblastos e células epiteliais (HeLa)
Anexinas	Sinalização do local de lesão; recrutamento e suporte para montagem de diversos maquinários de RM; fusão de membranas, modelagem, vedação e redução da tensão da MP	Células musculares, epiteliais e endoteliais
Disferlina	Atua na fusão de vesículas intracelulares e no resselamento da MP; participa do tráfego de vesículas e da liberação de vesículas extracelulares contendo fragmentos de membrana danificada	Mioblastos e miotubos (C2C12), fibras musculares esqueléticas humanas e murinas
Calpaína	Enzima dependente de Ca^{2+} ; envolvida na clivagem de proteínas do citoesqueleto; remodelação da MP durante o RM	Células musculares e epiteliais
Mistugunina-53 (MG53/TRIM72)	Sensor oxidativo que reconhece danos na MP e promove o recrutamento e a fusão de vesículas intracelulares no sítio de lesão	Miotubos, cardiomiócitos e células epiteliais alveolares
Fator de Liberação de Polimerase-1 e Transcriptase (PTRF/Cavin-1/Cav-p60)	Atua na estabilização e curvatura das cavéolas, contribuindo para a reorganização da membrana durante o reparo	Células musculares e endoteliais
Proteínas Motoras (microtúbulos/cinesina e actina/miosina)	Responsáveis pelo transporte de vesículas e organelas até o local da lesão e pela reorganização do citoesqueleto durante o reparo	Fibroblastos e células musculares

Afixina [β -Parvin/Proteína de Ligação à Quinase Ligada à Integrina (ILK)]	Media a ligação entre integrinas e o citoesqueleto, promovendo a reorganização estrutural necessária para o RM	Células epiteliais e musculares
Sinaptotagminas	Sensores de Ca^{2+} que regulam a exocitose lisossomal e a formação do complexo SNARE durante o reparo	Fibroblastos, macrófagos e miócitos
S100A10	Promove a ligação de membranas fosfolipídicas adjacentes e participa da ancoragem de anexinas e proteínas de reparo	Células epiteliais (HeLa) e musculares

Fonte: Elaboração própria a partir de Cooper *et al.*, (2015); Zhen *et al.*, (2021).

1.2.4) Papel do Reparo de Membrana na interação patógeno-hospedeiro

Microrganismos patogênicos intracelulares dependem de mecanismos específicos para conseguirem infectar e sobreviver em células hospedeiras. Para este propósito, como forma favorável para realizar a invasão celular, diversos patógenos subvertem as vias envolvidas nos processos celulares fisiológicos para seu benefício, entre eles a maquinaria de RM. Trabalhos realizados com patógenos intracelulares têm demonstrado a capacidade desses microrganismos de explorar os mecanismos de RM da célula hospedeira. Entre eles estão protozoários da espécie *Trypanosoma cruzi* (Fernandes *et al.*, 2011) e do gênero *Leishmania* (Cavalcante-Costa *et al.*, 2019), além de bactérias como *Neisseria gonorrhoeae* (Grassmé *et al.*, 1997) e diferentes espécies virais (Luisoni *et al.*, 2015). Para acessar o meio intracelular, esses patógenos manipulam vias endocíticas normalmente utilizadas pela célula hospedeira para reparo da MP (Horta *et al.*, 2020).

Neste trabalho iremos nos concentrar no protozoário flagelado intracelular obrigatório *T. cruzi*, causador da Doença de Chagas, também conhecida como Tripanossomíase Americana (Álvarez-Hernández, *et al.*, 2016).

A invasão celular por *T. cruzi* envolve uma série de interações complexas entre o microrganismo, a matriz extracelular e as células-alvo. Dentre os processos envolvidos na infecção destaca-se a ligação e o reconhecimento do parasito à

superfície da célula (adesão) e o desencadeamento de mecanismos específicos para internalização do parasito e formação do vacúolo parasitóforo (VP) (Rodriguez-Bejarano, *et al.*, 2021).

Capaz de infectar a maioria das células nucleadas, desde as células fagocíticas profissionais até as não profissionais, sendo estas últimas o foco principal do parasito, o *T. cruzi* exibe diversas proteínas e glicoproteínas em sua superfície celular, que se ligam a receptores específicos presentes na célula hospedeira, promovendo a adesão à MP (Hissa; Andrade, 2016). Entre as moléculas deste protozoário destacam-se as mucinas, as transialidases, as glicoproteínas da família gp85/Tc85, os polissacarídeos, e os lipídios ancorados ao fosfatidilinositol, além de outras proteínas integrais da membrana envolvidas no reconhecimento celular (Rodriguez-Bejarano, *et al.*, 2021).

No hospedeiro, diversas classes de receptores participam desse processo, incluindo lectinas (como galectinas), integrinas, receptores de bradicinina (B₁ e B₂), receptores Toll-like (principalmente TLR2 e TLR4), e receptores de TGF- β (Barrias, *et al.*, 2019). Além desses, outros receptores têm sido relacionados à interação entre o *T. cruzi* e a célula hospedeira, como os receptores tirosina-quinase (TrkA e TrkC) e os proteoglicanos de heparana sulfato (HSPGs) (Nde *et al.*, 2023). Também participam desse processo os receptores associados à matriz extracelular, como fibronectina e laminina, que atuam de forma coordenada para favorecer a adesão e a invasão celular pelo parasito (Nde *et al.*, 2023).

Pesquisas recentes demonstram que o *T. cruzi* utiliza-se de diversos mecanismos de invasão celular. Estes são dependentes do tipo de cepa do parasito, da forma evolutiva e do tipo de célula hospedeira (Ferri; Endreia, 2021; Rodrigues-Bejarano *et al.*, 2021). A interação do *T. cruzi* com a MP pode desencadear a sinalização de Ca²⁺ bem como o recrutamento lisossomal, fatores fundamentais na modulação do RM em células nucleadas de mamíferos (Tardieux *et al.*, 1994).

Neste modelo de invasão celular, a forma infectante do parasito (tripomastigotas) interage com a célula-alvo por múltiplos mecanismos, incluindo a expressão de moléculas de superfície (Burleigh *et al.*, 1995; Burleigh *et al.*, 1998; Caler *et al.*, 1998; Yoshida, 2006) e liberação de vesículas extracelulares (Bayer-Santos *et al.*, 2013; Bayer-Santos *et al.*, 2014). Adicionalmente, participam do

processo a proteína formadora de poros produzida pelo protozoário (Tc-Tox) e a motilidade flagelar, que promove a deformação mecânica da bicamada lipídica, evento ativo que requer gasto de energia (Rodriguez-Bejarano *et al.*, 2021; Won *et al.*, 2023).

Essas interações promovem a sinalização de Ca^{2+} no interior da célula hospedeira, o que, por sua vez, desencadeia o recrutamento e a fusão de lisossomos no sítio de invasão do parasito na membrana plasmática, facilitando a internalização do tripomastigota (Andrews *et al.*, 1989; Tardieux *et al.*, 1992; Fernandes *et al.*, 2011).

A liberação do conteúdo lisossomal promove a ativação da via endocítica de reparo, com a formação de uma vesícula endocítica enriquecida com ceramida. Durante o processo de internalização, a vesícula endocítica transporta consigo o protozoário, caracterizando o vacúolo parasitóforo (VP), que posteriormente se funde a lisossomos, originando o fagolisossomo (Figura 11) (Fernandes, *et al.*, 2011; Fernandes, *et al.*, 2012).

A subversão da maquinaria de RM é um recurso explorado por diversos microrganismos intracelulares, incluindo o *T. cruzi*. Nesse contexto, a capacidade do parasito de manipular vias celulares essenciais, como aquelas associadas ao influxo de Ca^{2+} e ao recrutamento lisossomal, representa um fator determinante para a eficiência da invasão e, conseqüentemente, para o estabelecimento da infecção, dada a relevância desses mecanismos no tropismo tecidual e na persistência do parasito no hospedeiro (Fernandes *et al.*, 2012; Andrade, 2019). Dessa forma, compreender o *T. cruzi* pressupõe não apenas elucidar seus mecanismos de invasão celular, mas também conhecer o seu ciclo de vida e os processos patogênicos que culminam na Doença de Chagas.

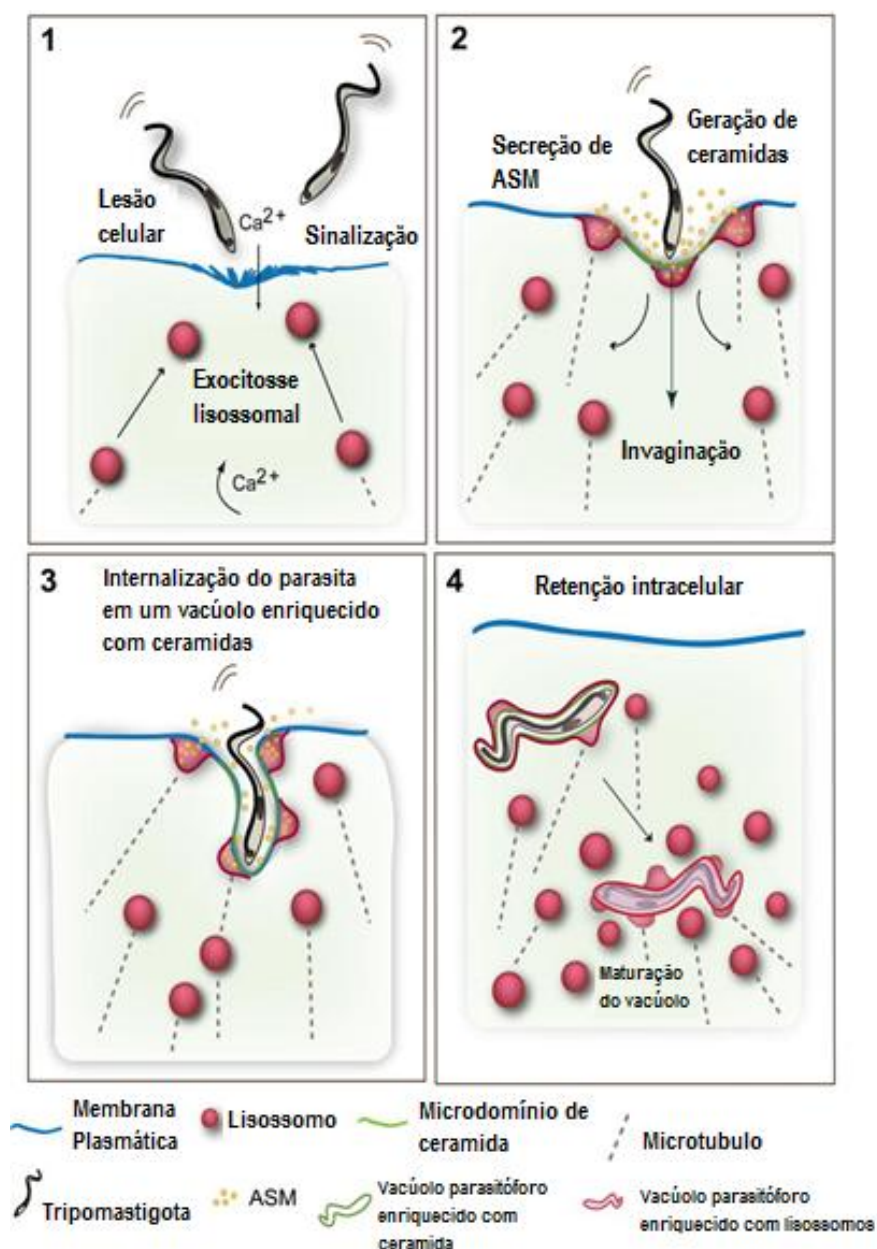


Figura 11: Modelo de invasão de células por *T. cruzi* mediada por reparo da MP por endocitose.

Em (1) tripomastigotas geram uma lesão na membrana celular, causando influxo de Ca^{2+} extracelular e exocitose lisossomal. Eventos de sinalização também geram transientes citosólicos de Ca^{2+} . Em (2) a liberação extracelular de ASM lisossomal gera ceramida no folheto externo da MP. Em (3) os microdomínios da MP facilitam a internalização do tripomastigota, e lisossomos se fundem com o vacúolo parasitóforo nascente, liberando ASM e gerando mais ceramida. Em (4) os tripomastigotas internalizados que residem em vacúolos parasitóforos fundem-se com lisossomos adicionais, levando à retenção do parasito no interior celular. Figura adaptada (Fernandes, *et al.*, 2012).

1.3) *Trypanosoma cruzi*

1.3.1) Características Gerais

Pertencente à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, gênero *Trypanosoma*, e subgênero *Schizotrypanum*, o *T. cruzi* exibe três principais formas evolutivas: tripomastigota, epimastigota e amastigota, sendo capaz de parasitar em diferentes populações de hospedeiros vertebrados, como em mamíferos e invertebrados, por exemplo, em insetos vetores (Álvarez-Hernández, *et al.*, 2018).

O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* envolve dois hospedeiros, definitivo e intermediário, e apresenta variações em sua forma e estrutura celular. Essas alterações incluem a perda de certas organelas, como o flagelo nas formas amastigotas, e a aquisição de novas estruturas, como a membrana ondulante nos tripomastigotas. (Tyler, *et al.*, 2002; Martín-Escolano *et al.*, 2022). A forma amastigota caracteriza-se pelo seu formato circular ou ovoide, com pouco citoplasma e núcleo grande, onde o flagelo é retido na bolsa flagelar. Constitui a forma replicativa do protozoário, apresentando-se no interior das células dos hospedeiros infectados, principalmente macrófagos e células musculares cardíacas (Burleigh, *et al.*, 1995; Álvarez-Hernández *et al.*, 2018). É considerada a forma evolutiva de hospedeiros vertebrados (Figura 12 A).

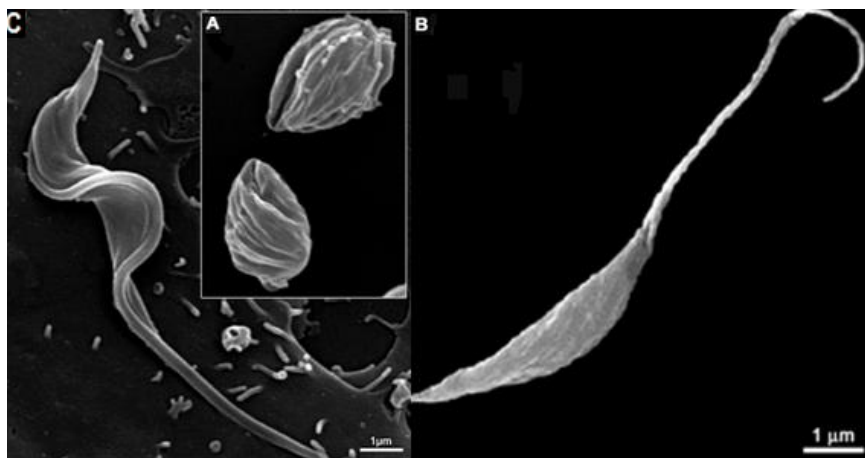


Figura 12: Microscopia eletrônica de varredura das principais formas evolutivas do *T. cruzi*. Em (A) forma amastigota. Em (B) forma epimastigota. Em (C) forma tripomastigota (Gonçalves, *et al.*, 2018).

No interior do hospedeiro intermediário (vetor), o protozoário se apresenta como epimastigota. A forma epimastigota é considerada a fase transitória entre a amastigota e tripomastigota. O epimastigota tem formato fusiforme, bem alongado e membrana ondulante visível e associada ao flagelo, que emerge perto da metade da célula é contínuo com a membrana ondulante até se tornar livre na ponta da extremidade anterior do protozoário. Apresenta uma intensa atividade reprodutiva e é encontrado, mais especificamente, no intestino do inseto vetor. A forma epimastigota, é a forma evolutiva de hospedeiros invertebrados (Martins, *et al.*, 2012; Martín-Escolano *et al.*, 2022) (Figura 12 B).

No vetor, no intestino posterior, a forma epimastigota diferencia-se para a forma tripomastigota metacíclico, tornando-se capaz de infectar outro hospedeiro, ao ser eliminado através das fezes ou urina do vetor. A forma tripomastigota apresenta duas formas: tripomastigota sanguíneo e tripomastigota metacíclico. O tripomastigota sanguíneo é ágil e percorre o sangue periférico do hospedeiro vertebrado. Exibe-se em forma de C ou S com extremidades afiladas e um cinetoplasto globoso. O tripomastigota metacíclico, é a forma mais infectante, e penetra as células do hospedeiro vertebrado. Apresenta tolerância às altas temperaturas, e têm capacidade de atravessar mucosas além de aderir fortemente à membrana celular das células-alvo (Figura 12 C) (Tyler, *et al.*, 2002, Cucunubá *et al.*, 2024).

No hospedeiro definitivo (homem) a infecção por *T. cruzi*, inicia-se após a entrada da forma tripomastigota metacíclica no interior na corrente sanguínea, onde então inicia a invasão celular. Após infectar as células do hospedeiro, o protozoário escapa do vacúolo parasitóforo, através da destruição desse vacúolo pela proteína formadora de poros (proteína Tc-Tox) e no citoplasma celular, diferencia-se em amastigota passando por sucessivas replicações (Figura 13) (Ley, *et al.*, 1990; Burleigh, *et al.*, 1995; Ferri; Edreira, 2021).

Após preencher todo o citoplasma da célula, as formas amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas que rompem a membrana celular da célula hospedeira, e seguem para a corrente sanguínea, para a infecção de novas células (Tyler, *et al.*, 2002; Martín-Escolano *et al.*, 2022).

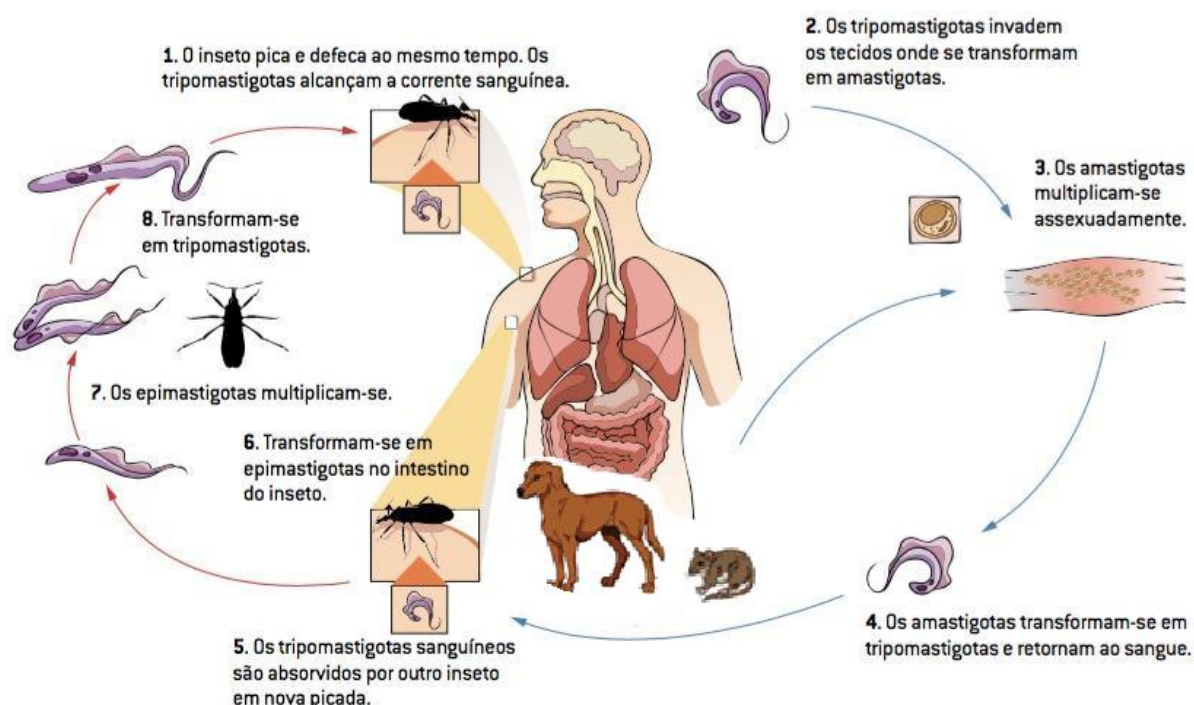


Figura 13: Ciclo evolutivo do *T. cruzi* em hospedeiro intermediário e hospedeiro definitivo. Eliminado através das fezes ou urina do vetor hospedeiro, o protozoário em sua forma tripomastigota metacíclica adentra a pele humana, por lesão ou fissura. Ocorre, então, a invasão celular, escape do vacúolo parasitóforo e, no interior da célula infectada, a diferenciação para a forma amastigota, que passa por sucessiva replicação. Ainda no interior celular as formas amastigotas diferenciam-se novamente em tripomastigota e rompem a célula, extravasando para o meio extracelular e seguem para infectar novas células e tecidos. Parasitos livres na corrente sanguínea podem ser absorvidos durante o repasto sanguíneo do inseto vetor e no interior deste permanecem na forma epimastigota, diferenciando-se em tripomastigotas ao alcançar o intestino. Figura adaptada (CDC, 2021).

1.3.2) Doença de Chagas: Epidemiologia, Imunologia e Tratamento

Afetando cerca de 6-7 milhões de pessoas e causando dez mil mortes por ano em todo o mundo, a patologia causada pela infecção por *Trypanosoma cruzi*, conhecida como Doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana, é uma enfermidade crônica que apresenta um importante impacto na saúde pública mundial, principalmente na América latina, onde é endêmica (Figura 14) (WHO, 2018).

A Doença de Chagas pode ser transmitida de forma horizontal, (através da picada de vetores biológicos – triatomíneos-, transfusão de sangue, órgãos, via oral, e de forma vertical (via congênita) (Álvarez-Hernández, *et al.*, 2018).

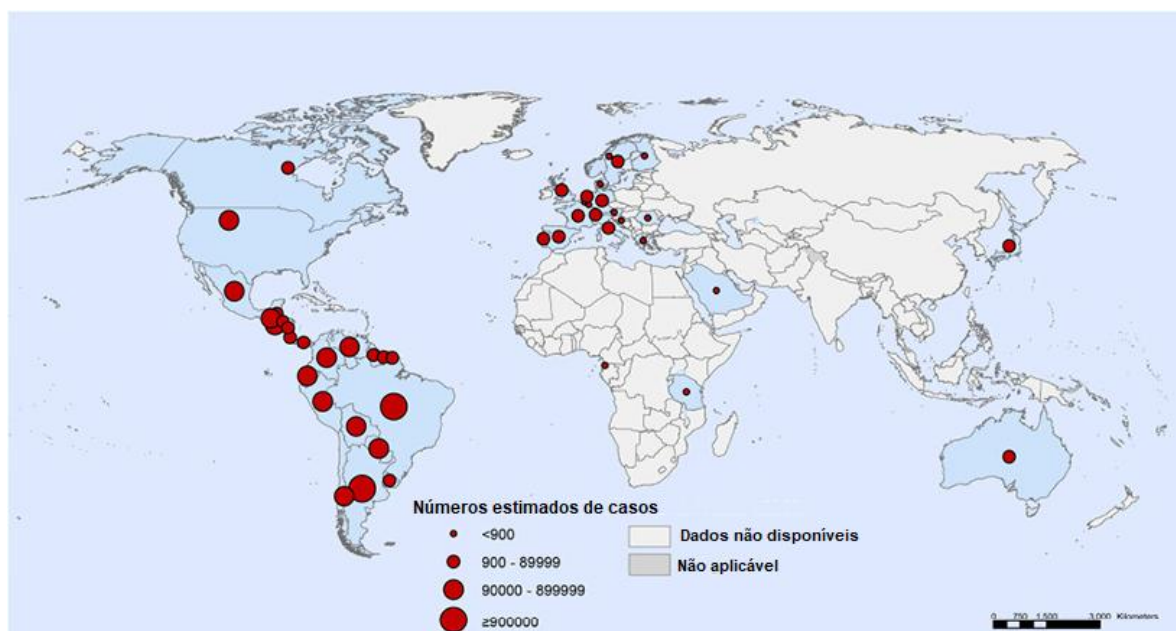


Figura 14: Distribuição do número de casos estimados da doença de Chagas no mundo em 2018. Região das Américas do Sul e Central apresentam a maioria da incidência da doença de Chagas no mundo. Figura adaptada (WHO, 2018).

Foi descrito que o controle dos vetores (principal forma de transmissão do protozoário) tem sido eficaz, porém, a transmissão por via oral através do consumo de alimentos contaminados com o Triatomíneo ou suas fezes, como no açaí, tornou-se uma forma importante e preocupante de manutenção do ciclo epidemiológico do *T. cruzi* (Dias, *et al.*, 2006, Cucunubá *et al.*, 2024).

A infecção por *T. cruzi* exibe duas fases clínicas distintas (fase aguda e fase crônica). O período onde pode-se observar intensa replicação do protozoário, tripomastigotas na corrente sanguínea e ninhos de amastigotas em diferentes órgãos, compreende a fase aguda da Doença de Chagas, e é caracterizada por uma intensa atividade imune local e sistêmica. Inicialmente desencadeia-se a resposta imunológica inata, onde há o recrutamento de macrófagos, células dendríticas e células NK, que apresentam papel indispensável na proteção contra o *T. cruzi*; com produção de Óxido Nítrico (ON) e secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-12, IFN- γ , TNF- α e IL 1 β (Boscardin, *et al.*, 2010; Acevedo, *et al.*, 2018).

Potencializando a resposta imunológica inata, ocorre ativação dos componentes do sistema imune adaptativo como os Linfócitos B, T CD4+ e T CD8+, que auxiliam no controle da parasitemia através de inúmeros mecanismos, incluindo

a atividade citolítica, a produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β), pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α) e neutralização por anticorpos (Cardillo, *et al.*, 2015). As principais alterações clínicas que podem ser observadas são mal-estar, cefaléia, astenia, hiporexia, edema, hipertrofia de linfonodos hipertermia, sinal de Romaña (edema bipalpebral), chagoma, entre outros sinais inespecíficos (Nóbrega, *et al.*, 2009; Cucunubá *et al.*, 2024).

A atividade do sistema imunológico é capaz de controlar a infecção e eliminar o protozoário da corrente sanguínea, porém o *T. cruzi* por apresentar inúmeros mecanismos de evasão, permanece no organismo, em equilíbrio com o hospedeiro, o que caracteriza a fase crônica da infecção. Nesse estágio ocorre a predominância de células T CD8+, citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias (IFN- γ , IL-10), e de anticorpos (Gomes, *et al.*, 2003; Albareda *et al.*, 2006; Natale *et al.*, 2018). A fase crônica persiste por toda a vida do paciente, que pode se tornar um portador sintomático (manifestando sintomas como palpitação, dispneia, edema, dor precordial, tosse, tonturas, desmaios, acidentes embólicos extrassístoles) ou portador assintomático, sendo o último o mais comum.

Uma pequena parcela de infectados evoluem para a forma cardíaca (cardiomiopatia chagásica) ou digestiva (megacólon e/ou megaesôfago) da doença, geradas por uma reativação do sistema imunológico e reação inflamatória desbalanceada no sítio da infecção, provocando lesões teciduais associadas a morbidade e mortalidade dos pacientes chagásicos (Boscardin, *et al.*, 2010; Alba-Alvarado *et al.*, 2023).

Nenhum tratamento proposto tem sido capaz de eliminar o parasito do paciente. Atualmente, apenas duas drogas têm sido utilizadas no combate a infecção por *T. cruzi*: Benznidazol e Nifurtimox (Sales *et al.*, 2017). Ambos os medicamentos são de atividade tripanocida, porém apresentam baixo sucesso terapêutico durante a fase crônica da Doença de Chagas, ao contrário da eficácia exibida durante a fase aguda dessa patologia. Outro fator negativo associado ao uso desses fármacos são os inúmeros efeitos adversos manifestados pelos pacientes (Álvarez-Hernández, *et al.*, 2018). Com isso têm-se buscado medidas terapêuticas alternativas, que apresentem eficácia contra a infecção e efeitos colaterais reduzidos no paciente.

1.3.3) Importância do metabolismo lipídico na resposta imune durante a infecção por *Trypanosoma cruzi*

A relação parasito-hospedeiro é o fator mais importante para determinar se uma infecção é bem-sucedida ou reprimida pelo hospedeiro. Vários mecanismos estão envolvidos nessa complexa interação, e a capacidade do *T. cruzi* de interferir nos mecanismos efetores celulares tem se mostrado essencial na sobrevivência do protozoário no interior do organismo parasito (Nardy *et al.*, 2015).

Entre os diversos mecanismos de evasão demonstrados por diferentes autores, pode-se citar a produção de enzimas antioxidantes, que garantem proteção contra as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio lisossomal (Piacenza *et al.*, 2013). Outro exemplo é o escape do ambiente oxidativo do fagolisossomo por meio da ação da toxina formadora de poros (Tc-Tox) (Andrews *et al.*, 1990). Outros mecanismos envolvem a inibição da ativação do Sistema Complemento (Ferreira *et al.*, 2004), e a renovação de moléculas de superfície, incluindo as mucinas ancoradas a GPI (GPI-mucinas), que dificultam a opsonização do parasito (Buscaglia *et al.*, 2006). Além desses mecanismos, a infecção por *T. cruzi* promove a modulação do metabolismo celular do hospedeiro, estimulando a biogênese de Corpúsculos Lipídicos (CLs), estruturas que atuam na regulação de mediadores inflamatórios e constituem um importante mecanismo de evasão do sistema imune.

Os Corpúsculos Lipídicos (CLs) são organelas citoplasmáticas, dinâmicas, multifuncionais, presentes em microrganismos e células eucarióticas, responsáveis pela regulação da homeostase lipídica, participando do armazenamento de lipídios neutros (Almeida *et al.*, 2018). Além de sua função metabólica basal, essas estruturas celulares podem ser moduladas em contextos infecciosos e inflamatórios (Ribeiro *et al.*, 2024; Toledo *et al.*, 2016). Nesse cenário, o metabolismo lipídico é ajustado de forma a favorecer a imunossupressão, um processo associado ao aumento da biogênese de CLs. Essas organelas atuam como locais de síntese e estocagem de mediadores imunossupressores, incluindo a prostaglandina E_2 (PGE_2) e o leucotrieno B_4 (LTB_4), os quais interferem na resposta inflamatória e retardam a ativação de mecanismos protetores (D'Avila *et al.*, 2006; Almeida *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2014; Libbing *et al.*, 2019). Nesse contexto, os CLs também se

inserir como um mecanismo de evasão explorado pelo *T. cruzi*, auxiliando sua sobrevivência ao modular vias metabólicas e imunológicas do hospedeiro (Pereira-Dutra *et al.*, 2019).

O interesse pelos CLs cresceu devido ao seu papel na regulação lipídica, na sinalização inflamatória e na resposta imune (Zhang *et al.*, 2024). Atualmente estudos têm demonstrado que os CLs são organelas importantes associadas com doenças metabólicas e inflamatórias, incluindo diabetes, aterosclerose, obesidade, câncer, alergia, doenças neurodegenerativas e inúmeras doenças infecciosas causadas por diversos patógenos como parasitos, bactérias, vírus e protozoários (Zadoorian *et al.*, 2023).

Trabalhos realizados com *Mycobacterium bovis* BCG demonstraram que o microrganismo induz a biogênese de CLs, mediada por receptores do tipo Toll 2 (TLR2) (D'Avila, *et al.*, 2006), como também pela via de sinalização relacionada com a ativação do Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissomos-gamma (PPAR γ) em macrófagos (Almeida, *et al.*, 2009; Almeida, *et al.*, 2014). Durante a infecção em células HeLa por *Chlamydia trachomatis*, observou-se um aumento na quantidade de CLs, utilizados pelo parasito como fonte de lipídios e proteínas (Kumar, *et al.*, 2006). Na infecção por *Mycobacterium leprae* em macrófagos e em células de *Schwann*, o aumento na produção de CLs também foi detectado (Mattos, *et al.*, 2010, Mattos, *et al.*, 2011, Mattos, *et al.*, 2012).

Em infecções por protozoários, a participação de CLs tem sido amplamente documentada. Rodriguez-Acosta A *et al.*, (1998) descreveram que a infecção por *Plasmodium berghei* induziu a formação de grande quantidade de CLs em hepatócitos (Rodríguez-Acosta *et al.*, 1998). Gomes A *et al.*, (2014) demonstraram que, durante a infecção por *Toxoplasma gondii* em células musculares, também ocorre aumento na biogênese de CLs (Gomes A *et al.*, 2014). Além disso, Ribeiro *et al.*, (2024) observaram um aumento no número de CLs durante a infecção por *Leishmania infantum* em macrófagos (Ribeiro *et al.*, 2024).

Na infecção por *T. cruzi*, D'Ávilla H *et al.*, (2011) constataram alterações no metabolismo lipídico, com aumento no número de CLs em macrófagos infectados (D'Ávilla, *et al.*, 2011; Almeida *et al.*, 2018). Pesquisas como a de Nicolaou *et al.*, (2012) relataram a participação de receptores de reconhecimento de padrões na

geração de sinais que induzem a formação de CLs (Nicolaou *et al.*, 2012; Pereira-Dutra, *et al.*, 2019). A principal família de receptores de reconhecimento de padrões com grande capacidade de detecção de diversos patógenos são os receptores do tipo toll (TLR) (Pereira-Dutra, *et al.*, 2019).

Estudos realizados por nosso grupo demonstraram que o *T. cruzi* induz um aumento na biogênese de CLs na célula hospedeira, particularmente em macrófagos murinos. Essa modulação ocorre por meio da ativação do receptor Toll-like 2 (TLR-2) e é amplificada pela captação de células apoptóticas em um mecanismo dependente de integrinas e TGF- β (Figura 15) (D'Ávila *et al.*, 2011; Almeida *et al.*, 2018).

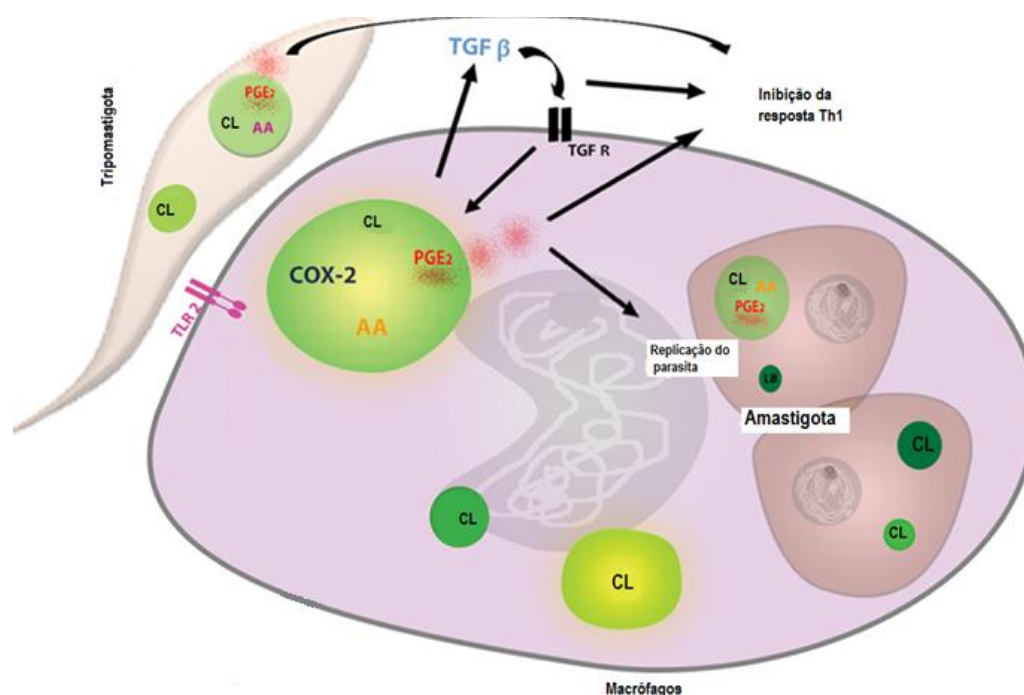


Figura 15: Formação de Corpúsculos Lipídicos em resposta à interação macrófago - *T. cruzi*. Figura adaptada (Almeida, *et al.*, 2018).

A ativação desses receptores estimula a expressão de genes relacionados à liponeogênese, incluindo proteínas estruturais dos CLs, como a proteína relacionada à diferenciação adiposa (ADRP). Formados no retículo endoplasmático, os CLs acumulam-se no citoplasma e interagem com fagolisossomos contendo tripomastigotas, promovendo a liberação de colesterol e triacilgliceróis, que servem como fonte de lipídios para o crescimento do protozoário (Pereira-Dutra, *et al.*, 2019).

Além de sua função metabólica, os CLs também participam da modulação da resposta imune do hospedeiro durante a infecção. A ativação de TLR-2 pelo *T. cruzi* induz a biossíntese e secreção de mediadores inflamatórios, como a prostaglandina E₂ (PGE₂), produzida no interior dos CLs pela via da ciclooxygenase-2 (COX-2) a partir do ácido araquidônico (Kalinsky, 2013; Toledo *et al.*, 2016). A PGE₂ contribui para a evasão imunológica ao suprimir as funções efetoras de macrófagos e neutrófilos, inibir respostas mediadas por células Th1 e NK e reduzir a produção de quimiocinas, dificultando o recrutamento de células pró-inflamatórias e favorecendo a persistência do parasita (Kalinsky, 2013; Toledo *et al.*, 2016).

Diversos protozoários, incluindo *Leishmania donovani*, espécies de *Plasmodium* e *Trypanosoma*, também apresentam CLs em sua constituição (Flaspohler *et al.*, 1997; Toledo *et al.*, 2016; Almeida *et al.*, 2018; Vallochi *et al.*, 2018). No *T. cruzi* (Figura 15), acredita-se que essas organelas atuem como fontes de carbono e lipídios (Souza, 2009; Charron *et al.*, 2002; Meer-Janssen *et al.*, 2010) e que funcionem como sítios de síntese de PGE₂ pelo próprio parasita (Toledo *et al.*, 2016).

1.4) Corpúsculo Lipídico: Uma organela dinâmica

Também conhecidos como adipossomas, estas organelas citoplasmáticas são revestidas por uma monocamada externa formada por fosfolipídios (Tauchi-Sato, *et al.*, 2002; Bartz, *et al.*, 2007) e proteínas estruturais e funcionais (Zadoorian *et al.*, 2023). De maneira geral, os CLs apresentam um núcleo formado por lipídios neutros, como triacilgliceróis (TAGs) e ésteres de esterol (EE), e diversas outras moléculas (Figura 16) (Kuerschner, *et al.*, 2008; Czabany, *et al.*, 2008; Cheng, *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2018).

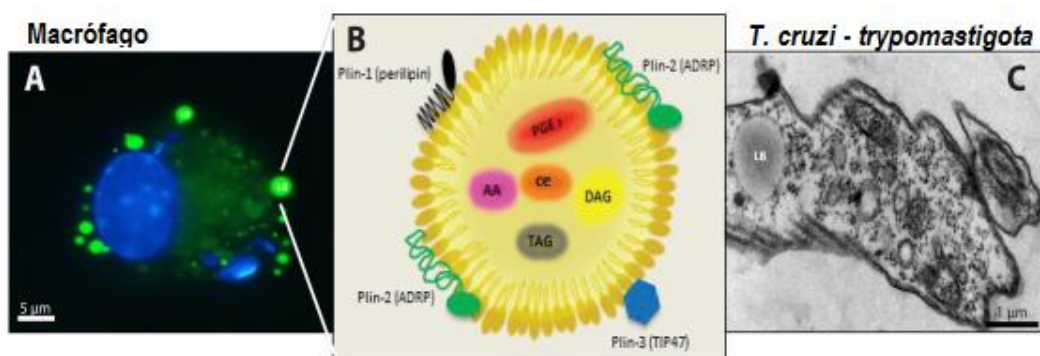


Figura 16: Aspectos morfológicos de Corpúsculos lipídicos (CLs). Em (A), Imunofluorescência mostrando o acúmulo de CLs (verde) em macrófagos infectados murinos após coloração com BODIPY R 493/503. Núcleos de macrófagos e parasitos internalizados foram corados com DAPI (40,6-diamidino-2-phenylindole) (azul). Em (B) desenho esquemático ilustrando a estrutura e composição de CLs. Estas organelas encontram-se delimitadas apenas por uma monocamada de fosfolipídios e principalmente proteínas da família PAT. Em seu núcleo pode se encontrar prostaglandina E2 (PGE2), ácido-araquidônico (AA), diacilglicerol (DAG), triacilglicerol (TAG) e estéreis de colesterol (CE). Em (C) Microscopia eletrônica mostrando um CL em um tripomastigota de *T. cruzi*. LB- Corpúsculo Lipídico (Almeida, *et al.*, 2018).

As principais proteínas associadas aos CLs descritas atualmente são as proteínas da família PAT, que compreende as perilipinas (PLIN): Perilipina 1 (PLIN 1), Perilipina 2 (PLIN 2), também conhecida como proteína relacionadas com a diferenciação de adipócitos (ADRP) ou adipofilina; Perilipina 3 (PLIN 3), também conhecida como proteína de interação da porção terminal de 47 quilodaltons (TIP47), S3-12 e OXPAT (Digel *et al.*, 2010, Skinner *et al.*, 2013; Mahajan *et al.*, 2015; Zadoorian *et al.*, 2023). Presente tanto na superfície dessas organelas, quanto em seu interior, essas proteínas estão relacionadas na montagem, estocagem, biogênese, incorporação e acúmulo de lipídios em diferentes tipos de células (Almeida PA *et al.*, 2018).

Outras proteínas também compõem o conteúdo proteico dos CLs. Entre elas estão as proteínas da família das Rabs, o fator de ribosilação de ADP (ARF), pequenas GTPases, tubulina-1 e caveolinas. Esses componentes estão associados ao tráfego vesicular, à fusão de membranas e à interação com o citoesqueleto (Blanchette-Mackie *et al.*, 1995; Bartz *et al.*, 2007; Ozeki *et al.*, 2005; Olzmann, 2019).

Também destacam-se, proteínas envolvidas na sinalização celular, como as proteínas-quinases (Fujimoto *et al.*, 2004), e proteínas e enzimas ligadas à

homeostase lipídica, incluindo lipases, fosfolipases (Fujimoto *et al.*, 2001; Brasaemle *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2024), acetil-CoA sintetase, acetil-CoA carboxilase, esqualeno epoxidase, lanosterol sintase, triglicerídeo lipase e álcool desidrogenase (Olzmann, 2019). Além disso, os CLs são também depósitos intracelulares de Ácido Araquidônico (AA) e proteínas envolvidas na síntese de eicosanoides, como fosfolipases A Ciclooxygenases (COXs), 5 e 15- lipooxygenases (5-LO e 15-LO), leucotrieno C4 sintase e MAP-quinases e prostaglandinas (PGE's) (Bozza, *et al.*, 1998; D'Ávilla, *et al.*, 2011; Olzmann, 2019).

Os CLs podem ser elétron-densos, abundante em fosfolipídios, ou elétron-lúcidos, abundante em lipídios neutros (Almeida *et al.*, 2018; Zadoorian *et al.*, 2023). O número, tamanho, o conteúdo e elétron-densidade dos CL podem variar de acordo com o tipo a função celular e a condição e estímulos às quais a célula foi submetida (Bozza, *et al.*, 2007; Almeida *et al.*, 2018).

A biogênese de corpúsculos lipídicos (CLs) em células eucarióticas tem início com o acúmulo de lipídios neutros — como triacilgliceróis (TAG) e ésteres de colesterol — entre os folhetos da bicamada fosfolipídica do retículo endoplasmático (RE) (Zhang *et al.*, 2024). Esse acúmulo é promovido por enzimas específicas de síntese de lipídios que atuam localmente, e a região resultante pode se desprender do RE quando o acúmulo lipídico atinge um limite crítico (Figura 17) (Olzmann *et al.*, 2019). A forma exata como esse desprendimento ocorre ainda é tema de investigação; contudo, a hipótese mais aceita sugere que o processo se dá por brotamento do folheto citosólico do RE, mediado por proteínas como perilipinas 1 e 3, em áreas especializadas da organela (Guo, *et al.*, 2009; Olzmann *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2024).

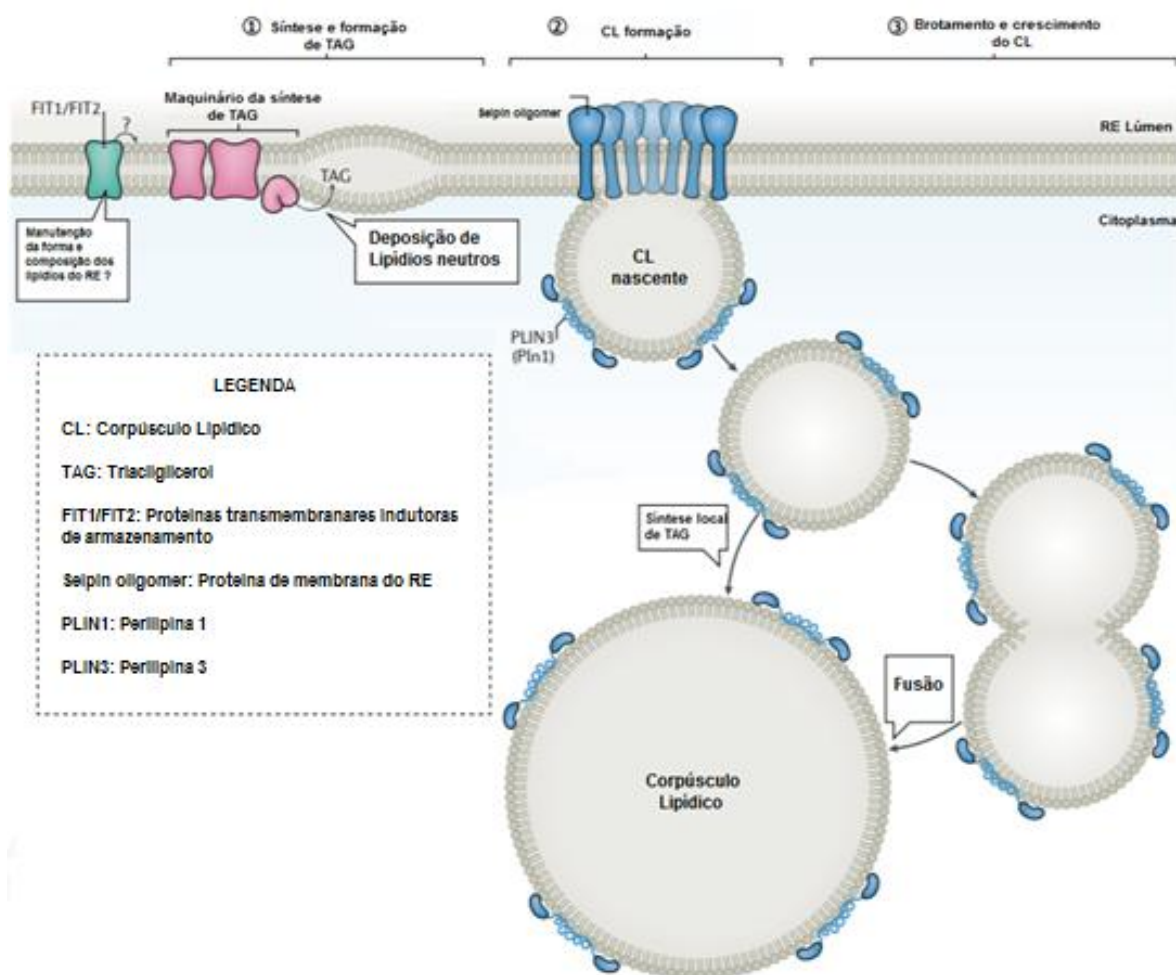


Figura 17: Desenho esquemático do modelo de biogênese de Corpúsculos Lipídicos. Modelo do domínio RE, onde ocorre o brotamento do CL pelo folheto citosólico. Proteínas transmembranares 1 e 2 (FIT1/FIT2) e o maquinário da síntese de TAG depositam lipídios neutros entre os folhetos do RE. Seipin oligomer e outros fatores importantes da biogênese dos CLs como perilipinas 1 e 3 são recrutados para o local e facilitam o crescimento do CL nascente. Após uma concentração limite o CL se desprende, aumentando ou não seu volume por síntese localizada de lipídios ou por fusão. Figura adaptada (Olzmann, *et al.*, 2019).

Neste modelo as enzimas de síntese de triacilglicerol (TAG) e de síntese de éster de colesterol depositam lipídios neutros entre os folhetos do RE. A forma e a composição no folheto do RE são moduladas pelas proteínas transmembranares da família FIT (FIT1/FIT2), indutoras do armazenamento de lipídios (Zadoorian, *et al.*, 2023). Além disso, proteínas estruturais como a seipina oligomérica e outros fatores importantes da biogênese dos CLs como perilipinas 1 e 3 são recrutados para o local, atuando na organização e crescimento do CL nascente (Kumari, *et al.*, 2023). Quando a deposição de lipídios alcança uma concentração limite, a região do RE com esta formação se desprende, envolta em uma monocamada fosfolipídica

proveniente do folheto citoplasmático do RE (Olzmann, *et al.*, 2019). Após formados os CLs podem aumentar seu volume, por síntese localizada de lipídios ou por fusão (Olofsson, *et al.*, 2009; Olzmann *et al.*, 2019).

Complementando essa via morfogenética, a formação de CLs também é controlada por mecanismos moleculares de regulação transcricional, especialmente por meio de fatores como SREBP (Proteína de Ligação ao Elemento Regulador de Esterol) e PPAR γ (Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissoma Gama). Esses reguladores pertencem, respectivamente, às famílias bHLH-LZ (basic Helix-Loop-Helix com zíper de leucina) e à superfamília dos receptores nucleares ativados por lipídios, respectivamente e desempenham papéis complementares na lipogênese e no armazenamento de lipídios (Almeida, *et al.*, 2009; Almeida, *et al.*, 2014; Gao, *et al.*, 2019).

Enquanto os SREBPs, especialmente a isoforma SREBP-1c, promovem a transcrição de genes envolvidos na síntese de ácidos graxos e TAGs (FAS, ACC, DGAT), o PPAR γ , ativado por ácidos graxos e seus derivados, atua como um regulador mestre da adipogênese e do armazenamento lipídico, formando heterodímeros com o receptor RXR e controlando a expressão de genes envolvidos na captação, esterificação e estocagem de lipídios. Essas duas vias atuam de forma complementar, sendo o SREBP mais associado à produção de lipídios, e o PPAR γ à acumulação e organização desses lipídios em CLs (Gao, *et al.*, 2019; Tanigawa, *et al.*, 2021; Soares, *et al.*, 2023).

Além de sua importância metabólica, essas vias são fundamentais na biogênese de corpúsculos lipídicos durante processos infecciosos, visto que diversos patógenos intracelulares, como *Mycobacterium tuberculosis* (Guerrini *et al.*, 2018; Sarkar *et al.*, 2025), *Leishmania amazonensis* (Chan *et al.*, 2012; Mukherjee *et al.*, 2014), *Trypanosoma cruzi* (Penas *et al.*, 2017; Ayyappan *et al.*, 2020) e vírus, como o da hepatite C (Hepatitis C virus) (Kim *et al.*, 2007), induzem a ativação de SREBP e PPAR γ . Essa ativação promove a remodelação do metabolismo da célula hospedeira, favorecendo a formação de corpúsculos lipídicos que funcionam como reservatórios energéticos, fontes de membranas e plataformas para replicação ou evasão imunológica. (Kim *et al.*, 2007; Guerrini, *et al.*, 2018; Penas, *et al.*, 2017; Ayyappan *et al.*, 2020; Sarkar *et al.*, 2025). Assim, a ativação coordenada dessas

vias não só garante a homeostase lipídica, mas também modula a resposta da célula frente a agentes infecciosos, sendo alvo de interesse crescente em estudos sobre imunometabolismo e infecções intracelulares, permitindo assim, que os CLs emergjam como organelas multifuncionais, situadas no centro da interface entre metabolismo, inflamação e infecção (Toobian, *et al.*, 2021).

Diante do contexto apresentado e da reconhecida capacidade da fotobiomodulação de modular processos celulares fundamentais, especialmente em situações de estresse celular e infecção, este estudo propõe analisar o impacto da irradiação com LBP sobre a integridade da MP, o metabolismo lipídico, a regulação de processos inflamatórios e a dinâmica da infecção por *T. cruzi*. A MP constitui um elemento central da homeostase celular, uma vez que sua lesão desencadeia respostas adaptativas complexas, envolvendo sinalização inflamatória, reorganização metabólica e alterações estruturais que podem influenciar diretamente a sobrevivência celular e a interação com patógenos intracelulares.

Embora estudos prévios apontem efeitos benéficos da fotobiomodulação em diferentes modelos biológicos, ainda são escassas as investigações que integrem, de forma sistemática, a análise da estabilidade estrutural da MP e da modulação do metabolismo lipídico em células musculares, especialmente diante de um desafio infeccioso. Nesse sentido, a exploração dos efeitos do LBP em mioblastos, *in vitro*, permite não apenas aprofundar a compreensão de seus mecanismos de ação em nível celular, mas também avaliar como essa terapia pode influenciar a suscetibilidade das células à infecção por *T. cruzi*, contribuindo para o entendimento da interação parasito–hospedeiro. Dessa forma, o presente estudo se insere em um contexto relevante e atual ao investigar como a fotobiomodulação interfere em processos celulares essenciais, oferecendo base teórica para a utilização fundamentada dessa terapia em condições fisiopatológicas associadas à lesão celular e à infecção.

2. JUSTIFICATIVA

Apesar dos avanços recentes nos estudos sobre Fotobiomodulação, ainda existem lacunas significativas no entendimento dos efeitos do laser de baixa potência (LBP) nos níveis celular e molecular. As alterações bioquímicas, fisiológicas e imunológicas induzidas nas células irradiadas permanecem pouco compreendidas e continuam sendo objeto de investigação. Diante desse cenário, o presente estudo propõe elucidar os mecanismos de ação do LBP sobre processos celulares fundamentais, como o reparo da membrana plasmática (MP), o metabolismo lipídico e a resposta inflamatória, em mioblastos, *in vitro*. Além disso, busca-se compreender se tais alterações podem interferir no curso de infecções intracelulares e, eventualmente, favorecer estratégias de invasão de patógenos, como o *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Propomos como hipótese deste trabalho que a fotobiomodulação com LBP modula de forma coordenada o reparo de membrana, o metabolismo lipídico e a resposta inflamatória, influenciando a suscetibilidade das células à infecção por *T. cruzi*, *in vitro*.

3. OBJETIVOS

3.1) OBJETIVO GERAL

Analisar, *in vitro*, os efeitos da irradiação com Laser de Baixa Potência (LBP) sobre a integridade da membrana plasmática (MP), os eventos celulares associados à resposta à lesão de MP, a modulação inflamatória e o metabolismo lipídico em mioblastos, na presença ou ausência de infecção por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), bem como seu impacto sobre o curso da infecção.

3.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste estudo foram analisar, em mioblastos, *in vitro*, os efeitos da irradiação prévia com LBP sobre:

- 1) A viabilidade celular, na presença ou ausência de infecção por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*);
- 2) O influxo de Ca^{2+} ;
- 3) A dispersão lisossomal;
- 4) A morfologia e a ultraestrutura da MP;
- 5) O curso da infecção por *T. cruzi*;
- 6) O metabolismo lipídico celular, na presença ou ausência de infecção por *T. cruzi*;
- 7) A síntese de PGE_2 e de citocinas inflamatórias, na presença ou ausência de infecção por *T. cruzi*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1) Cultura *in vitro* de C2C12

Mioblastos da linhagem celular C2C12, um subclone de células C2 derivadas de músculo esquelético de camundongos (Blau *et al.*, 1983), foram gentilmente cedidos pela Prof.^a Dra. Andréa Henriques Pons (Fiocruz). Estoques celulares foram preparados e mantidos congelados em nitrogênio líquido, em criotubos contendo meio de congelamento apropriado, para preservação a longo prazo. Após o descongelamento, as células foram cultivadas em monocamada a 37 °C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Invitrogen) e 1% de antibióticos penicilina e estreptomicina (PS; Gibco). Os cultivos foram mantidos até atingirem aproximadamente 60–70% de confluência, sendo as repicagens realizadas a cada 2–3 dias.

Após a tripsinização, as células foram centrifugadas em tubo falcon a 250 x g, 4°C por 5 minutos (centrífuga multispeed ThermoScientific IEC CL31R, rotor T41 * 11210435), ressuspendidas em meio DMEM suplementado (2% de SFB e 1% de PS), plaqueadas em placas de 6 poços ou em garrafas de cultura de 75 cm², na concentração de 1x10⁵ células/poço.

4.2) Laser de Baixa Potência

As culturas de mioblastos, mantidas em monocamada, foram irradiadas utilizando o Laser de Baixa Potência (LBP) (Photon Laser III, DMC Equipamentos Ltda., São Carlos, Brasil), gentilmente cedido pela Profa. Dra. Flávia Paoli (UFJF), de acordo com os parâmetros descritos na Tabela 2. O equipamento permite o ajuste da energia total emitida, tendo sido programado, em todos os experimentos, para o valor de 30 J, conforme indicado no visor do aparelho. A irradiação foi aplicada de forma pontual, abrangendo todo o diâmetro do poço (34,8 mm), contendo 2 mL de DMEM (com vermelho de fenol), e realizada na penumbra, a fim de evitar a influência

de outras fontes de luz. Considerando a energia total efetivamente entregue por aplicação e a área real irradiada do poço, a fluência (J / cm²) foi calculada e expressa na Tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros dosimétricos utilizados para irradiação com o LBP.

Comprimento de onda (nm) (Infravermelho)	Potência de saída (mW)	Distância entre o laser e o fundo da placa (cm)	Dose (J/cm ²)	Área irradiada	Energia (J)	Tempo de irradiação (segundos)	Modo	Nº de sessões
808	100	8	0,8	9,60 cm ²	0,7	8	Contínuo	1

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2022).

4.3) *Trypanosoma cruzi* e infecção *in vitro*

Os parasitos em sua forma epimastigota foram gentilmente cedidos pelo Dr. Célio Freire-de-Lima (UFRJ) e mantidos em estoques congelados em nitrogênio líquido, em criotubos contendo meio de congelamento apropriado, para preservação a longo prazo, pelo laboratório de Biologia Celular da UFJF. Culturas de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), clone Dm 28c, epimastigotas, foram incubadas em meio de infusão BHI (Brain Heart Infusion; Kasvi) à 27°C contendo cerca de 100% de epimastigotas. Posteriormente os parasitos foram diluídos em meio artificial que simula a urina de triatomíneo (TAUP) (190 mM NaCl, 8 mM de tampão de fosfato pH 6,0, 17 mM KC1, 2 mM de CaCl₂, 2 mM MgCl₂) suplementado com 2,5% (v/v) de bicarbonato de sódio a 1,4%, 10 mM de L-prolina, para uma concentração final de 5x 10⁶ parasitos/ml para a sua diferenciação em sua forma tripomastigota metacíclica. Após 3 - 4 dias de diferenciação, os parasitos incubados em TAUP foram centrifugados a 1000 x g durante 15 min à temperatura ambiente e ressuspensos em meio DMEM sem SFB para posterior infecção.

As culturas de mioblastos, previamente irradiadas ou não com LBP, foram infectadas com *T. cruzi* diferenciado na forma tripomastigota metacíclica, utilizando

uma multiplicidade de infecção (MOI) de 3:1. Após 24 hrs de exposição aos parasitos, os tripomastigotas não internalizados foram removidos por lavagens com PBS, e as células foram novamente incubadas em meio fresco por mais 24 hrs, totalizando 24 horas efetivas de infecção para as análises subsequentes.

4.4) Grupos Experimentais

Nesta pesquisa, foram utilizadas culturas de mioblastos organizadas em quatro grupos experimentais, consistiram em: (1) mioblastos não irradiados e não infectados (controle); (2) mioblastos previamente irradiados e não infectados (LBP); (3) mioblastos infectados não irradiados (*T. cruzi*); e (4) mioblastos previamente irradiados e infectados (LBP + *T. cruzi*). Após a infecção, as culturas foram mantidas por 24 horas em placas de 6 poços. Em seguida, os parasitos não internalizados foram removidos por lavagem com PBS, e as células foram incubadas por mais 24 horas. Ao final do período experimental, as culturas foram preparadas para análises posteriores (Figura 18).

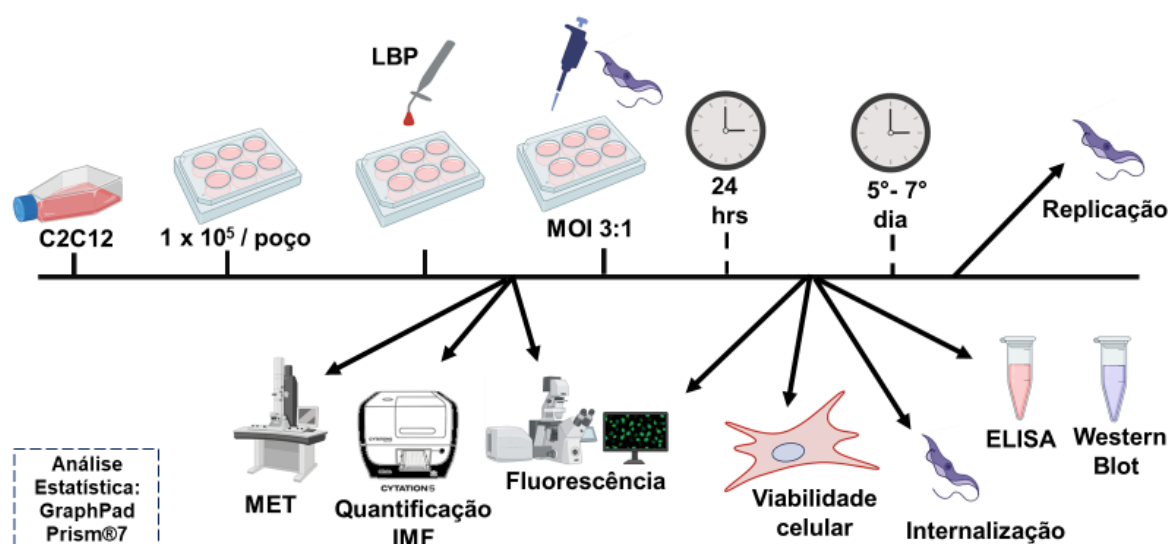


Figura 18: Delineamento Experimental. Representação esquemática do delineamento e das metodologias empregadas, resumindo a sequência de procedimentos e técnicas utilizadas na comparação entre os grupos experimentais.

4.5) Análise da viabilidade celular com Azul de Trypan

O teste de viabilidade celular por Azul de Trypan em culturas aderentes, sem uso da câmara de Neubauer, foi realizado diretamente nas placas de cultivo (Uzuner S, 2018). Os grupos mioblastos não irradiados e não infectados (controle), mioblastos previamente irradiados e não infectados (LBP), mioblastos infectados apenas (*T. cruzi*), e mioblastos previamente irradiados e infectados (*LBP + T. cruzi*), foram lavados 3 vezes com PBS. Em seguida adicionou-se a solução de Azul de Trypan a 0,4% sobre as células (volume suficiente para cobrir o fundo do poço, geralmente 200 µL por poço) e a incubação ocorreu por 5 minutos. Em sequência, o meio com o corante foi removido e as células foram lavadas com PBS.

As células viáveis permaneceram incolores, enquanto as células mortas retiveram o corante e apresentaram citoplasma azul, evidenciando perda de integridade de membrana. A avaliação foi feita diretamente ao microscópio óptico em campo claro, com contagem manual de um número fixo de células (100), em cinco campos, calculando-se assim a porcentagem de viabilidade com base na proporção de células vivas e mortas observadas. As quantificações foram feitas em triplicata. O número de células viáveis foi representado graficamente utilizando o programa GraphPad Prism®7 (GraphPad Software).

4.6) Ensaio com Iodeto de Propídio

Para as análises de reparo de membrana (RM), as placas contendo mioblastos foram lavadas 3 vezes com 1000 µl de meio DMEM sem Ca^{2+} (Gibco), com EGTA, quelante de Ca^{2+} (Sigma), a 10 mM ou com 1000 µl de meio DMEM contendo Ca^{2+} (Gibco). Em seguida as células foram irradiadas com o LBP ou não, em temperatura de 4°C, para inibição da endocitose durante o período de irradiação.

Quatro minutos após a irradiação, o meio foi retirado e substituído por 1 ml de meio DMEM com Ca^{2+} ou DMEM sem Ca^{2+} . Em seguida, as placas foram deixadas por cinco minutos a temperatura de 37°C e após este tempo, foi acrescentado

solução de Iodeto de Propídio (IP) (Sigma) a 30 µg/ml por poço. Após quatro minutos as células foram analisadas utilizando o microscópio de fluorescência invertido Nikon Eclipse TS100 sob objetiva de 40x, e software CellSens Dimension. As quantificações foram feitas em triplicata sendo contados 50 núcleos por poço. O número de núcleos positivos para IP foi representado graficamente utilizando o programa GraphPad Prism®7 (GraphPad Software).

4.7) Ensaio de influxo de cálcio

O ensaio de influxo de cálcio foi realizado na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em colaboração com a Profa. Dra. Luciana Andrade de acordo com Luo *et al.*, (2011). Para o ensaio os mioblastos foram plaqueados em placas de fundo de vidro confocal de 24 poços (Sigma) a $1,0 \times 10^5$ células, em meio DMEM à 2% de SFB, e 24 h depois, incubadas com uma sonda de cálcio fluorescente. O Fluo-4/AM (Thermo Fisher) a 5 µM, diluído em tampão HBSS suplementado com 0,01% de ácido Pluronic (Pluronic F-127) e 2,0 mM de probenecida (Sigma), por 50 minutos a 37 °C, em ambiente escuro (Luo J *et al.*, 2011). Após a incubação, as células foram lavadas três vezes com HBSS e mantidas nesse tampão durante a aquisição dos sinais fluorescentes. As placas foram então levadas ao Cytation 5 Imaging Reader (BioTek), onde as células foram expostas às seguintes condições experimentais: meio de cultura (controle) e irradiação prévia com LBP. Em seguida, foram imediatamente submetidas à análise da medida de intensidade de fluorescência por meio do software Gen5 (BioTek). A fluorescência emitida pelo Fluo-4/AM foi registrada utilizando filtros com excitação em 494 nm e emissão em 516 nm. A análise foi realizada com quantificação da intensidade média de fluorescência por poço, permitindo a comparação da dinâmica basal da sinalização de cálcio intracelular entre os grupos controle e irradiado. Os dados quantitativos obtidos foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism®7 (GraphPad Software).

Além da leitura de fluorescência no Cytation 5 Imaging Reader (BioTek), foi realizada aquisição de imagens, adaptada ao protocolo de Luo *et al.*, (2011). Para isso, foi utilizado o microscópio de fluorescência Axio ZEISS Axio Vert.A1. A placa

de cultura foi posicionada sobre o chassi do microscópio e realizou-se a captura fotográfica da mesma área antes e após a irradiação com LBP. Essa abordagem permitiu a avaliação visual da dinâmica da fluorescência em mioblastos sob as condições experimentais.

4.8) Análise de dispersão de lisossomos

Para a análise de dispersão de lisossomos, mioblastos C2C12 foram cultivados em placas de 24 poços, na densidade de 5×10^4 células por poço. As células foram submetidas ou não à irradiação prévia com LBP. Um minuto após a irradiação, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4%. Após 24 horas, foram lavadas 3X com PBS, bloqueadas e permeabilizadas em solução de PBS contendo 2% de BSA e 0,5% de saponina (PBS/BSA/Saponina) por 20 minutos. As células foram incubadas com anticorpo primário IgG anti-LAMP1 de rato (DSHB, 1D4B), diluído 1:50 (20 µg/ml), em 100 µL por poço, durante 45 min. Após esse período, as células foram lavadas novamente, 3x, com PBS/BSA/Saponina e incubadas com anticorpo secundário Alexa Fluor 488® (Thermo Fisher, nº de catálogo A11006) por 30 minutos. Após a imunomarcação, os núcleos foram corados com DAPI (Invitrogen), utilizado para marcação nuclear. As imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência (Olympus BX53 adaptado ao equipamento X-Cite Series 120Q Lumen Dynamics) e analisadas no software ImageJ (NIH, EUA).

Seguindo o protocolo descrito por Couto N. *et al.* (2020), o núcleo celular foi delimitado no canal DAPI, e a região perinuclear (ROI) foi definida a partir do raio nuclear (r), expandido em $0,5r$. A partir dessa delimitação, regiões concêntricas adicionais, progressivamente maiores (anéis), foram geradas sucessivamente por meio da ferramenta ROI Manager e da operação XOR, produzindo áreas crescentes em direção à membrana plasmática (MP) (Figura 19). Para cada ROI foram obtidos os valores de área e intensidade integrada de fluorescência (IntDen), corrigidos pelo fundo médio. A intensidade foi normalizada pela respectiva área, e a intensidade de fluorescência dos lisossomos foi obtida medindo a fluorescência da célula inteira e dividindo a fluorescência de cada região perinuclear por esta fluorescência total,

permitindo assim estimar a distribuição relativa da fluorescência lisossomal ao longo da célula (Couto *et al.*, 2020).

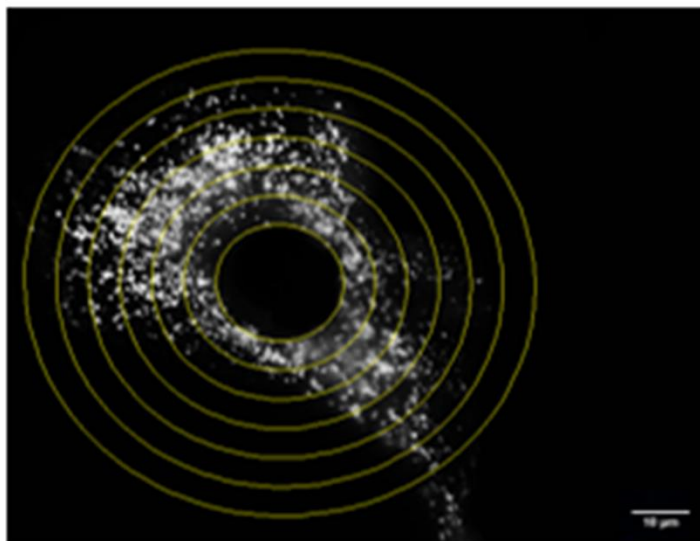


Figura 19: Imagem ilustrativa da definição das áreas ao redor do núcleo utilizadas para quantificação da distribuição de lisossomos marcados com fluorescência. Utilizando o software ImageJ, foram delimitadas regiões concêntricas em direção à membrana plasmática, com base na razão entre a distância média ao centro nuclear e o raio nuclear médio, conforme descrito por Couto *et al.*, (2020). Em cada região foi medida a intensidade de fluorescência, permitindo visualizar e analisar a redistribuição dos lisossomos.

Os dados foram organizados em função da distância média das vesículas ao centro nuclear / raio nuclear médio. A fluorescência média foi expressa em porcentagem em cada região, possibilitando a construção de perfis de dispersão. Para comparação entre grupos (controle e tratado), os valores em triplicata foram analisados por two-way ANOVA seguida do teste de Tukey, bem como pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, considerando os efeitos de tratamento, distância e interação, utilizando o programa GraphPad Prism®7 (GraphPad Software).

4.9) Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foi realizada na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em colaboração com a Profa. Dra. Luciana Andrade. Mioblastos não irradiados (controle) ou irradiados com LBP foram fixados

com glutaraldeído a 2,5% (Sigma) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) por 1 hora à temperatura ambiente. Com o objetivo de preservar eventos ultraestruturais precoces associados a um possível processo de RM, a fixação foi realizada imediatamente após a irradiação prévia com LBP. Em seguida, as células foram lavadas com o mesmo tampão, coletadas com um raspador e submetidas a uma pós-fixação utilizando uma solução contendo tetróxido de ósmio a 1% (OsO₄, Sigma), ferricianeto de potássio a 0,8% e CaCl₂ a 2,5 mM, também por 1 hora. Após essa etapa, as amostras foram lavadas e desidratadas em uma série crescente de concentrações de acetona (30% a 100%).

As células foram então embebidas em resina PolyBed na proporção 1:1 (acetona: resina) por 12 horas, seguida de imersão em resina pura por mais 14 horas, antes da polimerização, realizada a 60 °C por 72 horas. Cortes ultrafinos foram obtidos com facas de diamante em um ultramicrotomo (Leica UC7), recolhidos em grades de cobre e corados com acetato de uranila a 6% por 30 minutos e citrato de chumbo a 2% por 5 minutos. As imagens foram obtidas em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-20-SuperTwin FEI, operando a 200 kV. As micrografias foram registradas com câmera digital de alta resolução acoplada ao equipamento. Para cada grupo experimental, ao menos 20 campos representativos foram analisados.

4.10) Quantificação da infecção por *T. cruzi*

As culturas de mioblastos, mantidas em placas de 6 poços, irradiadas previamente ou não (controle) com o LBP, foram infectadas com *T. cruzi* diferenciado em sua forma tripomastigota metacíclica, na Multiplicidade de Infecção (MOI) de 3:1. Após 24 h de exposição aos parasitos, os tripomastigotas não internalizados foram retirados pela lavagem com PBS e as células foram incubadas por mais 24 horas, mantidas em meio fresco por mais 24 hrs, totalizando 24 horas efetivas de infecção, e em seguida fixadas com formalina a 3,7%.

Posteriormente as amostras foram coradas com DAPI (VECTASHIELD® mounting medium containing DAPI 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) para a marcação dos protozoários

internalizados das células infectadas. As imagens foram obtidas através do microscópio de fluorescência invertido Nikon Eclipse TS100, com objetiva de 40x e software CellSens Dimension. O número de parasitos intracelulares foi determinado contando 50 células individuais. A contagem foi realizada utilizando o software ImageJ. O número de parasitos internalizados foi representado graficamente utilizando o programa GraphPad Prism®7 (GraphPad Software).

4.11) Ensaio de replicação e sobrevivência do *Trypanosoma cruzi*

Para a quantificação da replicação e sobrevivência dos parasitos, mioblastos, infectados *in vitro* com *T. cruzi*, foram previamente irradiados, ou não (controle) com LBP. Após 24 h de exposição aos parasitos, os tripomastigotas não internalizados foram retirados pela lavagem com PBS e as células foram incubadas por mais 24 horas incubadas em meio fresco por mais 24 hrs, totalizando 24 horas efetivas de infecção. Após a infecção, as células foram mantidas a 37 °C em incubador com 5% de CO₂ por 7 dias. Durante esse período, não houve troca completa do meio, mas foram adicionados 500 µL de meio DMEM suplementado (2% SFB, 1% PS) nos dias 3 e 6 para manter a viabilidade celular.

No 5º e 7º dia pós-infecção, 10 µL do sobrenadante de cada grupo experimental foram diluídos em 390 µL de solução de Turk. 10 µL dessa diluição foram carregados em câmara de Neubauer, e os parasitos foram contados utilizando os 4 quadrantes laterais da câmara, correspondendo a 16 subquadrantes, em microscópio óptico. As amostras do 5º dia foram utilizadas para avaliação da replicação, enquanto a comparação entre os 5º e 9º dias permitiu avaliar a sobrevivência dos parasitos. Os resultados foram expressos pelo número de parasitos por ml, e a análise estatística e a representação gráfica dos dados foram realizadas utilizando o GraphPad Prism® 7 (GraphPad Software).

4.12) Análise e contagem de Corpúsculos Lipídicos

Para análise da biogênese de Corpúsculos Lipídicos (CLs) os grupos mioblastos não irradiados e não infectados (controle), mioblastos previamente irradiados e não infectados (LBP), mioblastos infectados não irradiados (*T. cruzi*), e mioblastos previamente irradiados e infectados (*LBP + T. cruzi*), foram lavados 3x com PBS 1x, fixados em formalina 3,7% por 24 horas. Passado este período, as células foram lavadas cuidadosamente 3x com PBS 1x, para remoção completa do fixador. utilizando o corante BODIPY 493/503 (Invitrogen) diluído em PBS na concentração de 1 µg/ml. Em cada poço, foram adicionados 1 ml desta solução, e a coloração foi realizada por 15 minutos à temperatura ambiente, protegida de luz. Após esse tempo, as células foram lavadas em sequência 3x com PBS 1x para a retirada do excesso de corante.

Foi adicionado aos poços 4 µL de meio de montagem contendo DAPI (VECTASHIELD® mounting medium containing DAPI 4',6-Diamidino-2-Phenylindole) (Vector Laboratories) para a marcação do núcleo das células. As imagens foram obtidas através do microscópio de fluorescência invertido Nikon Eclipse TS100, com objetiva de 40x e software CellSens Dimension. As quantificações foram feitas em triplicatas, contando 50 células individuais. A contagem foi realizada utilizando o software ImageJ. O número de CLs foi representado graficamente utilizando o programa GraphPad Prism®7 (GraphPad Software).

4.13) Western Blot

Para obtenção das proteínas a serem analisadas, foi realizado a lise celular dos grupos mioblastos não irradiados e não infectados (controle), mioblastos previamente irradiados e não infectados (LBP), mioblastos infectados não irradiados (*T. cruzi*), e mioblastos previamente irradiados e infectados (*LBP + T. cruzi*), com 80 µL de tampão de amostra (Trizma base, água Milli Q, glicerol, SDS, β-Mercapto Etanol, azul de Bromofenil). O lisado celular então foi fervido, a 100°C por 5 minutos.

As proteínas totais de cada grupo experimental foram posteriormente submetidas à eletroforese em SDS-PAGE (Água Milli Q, acrilamida, Tris 1,5M ou 1,0, SDS 10%, persulfato de amônio 10%, 12 µl TEMED). Após a preparação, os géis foram armazenados em geladeira por 24 horas. Posteriormente, 30 µL de amostra, de cada grupo experimental, foram adicionados individualmente nos poços dos géis. A corrida eletroforética foi realizada em tampão de corrida Tris-Glicina-SDS (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% SDS, pH 8,3) a 100 V por aproximadamente 1 h 30 min, até que o marcador de peso molecular atingisse a posição esperada.. A corrida eletroforética foi realizada em tampão de corrida (água Milli Q, 25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% SDS), 100 V por aproximadamente 1 hora e 30 minutos, até que o marcador de peso molecular alcançasse a posição adequada.

Em seguida, as proteínas foram transferidas dos géis para membranas de nitrocelulose (Amersham™ Protran® Western Blotting Membranes, Cytiva), em tampão de transferência (25 mM Trizma base, 192 mM glicina, água Milli Q e metanol). A transferência foi feita à 90 Volts, por 2 horas.

Após a transferência, as membranas foram bloqueadas por 2 horas em solução TBST (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20) contendo 5% leite desnatado. Em seguida, foram incubadas por 24 horas a 4 °C com os anticorpos primários de coelho: anti-PPARγ (H-100, Santa Cruz Biotechnology, sc-7196; 1:500) e anti-SREBF-1 (Proteintech, 14088-1-AP; 1:500). Como controle interno, foi utilizado o anticorpo anti-GAPDH monoclonal de camundongo (Proteintech, 60004-1-Ig; 1:5.000).

Após a incubação com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas com TBST e incubadas com um único anticorpo secundário policlonal anti-IgG, conjugado à peroxidase (HRP; Proteintech, SA00001-2; 1:10.000), utilizado para a detecção de todos os anticorpos primários (anti-PPARγ, anti-SREBP-1 e anti-GAPDH). Todos os anticorpos primários e secundários foram preparados em TBST, imediatamente antes do uso. A detecção foi feita com o sistema de análise de “Western blotting Supersignal Chemiluminescence” (Pierce) e a membrana exposta a filme de autoradiografia (filme de raio-X) (Amersham Hyperfilm ECL – High performance chemiluminescence film, GE Healthcare Limited).

Os filmes revelados contendo as bandas de proteína foram digitalizados em alta resolução e analisados no software ImageJ, com quantificação densitométrica relativa. Os valores obtidos foram normalizados em relação à expressão de GAPDH e tratados estatisticamente no programa GraphPad Prism® 7 (GraphPad Software), sendo representados graficamente para interpretação dos resultados.

4.14) Dosagem de PGE₂

Os níveis de PGE₂ foram quantificados no sobrenadante dos grupos mioblastos não irradiados e não infectados (controle), mioblastos previamente irradiados e não infectados (LBP), mioblastos infectados não irradiados (*T. cruzi*), e mioblastos previamente irradiados e infectados (*LBP + T. cruzi*), utilizando um kit ELISA para Prostaglandina E2, de acordo com as instruções do fabricante (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, 514010). A leitura foi realizada entre 405-420 nm utilizando o programa Softmax Pro e as análises foram realizadas no software GraphPad Prism® 7 (GraphPad Software).

4.15) Dosagem de citocinas

Os níveis das citocinas IL-6 (DY206-05), TNF- α (DY210-05), IL-10 (DY217B-05), IL 12 (DY1270-05) foram quantificados no sobrenadante dos grupos mioblastos não irradiados e não infectados (controle), mioblastos previamente irradiados e não infectados (LBP), mioblastos infectados não irradiados (*T. cruzi*), e mioblastos previamente irradiados e infectados (*LBP + T. cruzi*), através da técnica de ELISA e segundo o protocolo oferecido pela fabricante (R&D Systems). A quantificação foi mensurada a partir das curvas padrão proveniente da diluição realizada. A leitura foi realizada em 450 nm utilizando o programa Softmax Pro.

4.16) Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Para a análise estatística, empregou-se ANOVA seguida do pós-teste de Tukey, teste t de Student ou teste de Kolmogorov-Smirnov, considerando-se significância em $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas no software GraphPad Prism® 7 (GraphPad Software).

5. RESULTADOS

5.1) Viabilidade celular

A viabilidade dos mioblastos C2C12 foi avaliada por meio do ensaio de exclusão com Azul de Trypan. A análise foi realizada considerando exclusivamente as células aderentes após os procedimentos experimentais, uma vez que as culturas foram submetidas a etapas de lavagem previamente à contagem celular. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas analisados ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais analisados (Figura 20). Esses resultados indicam que a irradiação prévia com Laser de Baixa Potência (LBP) e a infecção por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) não comprometeram a viabilidade das células aderentes, validando assim o modelo experimental para as análises subsequentes deste trabalho.

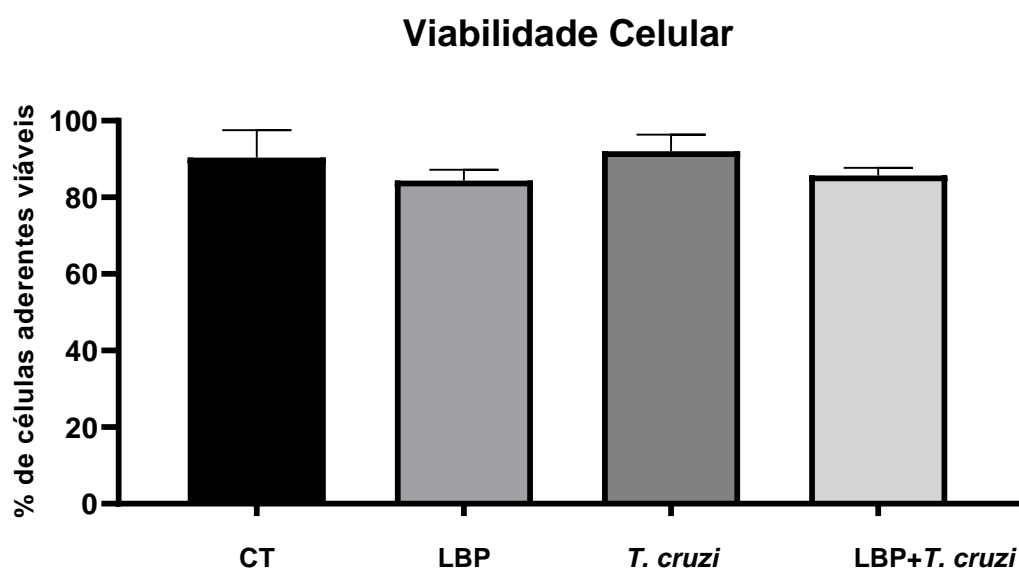


Figura 20: Viabilidade celular de mioblastos após a irradiação prévia com LBP e infecção por *T. cruzi*. Mioblastos não irradiados e não infectados (CT), mioblastos previamente irradiados e não infectados (LBP), mioblastos infectados não irradiados (*T. cruzi*), e mioblastos previamente irradiados e infectados (LBP + *T. cruzi*), tiveram sua viabilidade celular avaliada por meio do ensaio de exclusão com Azul de Trypan. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados ($p > 0,05$). Os resultados são expressos como porcentagem de células aderentes viáveis em relação ao total de células aderentes contadas. Os dados representam a média \pm erro padrão de triplicatas, obtidos a partir de três experimentos independentes (ANOVA seguida do teste de Tukey).

5.2) Permeabilidade celular

Para observar a ação do LBP na membrana plasmática (MP) e em uma possível indução do mecanismo de reparo de membrana (RM), culturas de mioblastos foram irradiados na dose de 30 J/cm². A Irradiação foi feita nas células na presença de meio com Ca²⁺ ou em meio sem Ca²⁺. O Iodeto de Propídio (IP), marca células mortas ao intercalar-se com o DNA, mas não consegue atravessar a membrana plasmática intacta de células vivas. As células com membranas permeabilizadas absorvem o corante e emitem fluorescência vermelha. Nossos dados demonstraram que o grupo irradiado em meio sem Ca²⁺, apresentou maior coloração positiva para Iodeto de Propídio (IP) quando comparado com o grupo em meio com Ca²⁺ (Figuras 21 A e 22 A).

Estes resultados sugerem que a irradiação com LBP promove a permeabilização transitória da MP. Entretanto, na presença de Ca²⁺, observou-se reparo eficiente da MP, impedindo a entrada do IP no interior das células. Essa diferença foi evidente não apenas por meio da análise de imagens de fluorescência, mas também confirmada estatisticamente ($p \leq 0,05$), reforçando a hipótese de que o LBP induz a permeabilização da MP sem comprometer o mecanismo de reparo em condições favoráveis à entrada de cálcio (Figuras 21 B e 22 B).

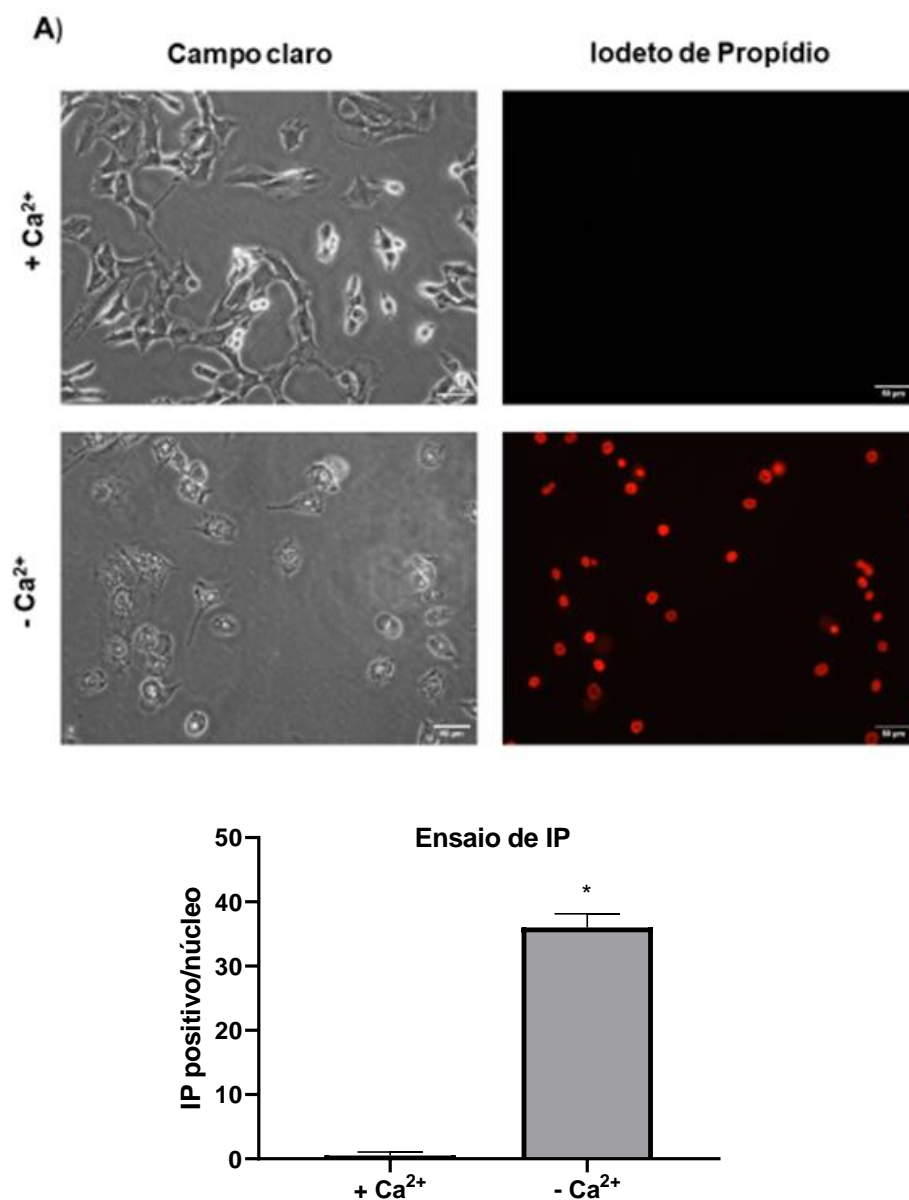


Figura 21: Mioblastos previamente irradiados com LBP na presença ou ausência de Ca²⁺, corados com Iodeto de Propídio. (A) Imagens de Imunofluorescência exibem cultura de mioblastos-irradiados com LBP, tratados com meio com ou sem Ca²⁺ corados com IP (Barra = 50 µm). (B) (*) indica diferença significativa entre o grupo sem Ca²⁺ e o grupo com Ca²⁺. Foram contados 50 núcleos. As colunas representam a média ± erro padrão de triplicatas, sendo as diferenças significativas para $p \leq 0,05$. Estes resultados são representativos de 3 experimentos independentes (ANOVA e teste t de Student).

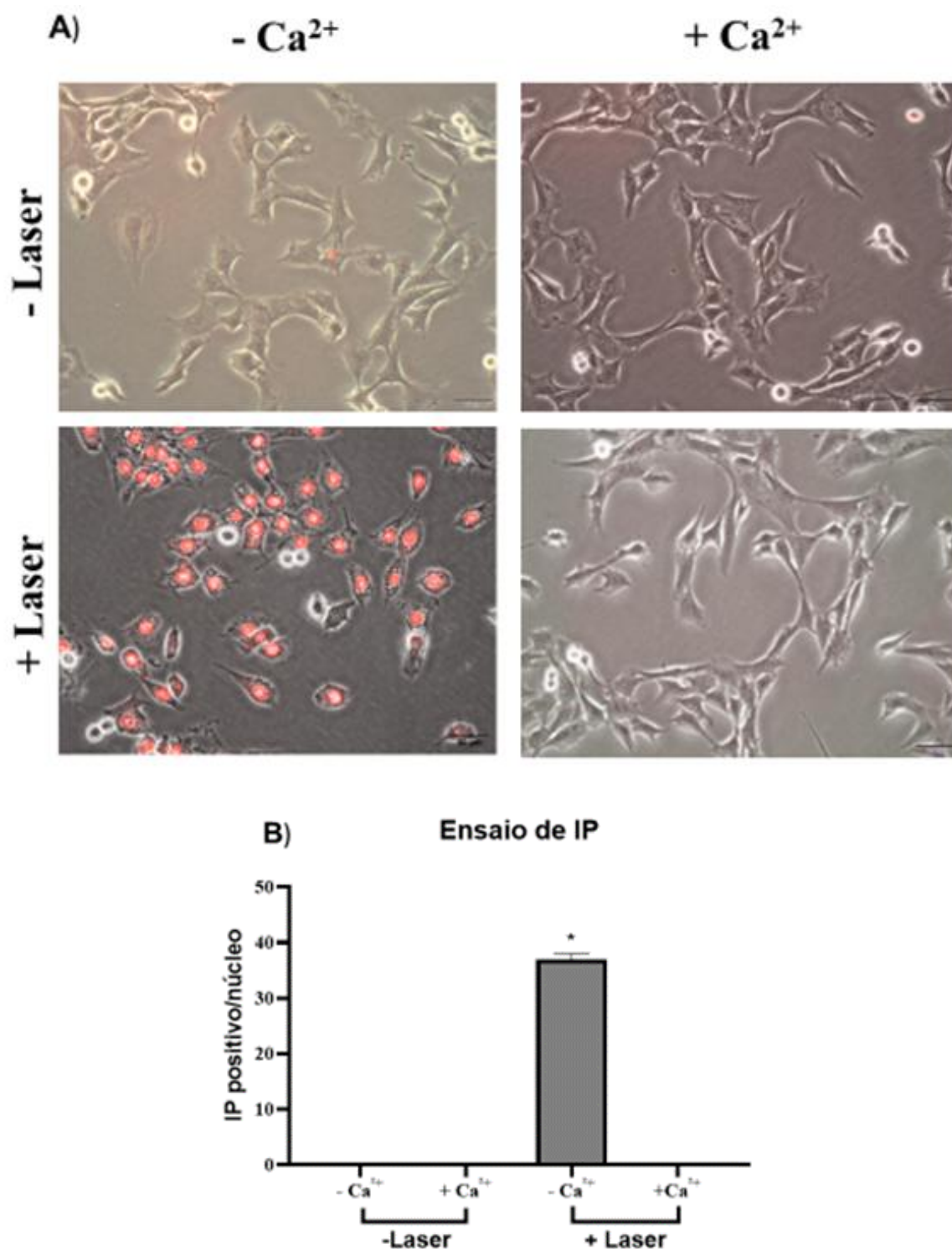


Figura 22: Mioblastos previamente irradiados com LBP na presença ou ausência de Ca^{2+} , corados com Iodeto de Propídio, imagens sobrepostas. Imagens de Imunofluorescência exibem cultura de mioblastos-irradiados com LBP, tratados com meio com ou sem Ca^{2+} corados com IP (Barra = 50 μm) em imagens sobrepostas (campo claro e fluorescência em vermelho). (B) (*) indica diferença significativa entre o grupo sem Ca^{2+} e o grupo com Ca^{2+} . Foram contadas 50 células individuais. As colunas representam a média \pm erro padrão de triplicatas, sendo as diferenças significativas para $p \leq 0,05$. Estes resultados são representativos de 3 experimentos independentes (ANOVA e Teste de Tukey).

5.3) Influxo de Ca^{2+}

Considerando os dados obtidos no ensaio com iodeto de Propídio (IP), analisamos se a irradiação estaria também ativando mecanismos de sinalização mediados por Ca^{2+} . Para isso, foi realizado um ensaio de sinalização de cálcio *in vitro*, utilizando a sonda fluorescente Fluo-4/AM, um marcador sensível à presença de íons Ca^{2+} livres no citosol. Avaliamos os mioblastos não irradiados (controle) e os mioblastos irradiados previamente com LBP. Por meio de microscopia de fluorescência, as células foram analisadas antes e após a irradiação, sendo possível observar uma elevação nas concentrações intracelulares de Ca^{2+} , evidenciado pelo aumento da intensidade de fluorescência no interior das células irradiadas com o LBP (Figura 23 A, B).

Paralelamente, foi realizada a quantificação da intensidade média de fluorescência, por leitura no equipamento Cytation 5 Imaging Reader, comparando os grupos controle e irradiado (Figura 23 C). Observou-se um aumento significativo na fluorescência das células irradiadas, indicando aumento das concentrações intracelulares de Ca^{2+} , diferença confirmada estatisticamente ($p \leq 0,05$). Em conjunto, esses resultados demonstram que tanto a sinalização intracelular quanto o influxo extracelular de Ca^{2+} ocorrem após a irradiação com LBP, corroborando a hipótese de que a fotobiomodulação *in vitro* ativa a via de reparo da MP dependente da sinalização de Ca^{2+} .

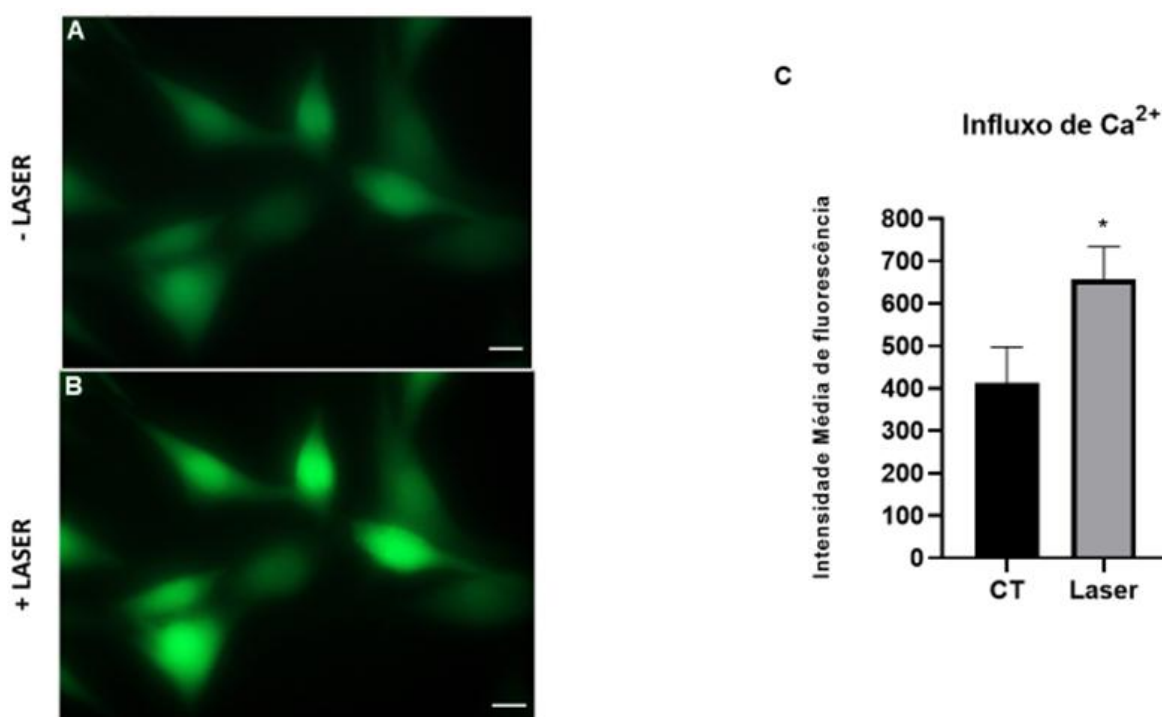


Figura 23: Aumento do Ca²⁺ intracelular em mioblastos irradiados previamente com LBP. Mioblastos foram incubados com a sonda fluorescente fluo-4/AM para marcação do Ca²⁺ citoplasmático e em seguida irradiados ou não (controle) com LBP. As imagens obtidas por microscopia de fluorescência exibem a fluorescência de mioblastos antes (A) e após (B) a irradiação, evidenciando o aumento da fluorescência verde nas células irradiadas, o que indica maior concentração intracelular de Ca²⁺ (barra = 50 µm). (C) Gráfico representando a intensidade média de fluorescência nos grupos controle e irradiado. O símbolo (*) indica diferença estatística significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$). Os dados são expressos como média \pm erro padrão de triplicatas e representam dois experimentos independentes (ANOVA e teste t de Student).

5.4) Dispersão lisossomal

Como observado em resultados anteriores, a irradiação dos mioblastos pelo LBP induziu alterações na permeabilidade da MP, aumentando o influxo de Ca²⁺ intracelular, em condições controladas, sem comprometer a viabilidade celular. Sabendo-se que o influxo de Ca²⁺ é um sinal inicial essencial para a ativação da via de RM por endocitose, levantou-se a hipótese de que as células irradiadas poderiam estar restaurando suas MPs por meio da ativação deste mecanismo. Assim, analisamos o efeito da fotobiomodulação na dispersão lisossomal.

Para isso, mioblastos irradiados previamente com LBP ou não, foram marcados com anticorpos anti-LAMP1, específico de lisossomos, e analisados por microscopia de fluorescência. Nas células controle, os resultados obtidos demonstraram a

concentração dos lisossomos predominantemente na região perinuclear (Figura 24 A, C). Em contraste, as células irradiadas apresentaram uma redistribuição significativa ($p \leq 0,05$) dos lisossomos em direção à MP (Figura 24 B, D).

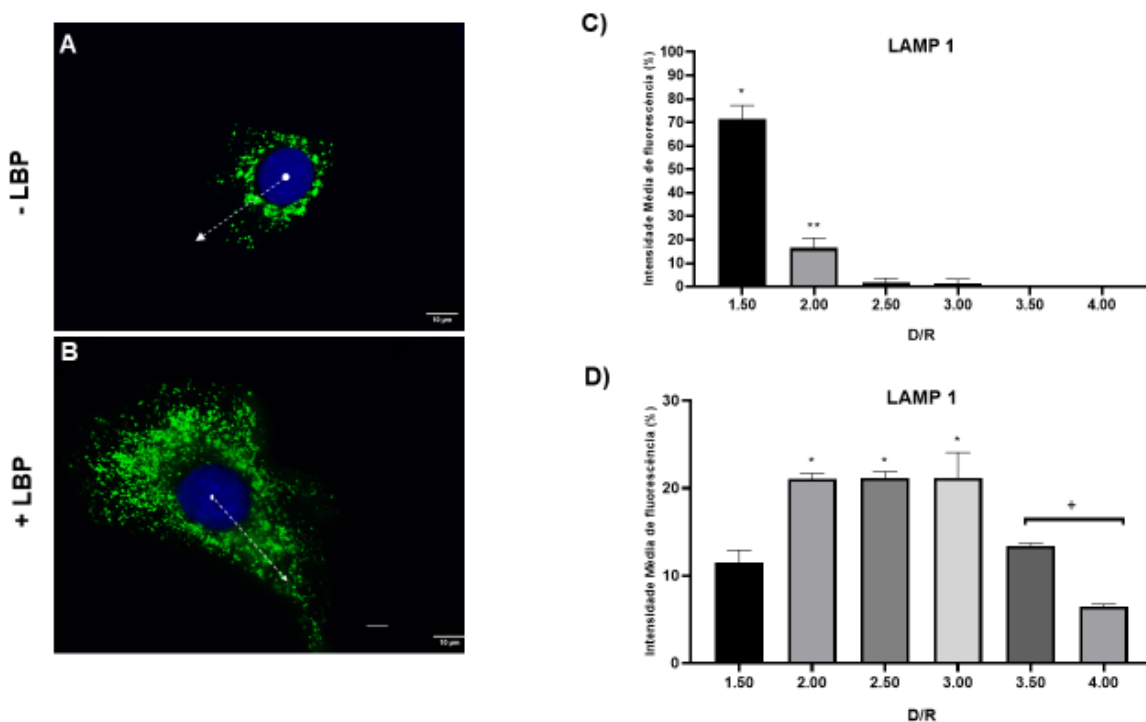
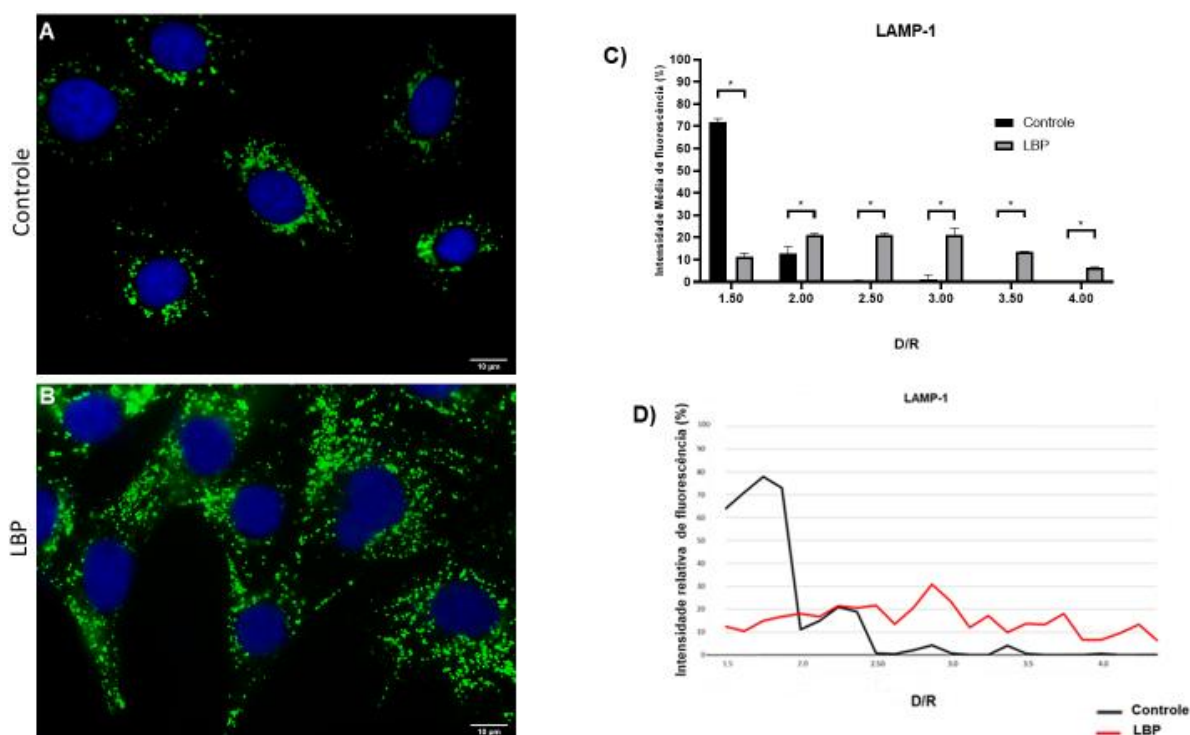


Figura 24: Dispersão dos lisossomos, em mioblastos previamente irradiados, observada através da imunomarcagem com anticorpo anti-LAMP1. Imagens obtidas por microscopia de fluorescência exibem a distribuição lisossomal em mioblastos controle (A) e irradiados com o LBP (B), marcados com anti-LAMP1 (verde) e DAPI (azul). A seta branca pontilhada indica o trajeto do centro do núcleo à periferia celular, evidenciando a redistribuição lisossomal na célula irradiada. Barra = 10 μ m. A análise quantitativa da distribuição lisossomal encontra-se em (C, D). A intensidade média de fluorescência foi medida em regiões perinucleares calculadas a partir da razão entre a distância média ao centro nuclear e o raio nuclear médio (D/R). Os símbolos (*) e (+) indicam diferenças significativas entre regiões analisadas. As colunas representam a média \pm EPM de triplicatas ($n = 20$ células por grupo), sendo as diferenças significativas para $p \leq 0,05$ (Anova, e Tukey).

Essa alteração também foi observada pela comparação da intensidade de fluorescência entre os grupos controle e irradiado. Os lisossomos do grupo irradiado apresentaram maior dispersão nas diferentes regiões concêntricas perinucleares, e em direção à periferia celular (Figuras 25), quando comparado ao controle ($p \leq 0,05$).



5.5) Análise ultraestrutural da Membrana Plasmática

Dando continuidade à investigação do efeito da fotobiomodulação na ativação dos eventos envolvidos no RM por endocitose, analisamos a morfologia dos mioblastos não irradiados (controle) e irradiados com LBP, por microscopia eletrônica de transmissão (MET). As imagens obtidas demonstraram a presença de estruturas compatíveis com vesículas endocíticas, com morfologia e diâmetro semelhantes às cavéolas (≤ 80 nm), na periferia das células irradiadas, em quantidade superior as observadas nas células controle (Figura 26). Esses achados sugerem a ativação de processos endocíticos em resposta à irradiação com o LBP.

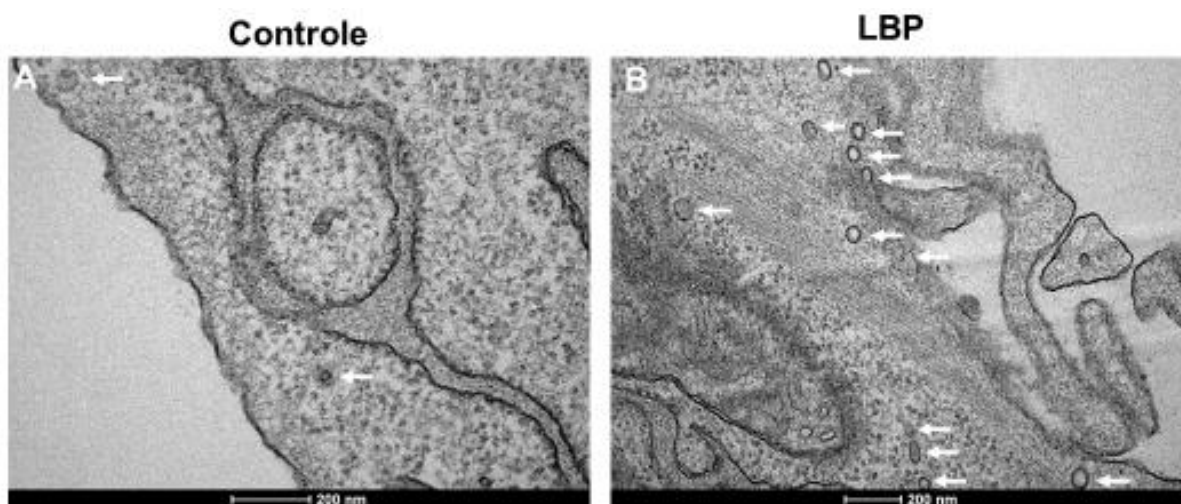


Figura 26: MET de mioblastos previamente irradiados, ou não, com LBP. Imagens de secções de mioblastos, não irradiado (controle) (A) e irradiado (LBP) (B) obtidas por microscopia eletrônica de transmissão. Observa-se vesículas endocíticas (indicadas por setas), com tamanho aproximado de ≤ 80 nm na periferia das células. (Barra de escala = 200 nm).

5.6) Internalização de *T. cruzi*

Uma vez que o processo de invasão celular do *T. cruzi* é favorecido por lesões transitórias à MP, seguido da ativação de mecanismos de RM dependentes de Ca^{2+} , avaliou-se a taxa de invasão por *T. cruzi* em mioblastos infectados (MOI 3:1) não irradiados ou previamente irradiados com LBP. Após 24 horas de infecção, foi observado um aumento significativo ($p \leq 0,05$) no número de *T. cruzi* internalizados no grupo irradiado quando comparado ao grupo controle (não irradiado) (Figura 27). Este resultado, associado com os dados obtidos previamente, reforça a hipótese de que a fotobiomodulação pode modular a via endocítica envolvida na entrada do parasito e favorecer a eficiência da infecção.

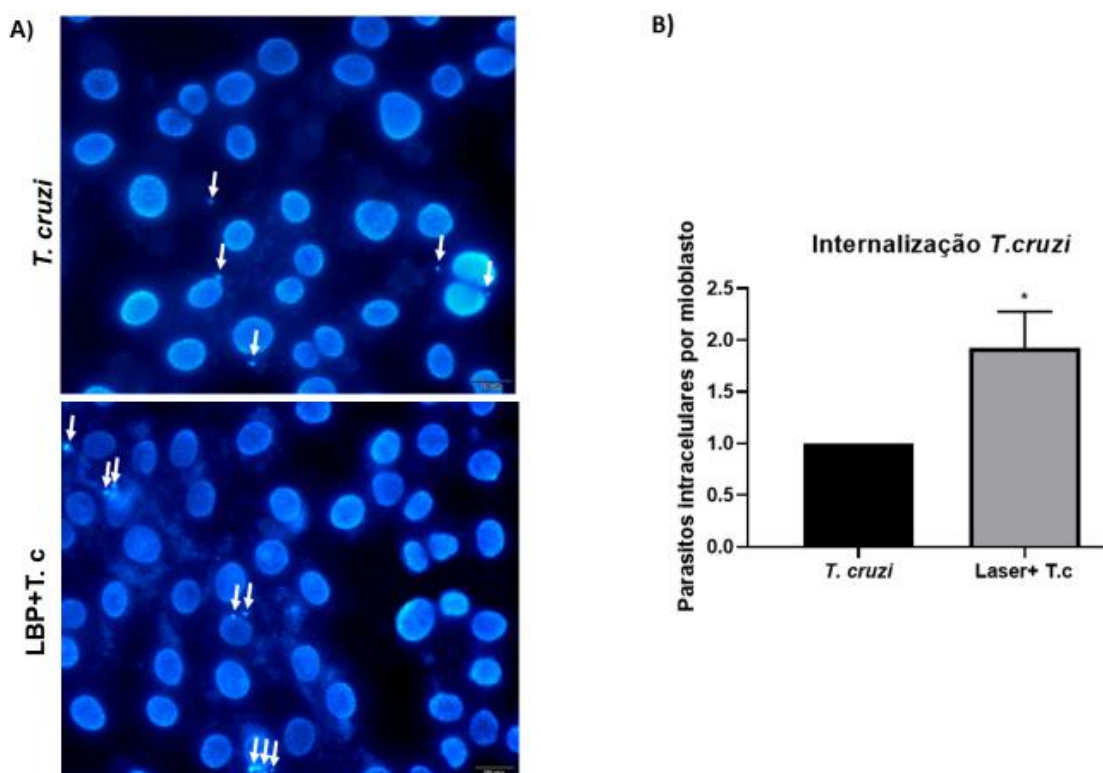


Figura 27: A irradiação prévia com LBP modula a invasão do *T. cruzi* em mioblastos. (A) Imagens exibem um aumento no número de parasitos internalizados (setas) entre o grupo infectado e o grupo infectado irradiado com LBP. As imagens foram obtidas por microscópio de fluorescência e a análise da internalização de *T. cruzi* foi feita após coloração com DAPI (Barra = 50 μ m). (B) (*) indica diferença significativa entre o grupo infectado e o grupo infectado irradiado. Foram contadas 50 células. As colunas representam a média \pm erro padrão de triplicatas, sendo as diferenças significativas para $p \leq 0,05$. Estes resultados são representativos de 3 experimentos independentes (Anova e teste t de Student).

5.7) Replicação e sobrevivência do *T. cruzi*

Diante do aumento significativo na taxa de invasão por *T. cruzi* em células irradiadas, investigou-se se a irradiação com LBP também poderia modular a replicação e a sobrevivência intracelular do parasito. Para isso, nos dias 5, 7 e 9 após a infecção, realizou-se a contagem de tripomastigotas liberados no sobrenadante das culturas de mioblastos infectados com *T. cruzi* (MOI 3:1), não irradiados ou previamente irradiados com LBP. Os resultados obtidos (Figura 28) demonstraram que, nos dias 5 e 7, as culturas previamente irradiadas liberaram mais parasitos em comparação aos grupos não irradiados ($p \leq 0,05$). No entanto, não houve diferença significativa entre os dias 5, 7 (Figura 28) e 9, dentro de cada grupo,

sugerindo que a irradiação com LBP favorece a replicação e a manutenção da infecção.

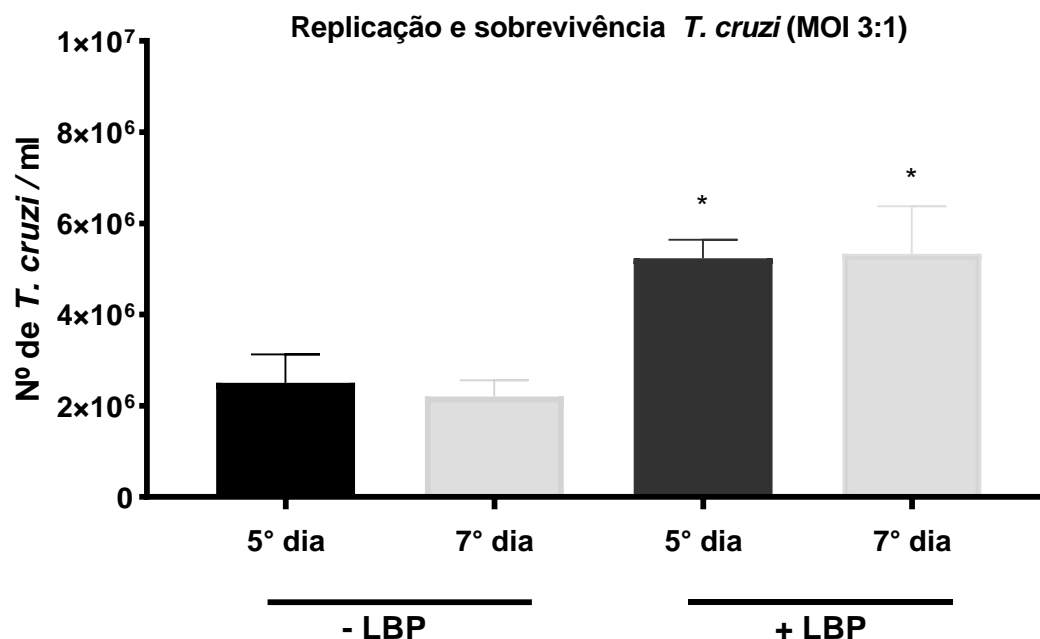


Figura 28: Replicação e sobrevivência de *Trypanosoma cruzi* em mioblastos previamente irradiados, ou não, com LBP. O número de tripomastigotas de *T. cruzi* liberados no sobrenadante foi quantificado no 5º e 7º após a infecção (MOI 3:1), em culturas previamente irradiada ou não com LBP, após diluição em solução de Turk e contagem em câmara de Neubauer. Observou-se aumento significativo na liberação de parasitos nos grupos previamente irradiados com LBP em ambos os dias, indicando maior replicação e sobrevivência intracelular, em comparação aos grupos infectados não irradiados, que não apresentaram diferença significativa entre o 5º e 7º dia. (*) Diferença significativa entre grupos irradiados e não irradiados. As colunas representam a média \pm erro padrão de triplicatas, sendo as diferenças significativas para $p \leq 0,05$. Estes resultados são representativos de 2 experimentos independentes (Anova e teste de Tukey).

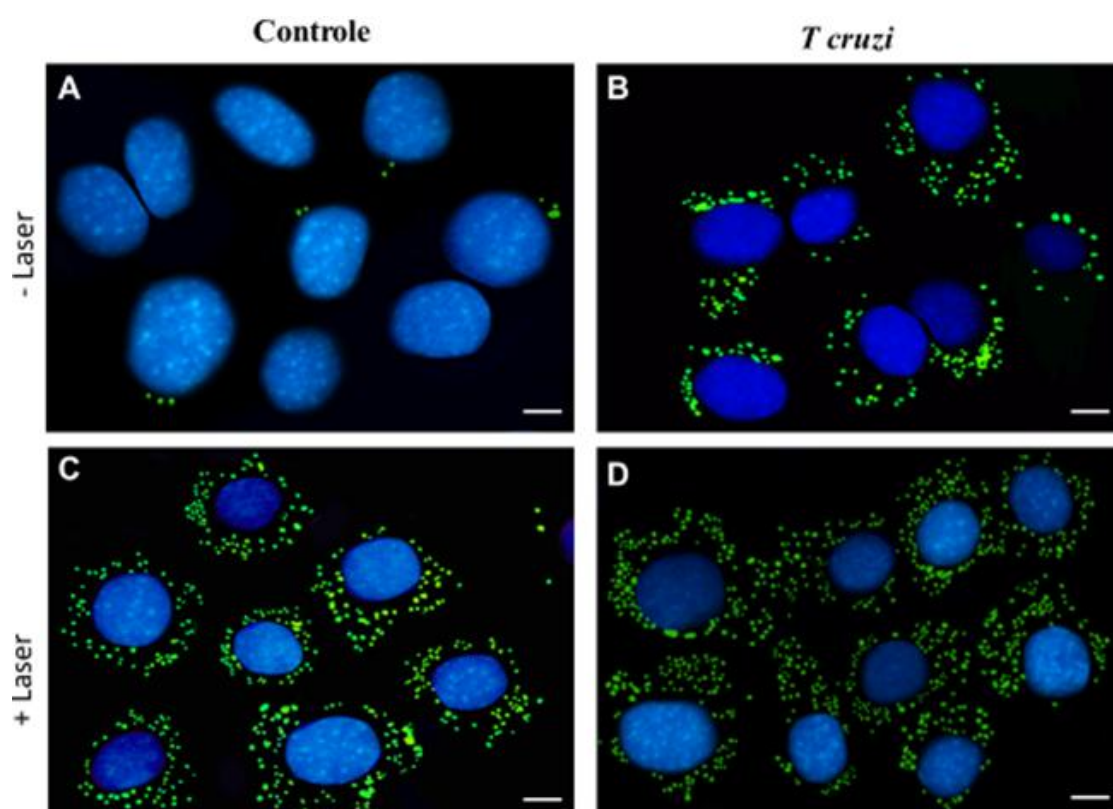
5.8) Biogênese de Corpúsculos Lipídicos

Considerando que a fotobiomodulação favoreceu tanto a invasão quanto a replicação intracelular do *T. cruzi*, e que estes efeitos parecem estar associados à ativação da via de reparo de MP, investigou-se a capacidade da irradiação ativar a biogênese de CLs. Essas organelas estão envolvidas, indiretamente na manutenção da integridade da MP (Jarc; Pecan, 2019), quanto diretamente na infecção por patógenos intracelulares como o *T. cruzi* (Almeida *et al.*, 2018). Assim, os grupos

experimentais foram corados com Bodipy e submetidos a análises de imunofluorescência.

Através de imagens de microscopia de fluorescência foi observado o aumento significativo ($p \leq 0,05$) no número de CLs nos grupos infectado (Figura 29 B), irradiado e não infectado (Figura 29 C), e irradiado e infectado (Figura 29 D), quando comparados com o grupo não irradiado e não infectado (Figura 29 A). A análise quantitativa da biogênese de CLs confirmou esse padrão, revelando um aumento estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$) nos grupos tratados em relação ao controle (Figura 29 E)

Além disso, o grupo irradiado (Figura 29 C) e irradiado e infectado (Figura 28 D) apresentaram maior biogênese de CLs, após 24 horas de infecção, quando comparados com o grupo infectado não irradiado (Figura 29 B, E). Esses dados apontam para um possível papel modulador da fotobiomodulação sobre mecanismos celulares envolvidos no metabolismo lipídico.



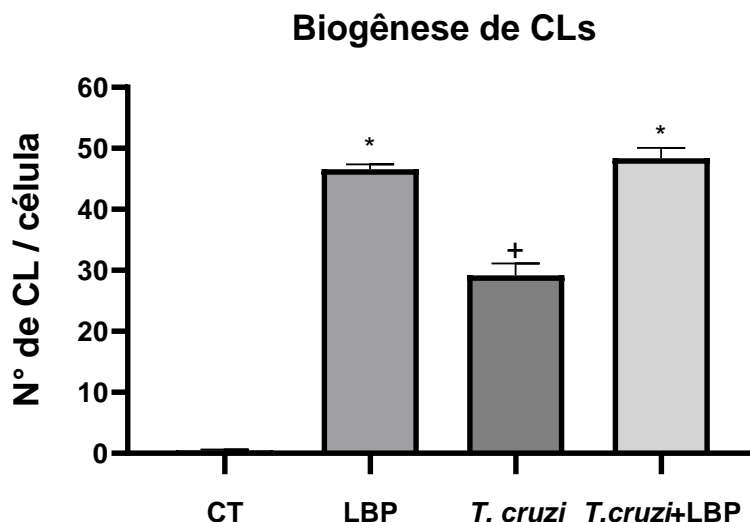


Figura 29: Imunofluorescência de Corpúsculos Lipídicos em mioblastos previamente irradiados, ou não, com LBP, infectados, ou não, por *T. cruzi*. Imagens de mioblastos obtidas por microscopia de fluorescência mostram aumento na formação de CLs (em verde, marcados com BODIPY) nos grupos infectado (B), irradiado (C) e irradiado e infectado (D), em comparação ao grupo controle não tratado (A). Observou-se ainda aumento significativo na biogênese de CLs nos grupos irradiado (C) e irradiado infectado (D) em relação ao grupo infectado (B). Os núcleos foram contra-corados com DAPI. Barra = 50 μ m. Foram analisadas 50 células por grupo. (E) Quantificação do número de CLs por célula. (*) Indica diferença significativa entre o grupo irradiado (LBP) e irradiado infectado (LBP + *T. cruzi*) e os grupos controle (não tratado) e infectado (*T. cruzi*). (+) Indica diferença significativa entre o grupo infectado em comparação aos demais grupos. Os dados representam a média \pm erro padrão de triplicatas, representativos de três experimentos independentes sendo as diferenças significativas para $p \leq 0,05$ (ANOVA e teste de Tukey).

5.9) Produção de PGE₂

Diante do aumento significativo na biogênese de corpúsculos lipídicos (CLs), da ativação das vias lipogênicas, e considerando que os CLs são organelas envolvidas na síntese e no armazenamento de eicosanoides, como a prostaglandina E₂ (PGE₂), avaliou-se o efeito da irradiação prévia com LBP na produção desse mediador, nos grupos experimentais, através da análise por ELISA. Os resultados revelaram um aumento significativo nos níveis de PGE₂ ($p \leq 0,05$) nos grupos irradiado não infectado, infectado, e irradiado e infectado em comparação ao grupo controle (Figura 30).

Além disso também houve uma diferença significativa entre o aumento nos níveis de PGE₂ entre os grupos infectado e irradiado-infectado e o grupo irradiado

não infectado (Figura 30). Esses resultados indicam que tanto a infecção por *T. cruzi* quanto a irradiação por fotobiomodulação, isoladamente ou em combinação, estimulam a liberação de PGE₂, possivelmente contribuindo para a ativação de vias metabólicas lipídicas e inflamatórias envolvidas na biogênese dos CLs observada previamente.

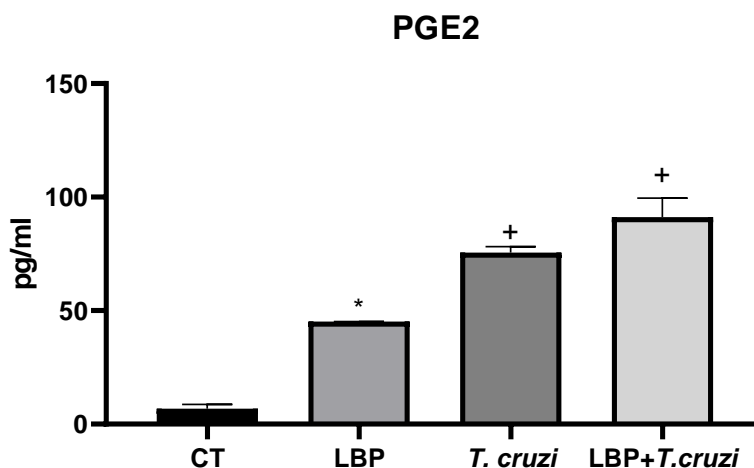


Figura 30: Quantificação de PGE₂ em mioblastos previamente irradiados, ou não, com LBP, infectados, ou não, por *T. cruzi*. Análise por ELISA nos níveis de PGE₂ nos grupos, irradiado (LBP), infectado (*T. cruzi*) e irradiado infectado (LBP+ *T. cruzi*) em comparação ao grupo controle (CT). (*) Indica diferença significativa em relação ao grupo controle e (+) indica diferença significativa em relação ao grupo irradiado ($p \leq 0,05$). Os dados representam a média \pm erro padrão de duplicatas, representativos de 3 experimentos independentes (ANOVA e teste de Tukey).

5.10) Expressão de PPAR γ e SREBP-1

Diante do aumento significativo na biogênese de CLs nos grupos tratados, buscou-se investigar se essa resposta celular foi promovida pela modulação de reguladores moleculares envolvidos no metabolismo lipídico. Para isso, a expressão do receptor nuclear PPAR γ e do fator de transcrição SREBP-1 foi analisada pela técnica de Western Blot. A proteína GAPDH foi avaliada como controle interno para padronização da carga proteica.

A análise das bandas revelou um aumento na expressão de PPAR γ e SREBP-1 em todos os grupos experimentais em comparação ao grupo controle (Figura 31 A). Esse padrão foi confirmado por análise de densitometria das bandas, que

demonstrou diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) em todos os grupos tratados quando comparados ao controle (Figura 31 B, C). Esses achados sugerem que tanto a infecção quanto a fotobiomodulação promovem a ativação de vias metabólicas envolvidas na biossíntese de lipídios, contribuindo para a indução dos CLs previamente observada.

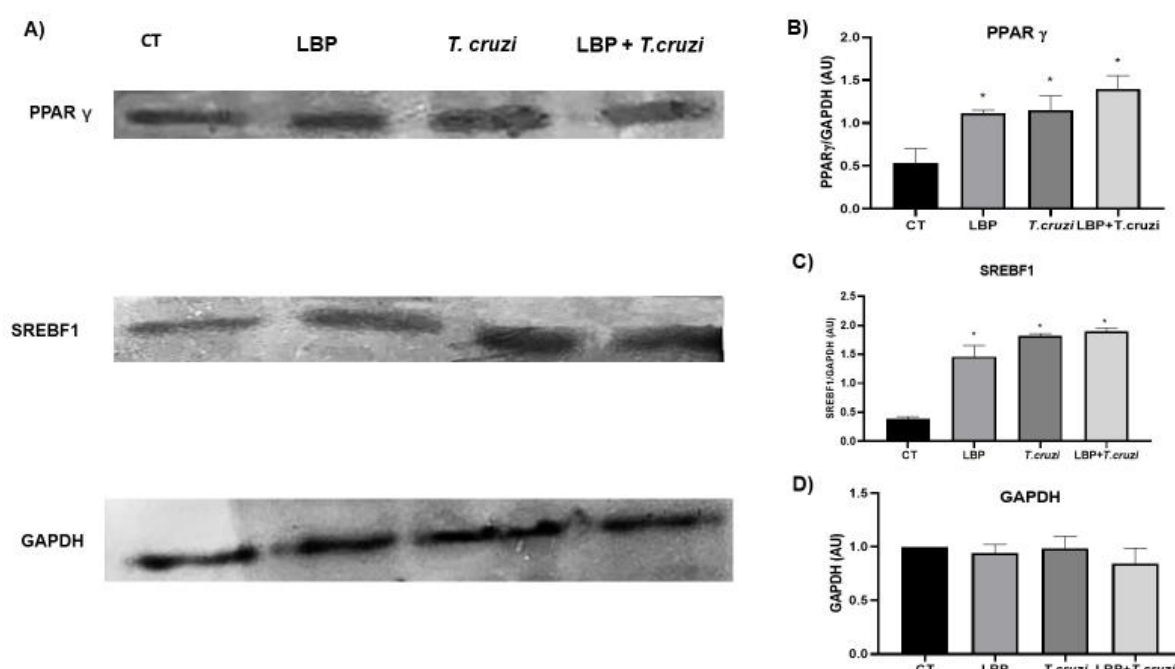


Figura 31: Expressão de PPAR γ e SREBP-1 em mioblastos previamente irradiados, ou não, com LBP, infectados, ou não, por *T. cruzi*. (A) Análise por Western Blot de mioblastos mostra aumento na expressão de PPAR γ e SREBP-1 nos grupos irradiado (LBP), infectado (*T. cruzi*) e irradiado infectado (LBP + *T. cruzi*) em comparação ao grupo controle (CT). Análise densitométrica confirmou aumento significativo na expressão de PPAR γ (B) e SREBP-1 (C) nos grupos tratados em relação ao controle. (D) Quantificação da expressão de GAPDH não revelou diferenças significativas entre os grupos, validando sua utilização como controle interno. (*) Indica diferença significativa em relação ao grupo controle ($p \leq 0,05$). Os dados representam a média \pm erro padrão de triplicatas, representativos de três experimentos independentes (ANOVA e teste de Tukey).

5.11) Produção de citocinas

Considerando que a irradiação com LBP foi capaz de modular mediadores lipídicos pró-inflamatórios, como a prostaglandina E_2 (PGE_2), associados à infecção por *T. cruzi* e à biogênese de CLs, investigou-se o efeito da fotomiobulação também poderia influenciar a produção de citocinas inflamatórias, visto que as citocinas são elementos-chave da resposta imunológica frente a infecções intracelulares, exercendo funções regulatórias em processos como proliferação, diferenciação celular e produção de outros mediadores inflamatórios.

Neste contexto, os grupos experimentais estabelecidos foram analisados por ELISA. A análise teve como objetivo quantificar os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6 e IL-12, bem como da citocina anti-inflamatória IL-10. A coleta dos sobrenadantes foi realizada 24 horas após a infecção.

Os resultados demonstraram diminuição significativa ($p \leq 0,05$) na produção de IL-6 no grupo irradiado quando comparado ao grupo controle (Figura 32 A). Além disso houve um aumento significativo entre os níveis de IL-6 dos grupos, irradiado e não infectado, e irradiado infectado em comparação ao grupo infectado não irradiado (Figura 32 A).

A análise dos níveis de TNF- α revelou uma diminuição significativa ($p \leq 0,05$) nos níveis desta citocina no grupo irradiado quando comparado ao grupo controle. Observou-se também um aumento significativo da produção de TNF- α no grupo infectado não irradiado em relação aos demais grupos. No grupo irradiado e infectado, houve aumento significativo nos níveis de TNF- α em comparação aos grupos controle e irradiado, mas inferiores aos observados no grupo infectado não irradiado (Figura 32 B).

Verificou-se um aumento significativo ($p \leq 0,05$) nos níveis de IL-12 apenas no grupo infectado não irradiado em comparação aos demais grupos. Além disso, observou-se que os níveis desta citocina foram significativamente menores no grupo infectado e irradiado em relação ao grupo infectado não irradiado, indicando que a fotobiomodulação atenuou a resposta inflamatória induzida pela infecção. Entre os grupos controle, irradiado e infectado e irradiado não houve diferença significativa, reforçando que a infecção por *T. cruzi* foi o principal fator associado ao aumento da

IL-12, enquanto a irradiação com LBP modulou negativamente esse efeito (Figura 32 C).

A quantificação de IL-10 revelou um aumento significativo ($p \leq 0,05$) nos grupos irradiado, infectado e irradiado e infectado em comparação ao grupo controle. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados, indicando que tanto a irradiação quanto a infecção foram capazes de induzir a produção de IL-10 de forma semelhante (Figura 32 D).

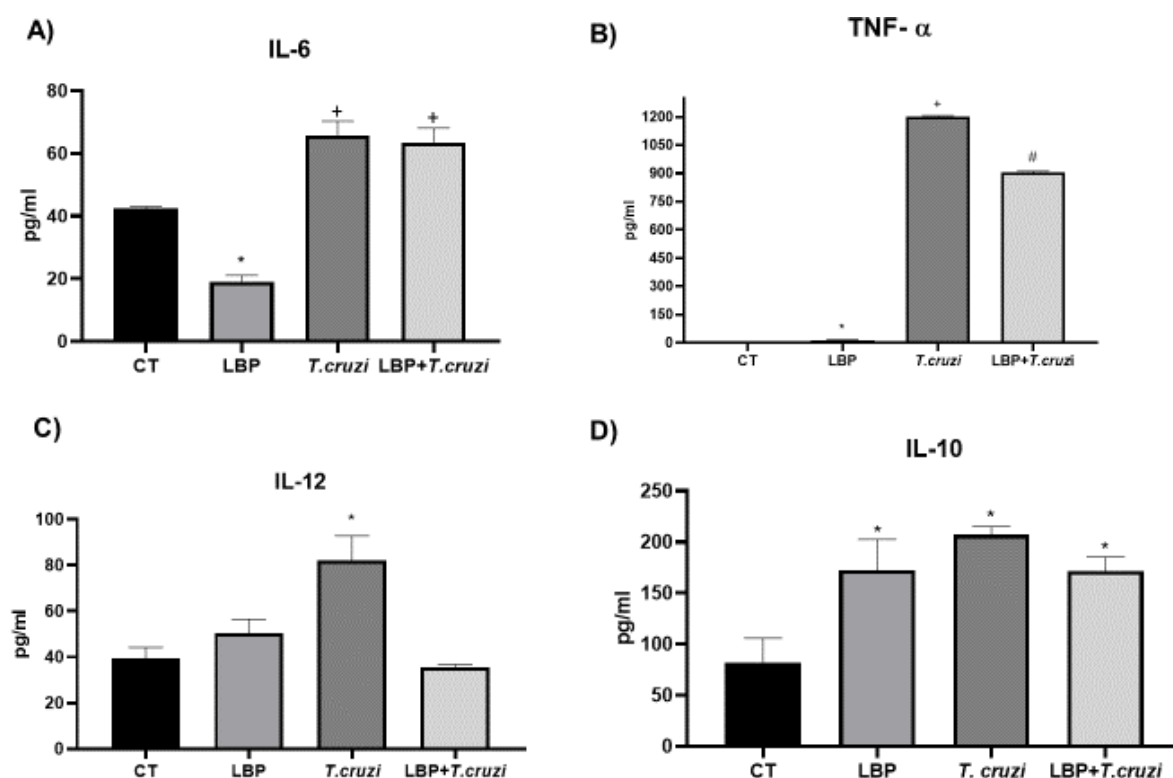


Figura 32: Quantificação de IL-6, TNF-α, IL-12 e IL-10 em mioblastos previamente irradiados, ou não, com LBP, infectados ou não por *T. cruzi*. Quantificação por ELISA das citocinas IL-6 em (A), TNF-α (B), IL-12 (C) e IL-10 (D), em mioblastos infectados ou não por *T. cruzi* (MOI 3:1), irradiados ou não com LBP. (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle. (+) indica diferença significativa entre o grupo infectado e infectado irradiado e os demais grupos em (A); e entre o grupo infectado e os demais grupos em (B). (#) indica diferença significativa entre o grupo infectado irradiado e demais grupos ($p \leq 0,05$). Dados expressos como média \pm erro padrão de triplicatas, representativas de três experimentos independentes. Diferenças estatísticas determinadas por ANOVA, seguida do teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

6. DISCUSSÃO

A irradiação com o Laser de Baixa Potência (LBP) tem se tornado prática comum em várias áreas da saúde e os benefícios dessa terapia em processos de cicatrização, analgesia, e proliferação celular, têm sido relatados na literatura desde sua descoberta em 1967 (Cotler *et al.*, 2015; Azadgoli *et al.*, 2016; Sant'Anna *et al.*, 2017). Recentemente novos estudos buscam desvendar como o LBP age em níveis celular e molecular e quais possíveis alterações sobre as estruturas celulares que recebem a irradiação a luz seriam geradas.

Descobertas atuais sobre o mecanismo de ação dessa terapia demonstraram que o cromóforo citocromo c oxidase, presente na mitocôndria, exerce o papel de principal receptor da luz irradiada, e a partir de sua ativação, uma sequência de eventos é desencadeada, incluindo aumento na produção de ATP e de ROS (Chen *et al.*, 2025). Essas moléculas atuam em nível nuclear da célula, promovendo a ativação de fatores de transcrição nucleares, como NF- κ B e AP-1, com consequente modulação da expressão gênica (Karu, 2008; Balah *et al.*, 2025). Desta forma, as alterações desencadeadas pelo LBP geram alterações no perfil de síntese proteica relacionadas ao aumento do metabolismo, a proliferação, e maturação celular e na diminuição de mediadores inflamatórios (Freitas *et al.*, 2016 Balah *et al.*, 2025).

Neste contexto, o presente estudo explorou as consequências da irradiação com o LBP sobre os mecanismos de reparo de membrana (RM), e como esse estímulo pode interferir, no curso de infecções por patógenos intracelulares, como o *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), com ênfase no metabolismo lipídico celular e na resposta inflamatória em mioblastos, *in vitro*.

Para validar os parâmetros dosimétricos utilizados na irradiação com LBP neste estudo, primeiro avaliamos a viabilidade celular. A ausência de morte celular observada nas análises, 24 horas após a irradiação e/ou infecção com *T. cruzi* (Figura 20), corrobora estudos prévios que apontam o LBP como uma ferramenta terapêutica segura, com potencial bioestimulador e sem efeitos deletérios diretos (Yamaura *et al.*, 2009; Farivar *et al.*, 2014). Esses achados são relevantes quando se considera o uso do LBP como possível modulador de processos patológicos, incluindo infecções parasitárias, como a Doença de Chagas.

Os dados obtidos reforçam a segurança dos parâmetros adotados e conferem robustez às análises funcionais subsequentes. Assim, o modelo proposto se mostra relevante para investigar o impacto do LBP sobre mecanismo de reparo da MP em contexto de estímulo físico (apenas a irradiação com o laser) e biológico (infecção com *T. cruzi*).

A partir da validação da viabilidade celular, seguiu-se à investigação do efeito da irradiação com o LBP sobre o mecanismo de RM nos mioblastos previamente irradiados. Diversos modelos de estudo têm sido propostos com o intuito de esclarecer os agentes envolvidos no processo de RM (Miyake *et al.*, 1995; Jimenez *et al.*, 2014; Corrotte *et al.*, 2013). Dados na literatura demonstraram que independentemente do(s) mecanismo(s) empregado(s), e do tipo de dano e célula afetada, o fator primordial de acionamento da maquinaria de RM tem sido o mesmo: o aumento no cálcio (Ca^{2+}) intracelular. Estudos anteriores já demonstraram que na ausência de Ca^{2+} a MP plasmática é incapaz de restaurar sua integridade (McNeil *et al.*, 2001; Reddy *et al.*, 2001; Idone *et al.*, 2008; Babychuk *et al.*, 2009; Scheffer *et al.*, 2015). Assim, o presente trabalho avaliou se o LBP alterava ou não a permeabilidade da MP, e promovia a ativação do RM, na presença ou ausência de Ca^{2+} extracelular.

O Iodeto de Propídio (IP) é um marcador fluorescente de integridade celular, cujo influxo indica permeabilização da MP, enquanto a coloração nuclear expressa comprometimento no reparo dessa estrutura (Krapoth *et al.*, 2024). Com base nessa marcação, nossos resultados revelaram que mioblastos irradiados previamente com LBP, nos parâmetros utilizados, apresentaram uma permeabilização controlada da MP (Figura 21, 22). Essa alteração foi observada na ausência de Ca^{2+} extracelular, onde as células exibiram uma coloração positiva para IP, dado sugestivo de que a irradiação foi capaz de gerar um distúrbio na MP suficientes para permitir a entrada do corante, caracterizando uma alteração da integridade da membrana. No entanto, na presença de Ca^{2+} , as células irradiadas apresentaram níveis significativamente menores de coloração por IP, evidenciando que a MP das células irradiadas foi reparada por um processo dependente de Ca^{2+} extracelular. Esses achados estão em concordância com estudos prévios que demonstram que o influxo de Ca^{2+} é um sinalizador essencial para o acionamento da maquinaria de RM (McNeil *et al.*, 2001; Idone *et al.*, 2008; Scheffer *et al.*, 2014).

Assim como toxinas formadoras de poros e danos mecânicos já descritos na literatura (Corrotte *et al.*, 2013), a irradiação com LBP demonstrou ser um estímulo físico eficaz para a indução do RM. Este é um achado inédito e relevante, pois aponta o LBP como uma ferramenta não invasiva capaz de modular eventos celulares iniciais relacionados ao RM, abrindo novas perspectivas para seu uso em contextos terapêuticos. Ainda que os mecanismos moleculares envolvidos neste processo permaneçam pouco esclarecidos, os resultados aqui apresentados reforçam o potencial bioestimulador do LBP e sua aplicação em modelos de estudo do reparo celular (Idone *et al.*, 2008; Corrotte *et al.*, 2013; Andrews *et al.*, 2014, Andrade; Andrews 2015).

Para aprofundar a hipótese de que a irradiação com LBP induz alterações na MP capazes de acionar o reparo celular via influxo de Ca^{2+} , foi realizado o experimento com marcador fluorescente de Ca^{2+} Fluo-4/AM (Luo *et al.*, 2011). Os resultados indicaram um aumento significativo da fluorescência em mioblastos irradiados, sugerindo um aumento na concentração de Ca^{2+} citosólico logo após o estímulo com o LBP (Figura 23). Este achado reforça a hipótese de que a irradiação promove uma permeabilização da MP, permitindo o influxo de Ca^{2+} extracelular, evento chave nos mecanismos de ativação do RM.

É importante destacar que a marcação com Fluo-4/AM foi realizada na presença de Ca^{2+} no meio extracelular. Dessa forma, o aumento da fluorescência intracelular observado pode decorrer tanto do influxo de íons Ca^{2+} a partir do meio externo quanto da liberação de Ca^{2+} proveniente de estoques intracelulares.

O aumento dos níveis de cálcio intracelular observada em nosso estudo é compatível com a literatura, que aponta a rápida mobilização de Ca^{2+} como um dos primeiros eventos celulares após lesões na MP (Horn *et al.*, 2018; Ammendolia *et al.*, 2021). O papel do Ca^{2+} nesse contexto é essencial não apenas para o selamento da MP, mas também para a exocitose lisossomal, mobilização do citoesqueleto e recrutamento de proteínas envolvidas no processo de RM (Miyake *et al.*, 1995; Corrotte *et al.*, 2013; Castro-Gomes *et al.*, 2014; Jimenez *et al.*, 2014; Corrotte; Castro-Gomes 2019).

Assim, os dados sobre o influxo de Ca^{2+} corroboram os resultados obtidos com os resultados de IP e fortalecem a hipótese de que o LBP atua como um indutor físico de alterações iniciais na MP, capazes de desencadear um processo coordenado de reparo celular dependente de Ca^{2+} . Esse mecanismo representa uma alternativa inovadora e segura para estudar a fisiologia do reparo e, potencialmente, modular respostas celulares em contextos patológicos.

A participação lisossomal, elemento essencial nos mecanismos de endocitose e RM, foi investigada em nosso estudo por meio da imunomarcção dos lisossomos com anti-LAMP-1. As análises revelaram que, em mioblastos previamente irradiados com LBP, os lisossomos apresentaram um padrão de redistribuição, caracterizado pela dispersão dessas organelas da região perinuclear em direção à periferia celular. Esse perfil difere da organização dos lisossomos no grupo controle, predominantemente perinuclear, e foi confirmado pelas análises quantitativas de intensidade de fluorescência (Figuras 24 e 25).

A mobilização de lisossomos é amplamente descrita como um passo essencial no RM, sendo dependente do influxo de Ca^{2+} que promove a fusão dessas organelas à MP (Andrews *et al.*, 2014). Uma vez integrados a MP, os lisossomos liberam hidrolases ácidas que atuam sobre a superfície da MP favorecendo a remoção de regiões lesionadas e contribuindo para o restabelecimento da integridade celular (Rodríguez *et al.*, 1997; Andrews *et al.*, 2014; Andrews *et al.*, 2018; Tancini *et al.*, 2020).

Nossos resultados estão de acordo com estudos que demonstram o envolvimento direto de lisossomos na resposta a lesões de membrana. McNeil; Kirchhausen (2005), e Jimenez *et al.*, (2014) demonstraram que a exocitose lisossomal é fundamental para o selamento rápido da MP, enquanto Corrotte *et al.*, (2013) evidenciaram a atuação complementar entre exocitose lisossomal e endocitose mediada por cavéolas, mecanismos que podem ocorrer de forma paralela ou sequencial dependendo da natureza e intensidade da lesão.

Em células musculares, a imediata redistribuição de lisossomos para a periferia celular após uma lesão, foi associada a maior eficiência de reparo, garantindo a manutenção da homeostase celular frente a estresses mecânicos (Defour *et al.*, 2014). Nesse contexto, a irradiação com LBP demonstrou ser um estímulo físico

capaz de desencadear a ativação coordenada de múltiplas vias de RM por endocitose, sem comprometer a viabilidade celular, o que reforça seu potencial como ferramenta experimental para investigar a dinâmica de reparo mediada por lisossomos e como modulador em situações patológicas que envolvem dano a MP.

A análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) complementou os dados obtidos nos ensaios anteriores ao revelar, em escala ultra-estrutural, alterações morfológicas no grupo de mioblastos irradiados previamente com LBP. Observou-se evidências de alterações da MP, como áreas de formação de protrusões, alterações frequentemente relacionadas aos estágios iniciais do processo de reparo (McNeil; Kirchhausen, 2005; Andrews *et al.*, 2014). Dentre essas alterações, destacam-se a presença de vesículas localizadas junto à MP, com diâmetro inferior a 80 nm, compatíveis com cavéolas (Figura 26). A presença dessas estruturas é indicativa de ativação de mecanismos de endocitose, reforçando a ocorrência de lesão com subsequente acionamento do RM (Corrotte *et al.*, 2013; Jimenez *et al.*, 2014).

As cavéolas são invaginações especializadas da MP ricas em colesterol e caveolina-1, com funções críticas na sinalização celular, homeostase mecânica e tráfego vesicular (Stea; 2025). Em resposta a diferentes tipos de lesões, estudos demonstraram que essas estruturas podem ser internalizadas como parte de um mecanismo de remoção seletiva de domínios lesionados da MP, promovendo a restauração de sua integridade (Corrotte *et al.*, 2013; Parton, 2018; Stea; 2025).

A endocitose mediada por cavéolas tem sido descrita como uma via eficiente e rápida de RM em células submetidas a estresse mecânico ou químico, atuando de forma complementar à exocitose lisossomal na restauração da barreira celular (Andrews *et al.*, 2014; Parton, 2018). Portanto, nossos resultados com as análises de MET ofereceram evidências morfológicas consistentes de que o LBP induz lesões capazes de ativar a maquinaria de RM, especialmente por vias associadas à endocitose mediada por cavéolas, sem causar morte celular, consolidando seu potencial como ferramenta bioestimuladora em modelos de lesão e reparo celular.

O reparo de lesões na MP de células eucarióticas é um processo explorado pelo *T. cruzi* para viabilizar sua entrada em diferentes tipos celulares, favorecendo

sua permanência e disseminação no hospedeiro mamífero. Fernandes *et al.*, (2011) demonstraram que a forma tripomastigota do *T. cruzi* foi capaz de lesionar a MP das células hospedeiras, e que essas lesões foram rapidamente reparadas na presença de Ca^{2+} extracelular, mecanismo observado neste trabalho com o uso do LBP que também induziu o reparo de membrana de forma dependente de Ca^{2+} extracelular.

Além disso, também foi observado que a eficiência da invasão aumentava quando as células eram lesionadas quimicamente (Fernandes *et al.*, 2011; 2012). Nesse contexto, os autores descreveram que a lesão gerada pelo *T. cruzi* na MP induzia a exocitose lisossomal com liberação de esfingomielinase ácida (ASM), promovendo a produção de ceramida e ativação de vias endocíticas. Essa sequência culminava na formação de cavéolas enriquecidas com ceramida, favorecendo a formação do vacúolo parasitóforo (Figura 11), estrutura responsável por abrigar o parasito no citoplasma da célula hospedeira (Fernandes *et al.*, 2011; 2012).

Essas observações sustentam a hipótese de que a ativação do RM beneficia diretamente a eficiência de invasão do *T. cruzi*, especialmente em células musculares e cardíacas, que por sua natureza contrátil ativam com maior frequência a maquinaria de reparo (Fernandes *et al.*, 2011; 2012). Com base nos dados obtidos neste estudo, que demonstraram a capacidade do LBP em induzir e ativar os mecanismos de RM dependentes de Ca^{2+} , e considerando evidências prévias de que o *T. cruzi* subverte a maquinaria de reparo para facilitar sua entrada em células hospedeiras, analisou-se se a irradiação prévia com LBP de mioblastos poderia potencializar a taxa de invasão do parasito.

De fato, nossos resultados revelaram que mioblastos previamente irradiados com LBP apresentaram um aumento significativo no número de protozoários internalizados em relação ao grupo não irradiado (Figura 27). Este achado sugere que a fotobiomodulação, ao induzir a ativação do RM, contribui para a maior eficiência da invasão, provavelmente por modular vias endocíticas associadas ao processo de entrada do *T. cruzi*.

Integrando os achados relacionados ao aumento da taxa de invasão celular, buscou-se avaliar se a irradiação prévia com LBP também influenciaria eventos subsequentes à entrada do *T. cruzi*, especialmente sua replicação e sobrevivência celular. Nossos resultados demonstraram que a irradiação prévia com LBP

favoreceu a replicação e a manutenção da infecção por *T. cruzi* (no quinto e sétimo dia pós-infecção), uma vez que culturas irradiadas liberaram maior número de tripomastigotas em relação aos controles não irradiados (Figura 28). Esses dados sugerem que, além de facilitar a invasão inicial, a irradiação com LBP também promove um ambiente intracelular mais favorável à replicação e diferenciação do parasito.

Nossos resultados estão em consonância com estudos que apontam que a fotobiomodulação pode modular processos celulares que, indiretamente, beneficiam o desenvolvimento intracelular do parasito, como o aumento da atividade mitocondrial, da disponibilidade de ATP e da biossíntese de lipídios, elementos explorados pelo *T. cruzi* para sua replicação (Karu, 1999; Su; Wu, 2025). Tais alterações bioquímicas e metabólicas impactam diretamente a homeostase celular, podendo criar um microambiente intracelular mais permissivo à replicação do *T. cruzi* ao favorecer a biossíntese de lipídios, o fornecimento de energia ou a modulação de vias de sinalização envolvidas na diferenciação do protozoário (Su; Wu, 2025).

Além disso, já foi demonstrado que este protozoário se aproveita de mecanismos associados ao RM e ao acúmulo de CLs para sustentar sua sobrevivência no interior da célula hospedeira (Tavares *et al.*, 2021; Oliveira *et al.*, 2022). A ausência de diferença significativa entre os dias 5 e 7 sugere que a LBP potencializa a infecção em estágios iniciais, mas não altera a cinética de liberação do parasito ao longo do tempo.

Embora nossos resultados indiquem que a irradiação com LBP favorece a replicação e a manutenção da infecção por *T. cruzi* em mioblastos, estudos anteriores apontam que esse efeito pode variar conforme o organismo e as condições experimentais. Rocha *et al.*, (2014) observaram que LBP reduziu a atividade mitocondrial e não aumentou a infectividade de *Leishmania amazonensis*, enquanto estudos com *Paramecium primaurelia* demonstraram que fluências moderadas de 808 nm aumentam consumo de oxigênio e produção de ATP, evidenciando estímulo metabólico (Amaroli *et al.*, 2016). Esses achados sugerem que o impacto do LBP sobre parasitos intracelulares depende de parâmetros de irradiação, tipo de célula hospedeira e estágio da infecção.

Portanto, os resultados deste estudo sugerem que a fotobiomodulação não apenas facilita a entrada inicial de *T. cruzi*, mas também cria condições celulares mais favoráveis à sua permanência. Esses achados reforçam a evidência de que a fotobiomodulação pode modular processos infecciosos, embora este efeito dependa fortemente dos parâmetros de irradiação, da cepa do parasito, do estágio da infecção, do tipo celular e do delineamento experimental. Estudos futuros são necessários para elucidar os mecanismos moleculares envolvidos nessa modulação e definir o limiar de dose em que o LBP deixa de favorecer o parasito e passa a exercer efeito inibitório ou controlador sobre a infecção.

Considerando que a fotobiomodulação favoreceu tanto a invasão quanto a replicação intracelular do *T. cruzi*, e que esses efeitos parecem estar associados à ativação da via de RM, o próximo objetivo foi investigar se a irradiação com LBP também influenciaria a biogênese de CLs. Essas organelas participam indiretamente do RM, atuando como reservatórios de lipídios essenciais para a restauração da bicamada lipídica (Jarc; Pecan, 2019). Além disso, exercem papel crucial durante a infecção por *T. cruzi*, funcionando como nichos metabólicos e como fontes de mediadores lipídicos que favorecem a sobrevivência, a replicação e a modulação da resposta imune do parasito (Almeida *et al.*, 2018).

Assim, mioblastos foram infectados *in vitro* com *T. cruzi* e, após 24 horas, os grupos controle, irradiado, infectado, irradiado e infectado, foram analisados quanto à biogênese de CLs, por imunofluorescência. Os resultados revelaram um aumento significativo no número de CLs nos grupos infectado, irradiado e irradiado-infectado quando comparados ao grupo controle. Esses achados indicam que tanto a infecção por *T. cruzi* quanto a irradiação prévia com LBP estimulam a biogênese dessas organelas em mioblastos (Figura 29). Além disso os grupos, irradiado, e irradiado e infectado, apresentaram uma biogênese ainda mais expressiva de CLs em relação ao grupo infectado, sugerindo um possível efeito potencializador da fotobiomodulação sobre os mecanismos celulares envolvidos nesse processo.

Os CLs são verdadeiros nichos de sobrevivência para diversos patógenos intracelulares, os quais desenvolveram mecanismos para subverter o metabolismo do hospedeiro, sendo capazes de usar os CLs como fonte para o crescimento e replicação, maturação do vacúolo parasitóforo, e imunossupressão do sistema

imune do hospedeiro através da produção de PGE₂ (Toledo *et al.*, 2016; Vallochi *et al.*, 2018; Tan *et al.*, 2024).

Pesquisas já publicadas evidenciam que diversos patógenos como o *Mycobacterium bovis*, são capazes de induzir a biogênese de CLs em células do hospedeiro (Almeida *et al.*, 2009, D'Avila *et al.*, 2006, Rajaram *et al.*, 2014), além de trabalhos existentes demonstrando o aumento dessas organelas em macrófagos infectados por *Mycobacterium leprae* (Mattos *et al.*, 2010) e por *T. cruzi* (Melo *et al.*, 2006, D'Ávilla *et al.*, 2011) sinalizando a importância dessa organela em processos celulares e infecciosos. Portanto, a indução da biogênese de CLs pela fotobiomodulação representa um fator adicional que favorece o estabelecimento da infecção.

Além disso, os dados previamente apresentados neste trabalho demonstraram que o LBP promove a permeabilidade da MP e ativa mecanismos de reparo dependentes de Ca²⁺. Desta forma, os dados aqui apresentados sugerem que a fotobiomodulação modula, simultaneamente, dois processos importantes envolvidos na fisiopatologia da infecção por *T. cruzi*: o RM e a biogênese de CLs. A atuação combinada sobre essas vias pode representar uma condição favorável à progressão da infecção, embora os mecanismos moleculares específicos ainda necessitem ser elucidados.

A interpretação dos resultados deste estudo apresenta desafios, especialmente pelo seu caráter inédito, uma vez que, até o momento, não há relatos na literatura que correlacionem diretamente os efeitos da fotobiomodulação com a biogênese de CLs e a ativação da via de RM em mioblastos infectados por *T. cruzi*. Assim, os dados aqui apresentados ampliam o entendimento sobre as múltiplas interfaces da fotobiomodulação na biologia celular do hospedeiro e reforçam a necessidade de investigações adicionais que visem esclarecer como o LBP interfere nas vias associadas ao RM, à biogênese de CLs e à progressão da infecção por *T. cruzi*.

Dando continuidade à investigação sobre os mecanismos envolvidos na biogênese de CLs induzida pela infecção por *T. cruzi* e pela irradiação com LBP, avaliou-se a produção de prostaglandina E₂ (PGE₂), um eicosanoide bioativo diretamente relacionado à biogênese e função dos CLs (Vallochi *et al.*, 2018). A

análise por ELISA revelou um aumento significativo nos níveis de PGE₂ nos grupos submetidos à irradiação com LBP (LBP), à infecção por *T. cruzi* (*T. cruzi*) e à combinação dos dois tratamentos (LBP + *T. cruzi*), em comparação ao grupo controle (Figura 30). Esses resultados indicam que, em mioblastos, tanto a fotobiomodulação quanto a infecção, isoladamente, estimulam a liberação de PGE₂. Tais dados estão alinhados com evidências prévias que demonstraram que a infecção por *T. cruzi* eleva a síntese de PGE₂, como mecanismo para subverter a resposta imune do hospedeiro (Lonien *et al.*, 2017; Lovo-Martins *et al.*, 2019). De modo semelhante, outros patógenos, como *Leishmania spp.* e *Mycobacterium tuberculosis*, também induzem a geração de PGE₂ a partir dos CLs, estratégia que contribui para a criação de um ambiente intracelular propício à infecção (D'Avila *et al.*, 2011; Almeida *et al.*, 2018).

Além disso, os resultados do presente estudo são compatíveis com evidências de que a irradiação com LBP pode influenciar vias inflamatórias e metabólicas lipídicas. Estudos prévios demonstraram que a fotobiomodulação pode induzir a expressão de ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e modular a produção de prostaglandinas em diversos tipos celulares; entretanto, esse efeito é altamente dependente dos parâmetros de irradiação e do modelo experimental, de modo que tanto indução quanto supressão de COX-2/PGE₂ foram relatadas na literatura (Tim *et al.*, 2016; Tomazoni *et al.*, 2021).

A PGE₂ é um metabólito clássico da via do ácido araquidônico, armazenado em CLs os quais atuam não apenas como organelas de armazenamento lipídico, mas também como plataformas cruciais para a sinalização inflamatória. A literatura atual destaca que essas organelas atuam como centros de produção de mediadores lipídicos pró-infecciosos, como PGE₂ e leucotrieno B₄ (LTB₄), modulando a polarização da resposta imune e facilitando a replicação intracelular de patógenos (Toobian *et al.*, 2021; Tan *et al.*, 2024).

Com base nos resultados anteriores, que demonstraram o aumento do número de CLs e o da liberação de PGE₂ nos grupos irradiados previamente com LBP, ativação coordenada das vias lipogênicas reguladas por PPAR γ e SREBP-1, buscou-se investigar se a modulação deste processo biológico estaria relacionada à ativação de vias metabólicas reguladas por fatores-chave do metabolismo lipídico. A

formação de CLs é um processo altamente regulado, que depende da coordenação de sinais metabólicos e inflamatórios, sendo controlada por fatores de transcrição como o SREBP-1 (Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1) e o receptor nuclear PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma) (Almeida *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2019).

Neste estudo, os resultados demonstraram um aumento significativo de PPAR γ e SREBP-1 nos grupos irradiados previamente com LBP, infectados por *T. cruzi* e no grupo previamente irradiado e infectado, em comparação ao grupo controle. Esse padrão, confirmado por densitometria das bandas, corrobora a hipótese de que a indução de CLs observada nos experimentos anteriores resulta da ativação coordenada de vias de regulação do metabolismo lipídico específicas (Figura 31).

O PPAR γ é amplamente reconhecido como regulador mestre da adipogênese e do armazenamento lipídico, promovendo a transcrição de genes envolvidos na captação e esterificação e organização dos lipídios em CLs, enquanto o SREBP-1, particularmente sua isoforma 1c, atua na indução da expressão de genes envolvidos na lipogênese como FAS, ACC e DGAT (Toobian *et al.*, 2021), essenciais para a síntese de ácidos graxos e triglicerídeos (Tanigawa *et al.*, 2021; Soares *et al.*, 2023). A ativação concomitante dessas vias sugere um ajuste metabólico, direcionado à formação e manutenção de CLs.

No contexto da interação patógeno-hospedeiro, há evidências de que *T. cruzi* manipula vias lipídicas para favorecer sua sobrevivência e replicação. D'Avila *et al.*, (2011) e Atella *et al.*, (2022) demonstraram que a infecção estimula a formação de CLs em fibroblastos e macrófagos, os quais atuam como plataformas para a síntese de eicosanoides e possivelmente como reservatórios energéticos acessíveis ao parasito. Os dados deste trabalho que revelam o aumento da expressão de PPAR γ e SREBP-1, em mioblastos infectados, reforça a teoria de que esse remodelamento lipídico não se limita a células do sistema imune, mas pode ocorrer também em células precursoras do tecido muscular, potencialmente contribuindo para a persistência do parasito no hospedeiro crônico.

De forma interessante, a fotobiomodulação, mesmo na ausência de infecção, também promoveu aumento da expressão desses reguladores. Isso sugere que a fotobiomodulação induz um estado metabólico propício ao acúmulo de lipídios,

possivelmente por ativação de vias anabólicas e redução do estresse oxidativo (Su; Wu, 2025). Essa alteração, embora potencialmente benéfica para a regeneração tecidual e a homeostase celular, pode representar um microambiente favorável para patógenos intracelulares que dependem de lipídios do hospedeiro.

Assim, os achados deste estudo reforçam a hipótese de que a fotobiomodulação não apenas estimula a biogênese de CLs, mas o faz por meio da ativação coordenada de vias lipogênicas específicas. A modulação de PPAR γ e SREBP-1 parece representar um componente funcional crítico da resposta celular à irradiação com LBP, influenciando tanto o metabolismo quanto a dinâmica intracelular durante a infecção por *T. cruzi*. Nossos resultados sugerem uma possível correlação entre os efeitos metabólicos induzidos pela irradiação com o LBP e os mecanismos utilizados pelo parasito para subverter processos celulares. Com isso, ampliam-se as perspectivas sobre os impactos da fotobiomodulação no contexto da infecção e abrem-se novas possibilidades de investigação no campo do imunometabolismo.

Portanto, os dados obtidos neste trabalho fortalecem a hipótese de que os efeitos da LBP sobre a biogênese de CLs modulam um eixo funcional que inclui a ativação de vias lipogênicas (SREBP-1 e PPAR γ) e a produção de eicosanoides inflamatórios, como a PGE₂. Essa modulação metabólica pode representar uma estratégia utilizada pelo *T. cruzi* para potencializar sua permanência e replicação no ambiente intracelular. Adicionalmente, os achados sugerem que a fotobiomodulação pode intensificar essa resposta ao modular o metabolismo lipídico condizente com os mecanismos de adaptação do parasito, especialmente ao promover a geração de mediadores que desviam ou suprimem a resposta imune efetora.

Uma vez que a irradiação com LBP modulou mediadores lipídicos pró-inflamatórios, como a prostaglandina E₂ (PGE₂), associada à infecção por *T. cruzi* e à biogênese de CLs, avaliou-se, *in vitro*, em mioblastos, o impacto da fotobiomodulação sobre a produção de citocinas inflamatórias, moléculas produzidas e secretadas pelas células para comunicação intercelular (Chauhan, 2021).

Diversos estudos (Zhevago *et al.*, 2006; Gavish *et al.*, 2008; Mesquita-Ferrari *et al.*, 2011; Fukuda *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2014) demonstraram que a irradiação com LBP é capaz de alterar os níveis de moléculas pró e anti-inflamatórias, utilizando

diferentes parâmetros de irradiação. Experimentos realizados tanto *in vitro* quanto *in vitro* evidenciaram o potencial modulador da irradiação com LBP sobre fatores como TNF- α , TGF- β , IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , MCP-1, IL-6, IL-10 e IL-12 (Zhevago *et al.*, 2006; Gavish *et al.*, 2008; Mesquita-Ferrari *et al.*, 2011; Fukuda *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2014).

Nossos resultados demonstraram que a irradiação com LBP reduziu significativamente os níveis de IL-6 em comparação ao grupo controle (Figura 32 A), corroborando o efeito anti-inflamatório da fotobiomodulação descrito na literatura (Ryu *et al.*, 2023; Shamloo *et al.*, 2023). A IL-6, citocina pleiotrópica central na inflamação crônica, apresentou aumento significativo no grupo infectado, em concordância com estudos que descrevem sua indução durante a infecção por *T. cruzi* (Antunes *et al.*, 2019; Macaluso *et al.*, 2023). Quando a irradiação prévia foi associada à infecção, os níveis de IL-6 permaneceram elevados em relação ao grupo controle, indicando que, nesse contexto, a fotobiomodulação não foi suficiente para impedir completamente sua produção induzida pela infecção (Figura 32 A).

A irradiação com LBP promoveu redução significativa dos níveis de TNF- α em relação ao grupo controle (Figura 32 B), reforçando seu efeito anti-inflamatório, já descrito na literatura (Ryu *et al.*, 2023; Shamloo *et al.*, 2023). No grupo infectado, observou-se aumento expressivo de TNF- α , em concordância com a literatura que descreve a indução clássica dessas citocinas durante a infecção por *T. cruzi* (Antunes *et al.*, 2019; Macaluso *et al.*, 2023). No grupo infectado previamente irradiado, os níveis de TNF- α foram maiores em relação ao grupo controle, e menores em relação ao grupo infectado, indicando que a fotobiomodulação foi capaz de atenuar parcialmente a resposta pró-inflamatória induzida pela infecção (Figura 32 B).

A IL-12 não apresentou alterações após a irradiação prévia com LBP (Figura 32 C). Diferentemente, no grupo infectado, observou-se aumento significativo dos níveis IL-12 em comparação com o grupo controle, em consonância com seu papel clássico na ativação da resposta imune celular e na indução da produção de IFN- γ , fundamentais para o controle do parasito (Cardoso *et al.*, 2016; Macaluso *et al.*, 2023). No grupo infectado previamente irradiado, os níveis de IL-12, notavelmente, mantiveram-se basais, o que está de acordo com estudos que demonstram que a

fotobiomodulação pode reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-12 de maneira dependente do contexto celular e do estado imunológico pré-existente (Santos *et al.*, 2021).

Observou-se aumento significativo da IL-10 nos grupos irradiado, infectado, e infectado previamente irradiado, em relação ao grupo controle (Figura 32 D), corroborando achados prévios que descrevem o efeito imunomodulador da fotobiomodulação (Shamloo *et al.*, 2023; Alves *et al.*, 2025). O aumento simultâneo da IL-10 nos grupos experimentais reforça o papel do LBP na indução de mediadores anti-inflamatórios, contribuindo para o controle da ativação do sistema imune. Em modelos musculares, esse aumento pode favorecer a proteção celular frente ao estresse inflamatório, regulando vias associadas à sobrevivência, reparo e regeneração (Tu; Li, 2023; Huynh *et al.*, 2023). No entanto, no contexto da infecção por *T. cruzi*, o aumento de IL-10 pode também favorecer a evasão imunológica do parasito ao reduzir a ativação de mecanismos efetores de defesa (Grijalva *et al.*, 2022).

Em conjunto, os resultados indicam que a fotobiomodulação atua modulando negativamente citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e IL-12, ao mesmo tempo em que estimula mediadores anti-inflamatórios, como a IL-10, promovendo um equilíbrio entre os eixos pró- e anti-inflamatórios. Essa regulação, é essencial para limitar a ativação exacerbada de células do sistema imune, e para favorecer processos de reparo muscular, prevenindo danos teciduais secundários à inflamação intensa (Tu; Li, 2023). Deste modo, o LBP parece modular a resposta inflamatória e metabólica de forma dependente do contexto celular e do estado imunológico pré-existente, ajustando estímulos pró- e anti-inflamatórios, além de ser capaz de alterar a dinâmica da interação hospedeiro-parasito durante a infecção.

Assim, como contribuição, nosso trabalho demonstrou que a fotobiomodulação aplicada previamente, *in vitro*, em mioblastos, exerce efeitos tanto em condições de homeostasia quanto durante a infecção por *T. cruzi*. Esses efeitos abrangem desde a permeabilização transitória da MP e ativação de processos de RM mediados por endocitose, mediados por influxo de Ca^{2+} extracelular, até modificações no metabolismo lipídico, incluindo a biogênese de CLs e a indução da expressão de reguladores como PPAR γ e SREBP-1, com impacto na produção de mediadores

inflamatórios como PGE_2 e citocinas pró e anti-inflamatórias (Figura 33). Adicionalmente, a fotobiomodulação também se mostrou capaz de aumentar a invasão inicial por *T. cruzi* e potencializou sua replicação em mioblastos. verificou-se que a infecção por *T. cruzi* também foi capaz de induzir alterações no metabolismo lipídico, na síntese de mediadores inflamatórios e na modulação de citocinas, evidenciando que mioblastos participam ativamente na montagem de uma resposta imune local (Figura 33).

Esses achados ampliam a compreensão do papel das células musculares esqueléticas na interação parasito-hospedeiro e sugerem que a fotobiomodulação, ao modular tanto vias metabólicas quanto imunológicas, pode influenciar o curso da infecção e a resposta tecidual.

Perspectivas futuras envolvem o aprofundamento das investigações para elucidar, de forma integrada, os mecanismos celulares e moleculares subjacentes aos efeitos da fotobiomodulação. No contexto sistêmico da infecção por *T. cruzi*, a expansão dos estudos para modelos *in vitro* será fundamental para validar, os achados obtidos em condições *in vitro*. Paralelamente, a exploração de diferentes parâmetros de irradiação, tempos de aplicação e tipos celulares poderá fornecer informações valiosas para otimizar a eficácia dessa abordagem.

Também se destaca a importância de avaliar a fotobiomodulação em distintos estágios do ciclo do parasito e sob variadas condições fisiopatológicas, com o objetivo de identificar alvos-chave da modulação imunometabólica. Esse conjunto de avanços contribuirá para o delineamento de estratégias terapêuticas inovadoras, capazes de regular de forma precisa as respostas imunes e favorecer a recuperação tecidual, com especial relevância para a Doença de Chagas entre outras doenças infecciosas.

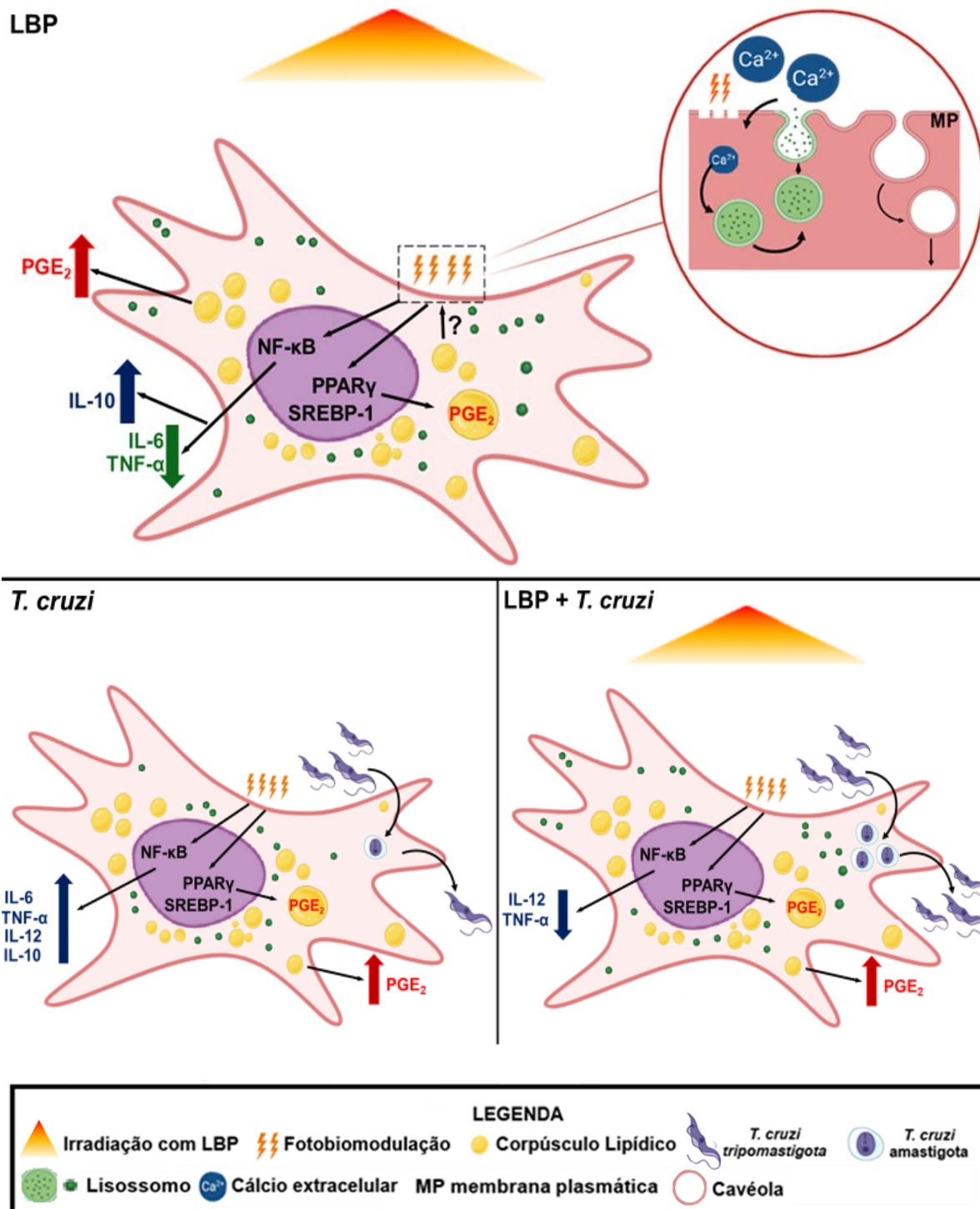


Figura 33. Desenho esquemático do efeito da fotobiomodulação em mioblastos previamente irradiados, infectados ou não, com *T. cruzi*. Nosso estudo sugere que a irradiação prévia com Laser de Baixa Potência (LBP) ativa o reparo da membrana plasmática (MP), modula a infecção por *T. cruzi*, a biogênese de corpúsculos lipídicos (CLs) e a produção de mediadores inflamatórios. Em (LBP), mioblasto irradiado não infectado: a irradiação prévia aumentou a biogênese de CLs, a expressão de PPAR γ e SREBP-1, a produção de PGE $_2$ e da citocina IL-10, enquanto reduziu significativamente os níveis de IL-6 e TNF- α em relação ao controle. As vesículas em verde representam a dispersão dos lisossomos, observada nos grupos irradiados (LBP) e (LBP + *T. cruzi*), ao contrário à célula não irradiada (*T. cruzi*), na qual os lisossomos permanecem predominantemente concentrados na região perinuclear. A área demarcada da MP foi ampliada, evidenciando o efeito do LBP, que induz microlesões na MP, restauradas por reparo de membrana via endocitose, processo dependente do influxo extracelular de Ca $^{2+}$. Em (*T. cruzi*), mioblasto infectado não irradiado: a

infecção aumentou a biogênese de CLs, a expressão de PPAR γ e SREBP-1, a produção de PGE $_2$ e das citocinas IL-6, TNF- α , IL-12 e IL-10 em relação ao controle. Em (LBP + *T. cruzi*), mioblasto irradiado e infectado: a irradiação prévia aumentou a biogênese de CLs, a expressão de PPAR γ e SREBP-1 e a produção de PGE $_2$. Em comparação com o grupo infectado não irradiado, o grupo previamente irradiado apresentou redução das citocinas IL-12 e TNF- α , além de um perfil negativo para IL-10. O número de *T. cruzi* internalizados e de parasitos replicados após 5 e 7 dias foi maior no grupo irradiado infectado (LBP + *T. cruzi*) em comparação ao infectado não irradiado (*T. cruzi*).
Elaboração própria, 2025.

7. CONCLUSÕES

7.1) Efeito da fotobiomodulação prévia sobre o Reparo de Membrana

De acordo com os resultados dos experimentos *in vitro* com a Fotobiomodulação, sobre os mecanismos de Reparo de Membrana (RM) concluímos que a irradiação prévia com Laser de Baixa Potência (LBP), em mioblastos:

- Não comprometeu significativamente a viabilidade celular dos mioblastos;
- Induziu aumento da permeabilidade da membrana plasmática (MP), com aumento de Ca^{2+} extracelular, sugerindo ativação do RM;
- Induziu a redistribuição dos lisossomos em direção a periferia celular, sugerindo o recrutamento dessas organelas para o RM;
- Desencadeou mecanismos envolvidos no processo de reparo da MP por endocitose, como a formação de vesículas endocíticas do tipo cavéola (≤ 80 nm).

7.2) Efeito da fotobiomodulação prévia sobre a infecção por *T. cruzi*, no metabolismo lipídico e na resposta inflamatória

De acordo com os resultados dos experimentos *in vitro* com a Fotobiomodulação, sobre a infecção por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), sobre o metabolismo lipídico e a resposta inflamatória, concluímos que a irradiação prévia com LBP:

- Promoveu maior internalização de *T. cruzi* após 24 horas e potencializou a replicação e sobrevivência parasitária;
- Estimulou a biogênese de Corpúsculos Lipídicos (CLs), tanto na presença quanto na ausência da infecção por *T. cruzi*, após 24 horas, favorecendo a adaptação do parasito e a modulação da resposta do hospedeiro;

- Aumentou a expressão dos fatores de transcrição SREBP-1 e PPAR γ , reguladores centrais do metabolismo lipídico e da formação de CLs;
- Aumentou a produção de PGE₂ nos grupos experimentais, aumento este possivelmente relacionado à maior formação de CLs e à modulação da resposta imune no contexto da infecção;
- Modulou os níveis de IL-6, TNF- α , IL-12 e IL-10 nos grupos experimentais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO, G.R. *et al.* The Unsolved Jigsaw Puzzle of the Immune Response in Chagas Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1-23, 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01929.

ALBA-ALVARADO, M. C.; TORRES-GUTIÉRREZ, E.; REYNOSO-DUCOING, O. A.; *et al.* Immunopathological Mechanisms Underlying Cardiac Damage in Chagas Disease. **Pathogens**, v. 12, n. 2, p. 1–13, 2023. DOI: 10.3390/pathogens12020335.

ALBAREDA, M. C. *et al.* *Trypanosoma cruzi* modulates the profile of memory CD8+ T cells in chronic Chagas' disease patients. **International Immunology**, v. 18, n. 3, p. 465–471, 2006. DOI: 10.1093/intimm/dxh387.

ALMEIDA, P. E. *et al.* *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin Infection Induces TLR2-Dependent Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Expression and Activation: Functions in Inflammation, Lipid Metabolism, and Pathogenesis. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 2, p. 1337–1345, 2009. DOI: 10.1515/crll.1891.108.269.

ALMEIDA, P. E.; ROQUE, N. R.; MAGALHÃES, K. G.; *et al.* Differential TLR2 downstream signaling regulates lipid metabolism and cytokine production triggered by *Mycobacterium bovis* BCG infection. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1841, n. 1, p. 97–107, 2014. DOI: 10.1016/j.bbalip.2013.10.008.

ALMEIDA, P. E. DE *et al.* Lipid bodies as sites of prostaglandin E2 synthesis during Chagas disease: Impact in the parasite escape mechanism. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. (mar), p. 1–8, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00499.

ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ, D.-A. *et al.* Chagas disease: Current perspectives on a forgotten disease. **Revista Médica del Hospital General de México**, v. 81, n. 3, p. 154–164, 2016. DOI: 10.1016/j.hgmx.2016.09.010.

ALVES, C. E.; SANTOS, TAWANYDURAN, C. C. G.; ZAMUNER, S. R.; *et al.* Effect of Photobiomodulation Therapy on Pulmonary Inflammation in an Experimental Model of Chronic Asthma: A Dosimetric Study. **Allergies**, v. 5, n. 33, p. 1–13, 2025. DOI: 10.22541/au.173944466.66560702/v1.

AMAROLI, A.; RAVERA, S.; PARKER, S.; *et al.* 808-nm laser therapy with a flat-top handpiece photobiomodulates mitochondria activities of *Paramecium primaurelia* (Protozoa). **Lasers in Medical Science**, v. 31, n. 4, p. 741–747, 2016. DOI: 10.1007/s10103-016-1901-3.

AMMENDOLIA, D. A.; BEMENT, W. M.; BRUMELL, J. H. Plasma membrane integrity: implications for health and disease. **BMC Biology**, v. 19, n. 71, p. 1–29, 2021. DOI: 10.1186/s12915-021-00972-y.

ANDRADE, L. O. *et al.* Differential tissue distribution of diverse clones of

Trypanosoma cruzi in infected mice. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 100, n. 2, p. 163–172, 1999. DOI: 10.1016/S0166-6851(99)90035-X.

ANDREWS, N. W.; WHITLOW, M. B. Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin active at low pH. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 33, n. 3, p. 249–256, 1989. DOI: 10.1016/0166-6851(89)90086-8.

ANDREWS, N. W.; ALMEIDA, P. E.; CORROTTE, M. Damage Control: Cellular Mechanisms of Plasma Membrane Repair. **Trends Cell Biol**, v. 24, n. 12, p. 734–742, 2014. DOI: 10.1016/j.tcb.2014.07.008.

ANDREWS, N. W.; CORROTTE, M. Plasma membrane repair. **Current Biology**, v. 28, n. 8, p. R392–R397, 2018. DOI: 10.1016/bs.ctm.2019.08.002.

ARJMAND, B.; KHODADOST, M.; SHERAFAT, S. J.; *et al.* Low-Level Laser Therapy: Potential and Complications. **Journal of Lasers in Medical Sciences**, v. 12, p. 1–4, 2021. DOI: 10.34172/jlms.2021.42.

ATELLA, T., BITTENCOURT-CUNHA, P. R., ARAUJO, M. F. C., SILVA-CARDOSO, L., MAYA-MONTEIRO, C. M., & ATELLA, G. C. *Trypanosoma cruzi* modulates lipid metabolism and highjacks phospholipids from the midgut of *Rhodnius prolixus*. **Acta tropica**, v. 233, p. 106552, 2022. DOI: 10.1016/j.actatropica.2022.106552

ANTUNES, D.; MARINS-DOS-SANTOS, A.; RAMOS, M. T.; *et al.* Oral Route Driven Acute *Trypanosoma cruzi* Infection Unravels an IL-6 Dependent Hemostatic Derangement. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. (may), p. 1–10, 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01073.

AYYAPPAN, J. P.; LIZARDO, K.; WANG, S.; YURKOW, E.; NAGAJYOTHI, J. F. Inhibition of SREBP Improves Cardiac Lipidopathy, Improves Endoplasmic Reticulum Stress, and Modulates Chronic Chagas Cardiomyopathy. **Journal of the American Heart Association**, v. 9, n. 3, p. 1–18, 2020. DOI: 10.1161/JAHA.119.014255.

AVCI, P.; GUNTURKUN, O.; ALBERTI, J.; *et al.* Low-Level Laser Therapy for Fat Layer Reduction: A Comprehensive Review. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 45, n. 8, p. 505–514, 2013. DOI: doi:10.1002/lsm.22153.

AZADGOLI, B.; BAKER, R.Y. Laser applications in surgery. **Ann Transl Med**, v. 4, n. 23, p. 452-458, 2016. DOI: 10.21037/atm.2016.11.51.

BABIYCHUK, E. B. *et al.* Intracellular Ca²⁺ operates a switch between repair and lysis of streptolysin O-perforated cells. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, n. 8, p. 1126–1134, 2009. DOI: 10.1038/cdd.2009.30.

BALAH, O.F.A.; RAFIE, M.; OSAMA, A-B. Immunomodulatory effects os photobiomodulation: a comprehensive review. **Laser in Medical Science**, v. 47, n. 187, p. 1-12, 2025. DOI: 10.1007/s10103-025-04417-8.

BARRIAS, EMILE; REIGNAULT, LISSA C.; DE SOUZA, WANDERLEY. How does the main infective stage of *T. cruzi* enter and avoid degradation in host cells? *In*: DE SOUZA, WANDERLEY (ed.). *Biology of Trypanosoma cruzi*. London: IntechOpen. cap. 9, p. 1-21. DOI: 10.5772/intechopen.80373.

BARTZ, R.; LI, W.-H.; *et al.* Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic . **Journal of Lipid Research**, v. 48, n. 4, p. 837–847, 2007. DOI: 10.1194/jlr.M600413-JLR200.

BARTZ, R.; ZEHMER, J. K.; *et al.* Dynamic activity of lipid droplets: Protein phosphorylation and GTP-mediated protein translocation. **Journal of Proteome Research**, v. 6, n. 8, p. 3256–3265, 2007. DOI: 10.1021/pr070158j.

BAYER-SANTOS, E. *et al.* Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* secretome: Characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 2, p. 883–897, 2013. DOI:

BAYER-SANTOS, E; LIMA, F. M; RUIZ ,J. C; ALMEIDA, I. C; SILVEIRA, J. F. Characterization of the small RNA content of Trypanosoma cruzi extracellular vesicles. *Mol Biochem Parasitol*, v. 192, n. 2, p. 71–74, 2014. DOI: 10.1021/pr300947g.

BELLER, G. A.; CONROY, J.; SMITH, T. W. Ischemia induced alterations in myocardial (Na++K+) ATPase and cardiac glycoside binding. **Journal of Clinical Investigation**, v. 57, n. 2, p. 341–350, 1976. DOI: 10.1172/JCI108285.

BERNARDINO DE LA SERRA, J.; SCHÜTZ, G.J.; EGGELING, C.; CEBECAUER, M. There is no simple Model of the Plasma Membrane organization. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 4, n.105, p. 1-17, 2016. DOI: 10.3389/fcell.2016.00106.

BI, G. Q.; ALDERTON, J. M.; STEINHARDT, R. A. Calcium-regulated exocytosis is required for cell membrane resealing. **Journal of Cell Biology**, v. 131, n. 6 II, p. 1747–1758, 1995. DOI: 10.1083/jcb.131.6.1747.

BLANCHETTE-MACKIE, E. J. *et al.* Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes. **Journal of LIPID RESEARCH**, V. 36, N. 6, P. 1211–1226, 1995. PMID: 7665999.

BLAU, H.M., CHIU, C.P., AND Webster, C. (1983). Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. **Cell**, v. 32, 1171-1180. DOI: 10.1016/0092-8674(83)90300-8.

BOSCARDIN, S. B. *et al.* Chagas' disease: An update on immune mechanisms and therapeutic strategies. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, n. 6 B, p. 1373–1384, 2010. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2010.01007.x.

BOZZA, P. T. *et al.* Pathways for eosinophil lipid body induction: Differing signal transduction in cells from normal and hypereosinophilic subjects. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 64, n. 4, p. 563–569, 1998. DOI: 10.1002/jlb.64.4.563.

- BOZZA, P. T.; MELO, R. C. N.; BANDEIRA-MELO, C. Leukocyte lipid bodies regulation and function: Contribution to allergy and host defense. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 113, n. 1, p. 30–49, 2007. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2006.06.006.
- BRASAEMLE, D. L. *et al.* Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 45, p. 46835–46842, 2004. DOI: 10.1074/jbc.M409340200.
- BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T. Immunological Control of *Trypanosoma cruzi* Infection and Pathogenesis of Chagas' Disease. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 114, n. 2, p. 103–110, 1997. DOI: 10.1159/000237653.
- BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N. W. The Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* Invasion of Mammalian Cells. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 175–200, 1995. DOI: 10.1146/annurev.mi.49.100195.001135.
- BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N.W. Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, n. 4, p. 461–465, 1998. DOI: 10.1016/S1369-5274(98)80066-0.
- BUSCAGLIA, C. A. *et al.* *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. **Nature reviews. Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 229–236, 2006. DOI: 10.1038/nrmicro1351.
- CABRINE-SANTOS, M. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Characterization of reinfection and search for tissue tropism in hamsters (*Mesocricetus auratus*). **Experimental Parasitology**, v. 99, n. 3, p. 160–167, 2001. DOI: 10.1006/expr.2001.4661.
- CALER, E. V. *et al.* Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **EMBO Journal**, v. 17, n. 17, p. 4975–4986, 1998. DOI: 10.1093/emboj/17.17.4975.
- CARDILLO, F., PINHO, R. T., ANTAS, P. R. Z., & MENGEL, J. Immunity and immune modulation in *Trypanosoma cruzi* infection. **Pathogens and Disease**, v. 73, n. 9, p. 1–8, 2015. DOI: 10.1093/femspd/ftv082.
- CARDOSO, M. S.; REIS-CUNHA, J. L.; BARTHOLOMEU, D. C. Evasion of the immune response by *Trypanosoma cruzi* during acute infection. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. (jan), p. 1–15, 2016. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00659.
- CASTRO-GOMES, T. K. A. B. A. N. ESCRT: Nipping the wound in the bud? **Trends Biochem Sci**, v. 39, n. 7, p. 307–309, 2014. DOI: doi:10.1016/j.tibs.2014.06.001.
- CASTRO-GOMES, T. *et al.* Plasma membrane repair is regulated extracellularly by proteases released from lysosomes. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–26, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0152583.
- CAVALCANTE-COSTA, V. S.; COSTA-REGINALDO, M.; QUEIROZ-OLIVEIRA, T.; *et al.* *Leishmania amazonensis* hijacks host cell lysosomes involved in plasma

membrane repair to induce invasion in fibroblasts. **Journal of Cell Science**, v. 132, n. 6, 2019. DOI: 10.1242/jcs.226183.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Life cycle of American trypanosomiasis (Chagas disease) [infográfico: ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*]. Disponível em: https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/modules/Chagas_LifeCycle_lg.jpg. Acesso em: 10 out. 2025.

CHABANON, M.; STACHOWIAK, J. C.; RANGAMANI, P. Systems biology of cellular membranes: a convergence with biophysics. **Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med**, v. 9, n. 5, p. 1–30, 2018. DOI: 10.1002/wsbm.1386.

CHAKI, C.; DE TABOADA, L.; TSE, K. M. Comparative Analysis of Pulsed and Continuous Wave Modes in High-Intensity Laser Light Therapy: Implications for Deep Tissue Treatment. **Journal of Biophotonics**, v. 18, n. 7, p. 1–9, 2025. DOI: 10.1002/jbio.202400164.

CHAL, J.; POURQUIÉ, O. Making muscle: skeletal myogenesis *in vitro* and *in vitro*. **The Company of Biologists**, v. 144, p. 2104-2122, 2017. DOI: 10.1242/dev.151035.

CHAN, M. M.; ADAPALA, N.; CHEN, C. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ -mediated polarization of macrophages in leishmania infection. **PPAR Research**, v. 2012, p. 1–11, 2012. DOI: 10.1155/2012/796235.

CHARRON, A. J.; SIBLEY, L. D. Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. **Journal of cell science**, v. 115, p. 3049–3059, 2002. DOI: 10.1074/jbc.m100560200.

CHAUHAN, P.; NAIR, A.; PATIDAR, A.; *et al.* A primer on cytokines. **Cytokine**, v. 145, n. (jan), p. 155458, 2021. DOI: 10.1016/j.cyto.2021.155458.

CHEN, R. *et al.* Mechanical-stretch of C2C12 myoblasts inhibits expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and of autoantigens associated with inflammatory myopathies. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1–9, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0079930.

CHEN, H.; LI, N.; ZHU, H.; MA, C.; YE, Y.; SHI, X.; LUO, G.; DONG, X.; TAN, T.; WEI, X.; YIN, H. Photobiomodulation modulates mitochondrial energy metabolism and ameliorates neurological damage in an APP/ PS1 mouse model of Alzheimer's disease. **Alzheimer's Research & Therapy**, v. 17, n. 72, p. 1-25, 2025. DOI: 10.1186/s13195-025-01714-w.

CHENG, J. *et al.* Quantitative electron microscopy shows uniform incorporation of triglycerides into existing lipid droplets. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 132, n. 3, p. 281–291, 2009. DOI: 10.1007/s00418-009-0615-z.

CHENG, J. P. X.; NICHOLS, B. J. Cavéolae: One Function or Many? **Trends in Cell Biology**, v. 26, n. 3, p. 177–189, 2016. DOI: 10.1016/j.tcb.2015.10.010.

CHUNG, H.; DAI, T.; SHARMA, S. K.; HUANG, Y.; CARROL, J. D.; HAMBLIN, M.R. The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy. **Ann Biomed Eng**, v. 40, n. 2, p.516-533, 2011. DOI: 10.1007/s10439-011-0454-7.

COOPER, S. T.; MCNEIL, P. L. Membrane Repair: Mechanisms and Pathophysiology. **Physiological Reviews**, v. 95, n. 4, p. 1205–1240, 2015. DOI: 10.1152/physrev.00037.2014.

COPPENS, I.; VIELEMEYER, O. Insights into unique physiological features of neutral lipids in Apicomplexa: From storage to potential mediation in parasite metabolic activities. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 6, p. 597–615, 2005. DOI: 10.1016/j.ijpara.2005.01.009.

CORROTTE, M. *et al.* Cavéolae internalization repairs wounded cells and muscle fibers. **eLife**, v. 2013, n. 2, p. 1–30, 2013. DOI: 10.7554/eLife.00926.

CORROTTE, M.; CASTRO-GOMES, T. Lysosomes and plasma membrane repair. **Current Topics in Membranes**, v. 89, p. 1-16, 2019. DOI: 10.1016/bs.ctm.2019.08.001.

COSTA, L. N. C.; ABICO, S. T.; STEIN, T.; BERTOLINI, G. R. F. EFEITOS DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NO TRATAMENTO DE LESÃO MUSCULAR: REVISÃO SISTEMÁTICA. **Varia Scientia - Ciências da Saúde**, [S. l.], v. 4, n. 2, p. 211–216, 2018. DOI: 10.48075/vscs.v4i2.20925.

COUTO, F.; QUEIROZ-OLIVEIRA, N.; HORTA, M. F.; CASTRO-GOMES, T.; ANDRADE, L.O. Measuring Intracellular Vesicle Density and Dispersion Using Fluorescence Microscopy and ImageJ/FIJI. **Bio-protocol**, v. 10, n. 15, p. 1–11 , 2020. DOI: 10.21769/BioProtoc.3703.

COTLER, H.B.; CHOW, R.T.; HAMBLIN, M.R.; CARROL, J. The use of low level laser therapy (LLLT) for Musculoskeletal pain. **MOJ Orthop Rheumatol**, v. 2, n.5, p. 1-16, 2015. DOI: 10.15406/mojor.2015.02.00068.

CROISSANT, C.; GOUNOU, C.; BOUVET, F.; TAN, S.; BOUTER, A. Trafficking of Annexins during Membrane Repair in Human Skeletal Muscle Cells. **Membranes**, v. 12, n. 2, p. 1–15, 2022. DOI: 10.3390/membranes12020153.

CUCUNUBÁ, Z. M.; GUTIÉRREZ-ROMERO, S. A.; RAMÍREZ, J. D.; *et al.* The epidemiology of Chagas disease in the Americas. **The Lancet Regional Health - Americas**, v. 37, p. 100881, 2024. DOI: 10.1016/j.lana.2024.100881.

CZABANY, T. *et al.* Structural and biochemical properties of lipid particles from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 25, p. 17065–17074, 2008. DOI: 10.1074/jbc.M800401200.

D'AVILA, H. *et al.* *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin Induces TLR2-Mediated Formation of Lipid Bodies: Intracellular Domains for Eicosanoid Synthesis *In vitro*. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 5, p. 3087–3097, 2006. DOI:

10.4049/jimmunol.176.5.3087.

D'AVILA, H. *et al.* Host cell lipid bodies triggered by *Trypanosoma cruzi* infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with prostaglandin E2 generation and increased parasite growth. **Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 6, p. 951–961, 2011. DOI: 10.1093/infdis/jir432.

D'AVILA, H.; TOLEDO, D. A. M.; MELO, R. C. N. Lipid bodies: Inflammatory organelles implicated in host-*Trypanosoma cruzi* interplay during innate immune responses. **Mediators of Inflammation**, v. 2012, n. Article ID 478601, p. 11, 2012. DOI: 10.1155/2012/478601.

DACKS, J. B.; PEDEN, A. A.; FIELD, M. C. Evolution of specificity in the eukaryotic endomembrane system. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 41, n. 2, p. 330–340, 2009. DOI: 10.1016/j.biocel.2008.08.041.

DAHLMANS, D. *et al.* MicroRNA-382 silencing induces a mitonuclear protein imbalance and activates the mitochondrial unfolded protein response in muscle cells. **Journal of Cellular Physiology**, n. August, p. 1–10, 2018. DOI: 10.1002/jcp.27401.

DEFOUR, A. *et al.* Dysferlin regulates cell membrane repair by facilitating injury-triggered acid sphingomyelinase secretion. **Cell Death and Disease**, v. 5, n. 6, p. e1306-11, 2014. DOI: 10.1038/cddis.2014.272.

DEMONBREUN, A. R. *et al.* An actin-dependent annexin complex mediates plasma membrane repair in muscle. **Journal of Cell Biology**, v. 213, n. 6, p. 705–718, 2016. DOI: 10.1083/jcb.201512022.

DETRAIT, E. *et al.* Axolemmal repair requires proteins that mediate synaptic vesicle fusion. **Journal of Neurobiology**, v. 44, n. 4, p. 382–391, 2000. DOI: 10.1002/1097-4695(20000915)44:4<382::AID-NEU2>3.0.CO;2-Q.

DIAS, J. C. P. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 4, p. 370–375, 2006. DOI: 10.1590/S0037-86822006000400010.

DIAS, C.; NYLANDSTED, J. Plasma membrane integrity in health and disease: significance and therapeutic potential. **Cell Discovery**, v. 7, n. 4, p. 1–18, 2021. DOI: 10.1038/s41421-020-00233-2.

DIGEL, M.; EHEHALT, R.; FÜLLEKRUG, J. Lipid droplets lighting up: Insights from live microscopy. **FEBS Letters**, v. 584, n. 11, p. 2168–2175, 2010. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.03.035.

DMC. Photon Laser III: catálogo de produtos. São Carlos: DMC, [s.d.]. Disponível em: <https://www.dmcgroup.com.br>. Acesso em: 26 set. 2021.

EBSTRUP, M.L.; DIAS, C.; HEITMANN, A.S.B.; SØNDER, S.L.; NYLANDSTED, J.

Actin Cytoskeletal Dynamics in Single-Cell Wound Repair. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 22, n. 19, p. 1-16, 2021. DOI: 10.3390/ijms221910886.

EL-MAGHRABY, E. M. F.; EL-ROUBY, D. H.; SAAFAN, A. M. Assessment of the effect of low-energy diode laser irradiation on gamma irradiated rats' mandibles. **Archives of Oral Biology**, v. 58, n. 7, p. 796–805, 2013. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2012.10.003.

ESPENSHADE, P. J., & HUGHES, A. L. Regulation of Sterol Synthesis in Eukaryotes. **Annual Review of Genetics**, v. 41 n. 1, p. 401–427, 2007. DOI: 10.1146/annurev.genet.41.110306.130315.

FARIVAR, S.; MALEKSHAHABI, T.; SHIARI, R. Biological effects of low level laser therapy. **Journal of Lasers in Medical Sciences**, v. 5, n. 2, p. 58–62, 2014. DOI: 10.22037/2010.v5i2.5540.

FARKAS, J. P.; HOOPMAN, J. E.; KENKEL, J. M. Five parameters you must understand to master control of your laser/light-based devices. **Aesthetic Surgery Journal**, v. 33, n. 7, p. 1059–1064, 2013. DOI: 10.1177/1090820X13501174.

FERNANDES, M. C. *et al.* *Trypanosoma cruzi* subverts the sphingomyelinase-mediated plasma membrane repair pathway for cell invasion. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 5, p. 909–921, 2011. DOI: 10.1177/1090820X13501174.

FERNANDES, M. C *et al.* Host Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi*: A Unique Strategy That Promotes Persistence. **FEMS Microbiology Rev**, v. 36, n. 3, p. 734–747, 2012. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2012.00333.x.Host.

FERREIRA, V. *et al.* The Classical Activation Pathway of the Human Complement System Is Specifically Inhibited by Calreticulin from *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 5, p. 3042–3050, 2004. DOI: 10.4049/jimmunol.172.5.3042.

FERRI, G.; EDREIRA, M. M. All Roads Lead to Cytosol: *Trypanosoma cruzi* Multi-Strategic Approach to Invasion. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, n. March, p. 1–17, 2021. DOI: 10.3389/fcimb.2021.634793.

FLASPOHLER, J.A, RICKOLL, W.L, BEVERLEY, S.M and PARSONS M. Functional identification of a Leishmania gene related to the peroxin 2 gene reveals common ancestry of glycosomes and peroxisomes. **Mol Cell Biol**, v. 17(3), p.1093-101, 1997. DOI: 10.1128/mcb.17.3.1093.

FRIDOLFSSON, H. N. *et al.* Regulation of intracellular signaling and function by caveolin. **FASEB Journal**, v. 28, n. 9, p. 3823–3831, 2014. DOI: 10.1096/fj.14-252320.

FUJIMOTO, T. *et al.* Caveolin-2 is targeted to lipid droplets, a new “membrane domain” in the cell. **Journal of Cell Biology**, v. 152, n. 5, p. 1079–1085, 2001. DOI: 10.1083/jcb.152.5.1079.

FUJIMOTO, Y. *et al.* Identification of major proteins in the lipid droplet-enriched fraction isolated from the human hepatocyte cell line HuH7. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1644, n. 1, p. 47–59, 2004. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2003.10.018.

FUKUDA, TY.; TANJI, MM.; SILVA, SR.; SATO, MN.; PLAPLER, H. Infrared low-level diode laser on inflammatory process modulation in mice: pro- and anti-inflammatory cytokines. **Laser Med Sci**, v. 28, p. 1305-1313, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10103-012-1231-z>.

GAO, M.; HUANG, X.; SONG, B. L.; YANG, H. The biogenesis of lipid droplets: Lipids take center stage. **Progress in Lipid Research**, v. 75, p. 100989, 2019. DOI: 10.1016/j.plipres.2019.100989.

GAVISH, L., PEREZ, L.S., REISSMAN, P., GERTZ, S.D. Irradiation with 780 nm diode laser attenuates inflammatory cytokines but upregulates nitric oxide in lipopolysaccharide-stimulated macrophages: implications for the prevention of aneurysm progression. **Lasers Surg Med**, v. 40, n. 8, p. 371-378, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1002/lsm.20635>.

GODIN, L. M. *et al.* Spatiotemporal dynamics of actin remodeling and endomembrane trafficking in alveolar epithelial type I cell wound healing. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 300, n. 4, p. L615-23, 2011. DOI: 10.1152/ajplung.00265.2010.

GOMES, J. A. S. *et al.* Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 3, p. 1185–1193, 2003. DOI: 10.1128/IAI.71.3.1185-1193.2003.

GOMES, A. F. *et al.* *Toxoplasma gondii*-skeletal muscle cells interaction increases lipid droplet biogenesis and positively modulates the production of IL-12, IFN- γ and PGE2. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2014. DOI: 10.1186/1756-3305-7-47.

GONÇALVES, C.S. *et al.* Revisiting the *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis: morphological and ultrastructural analyses during cell differentiation. **Parasites & Vector**, v. 11(83), p.3-14, 2018. DOI: 10.1186/s13071-018-2664-4.

GÖNI, F.M. The basic structure and dynamics of cell membranes: An update of the Singer–Nicolson model. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1838, n.6, p. 1467–1476, 2014. DOI: 10.1016/j.bbamem.2014.01.006.

GOZEN, I.; DOMMERSNES, P. Pore dynamics in lipid membranes. **European Physical Journal: Special Topics**, v. 223, n. 9, p. 1813–1829, 2014. DOI: 10.1140/epjst/e2014-02228-5.

GÖKÇE, B.; AYTEKIN, E.; PEKIN DOĞAN, Y.; *et al.* Effectiveness of Low-Level Laser Therapy in Chronic Plantar Fasciitis Conservative Treatment. **Istanbul Medical Journal**, v. 24, n. 2, p. 106–111, 2023. DOI: 10.4274/imj.galenos.2023.23356.

GRASSMÉ, H.; GULBINS, E.; BRENNER, B.; *et al.* Acidic sphingomyelinase mediates entry of *N. gonorrhoeae* into Nonphagocytic cells. **Cell**, v. 91, n. 5, p. 605–615, 1997. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80448-1.

GRIJALVA, A.; GALLO VAULET, L.; AGÜERO, R. N.; *et al.* Interleukin 10 Polymorphisms as Risk Factors for Progression to Chagas Disease Cardiomyopathy: A Case-Control Study and Meta-Analysis. **Frontiers in Immunology**, v. 13, n. July, p. 1–9, 2022. DOI: 10.3389/fimmu.2022.946350.

GUERRINI, V.; PRIDEAUX, B.; BLANC, L.; *et al.* Storage lipid studies in tuberculosis reveal that foam cell biogenesis is disease-specific. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 8, p. 1–27, 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2022.946350.

GUO, Y. *et al.* Lipid droplets at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 122, n. 6, p. 749–752, 2009. DOI: 10.1242/jcs.037630.

HAMBLIN, M. R.; DEMIDOVA, T. N. Mechanisms of low level light therapy. **Proc. of SPIE**, v. 6140, September, p. 1–25, 2006. DOI: 10.1117/12.646294.

HAMBLIN, M. R. Photobiomodulation or low-level laser therapy. **Journal of Biophotonics**, v. 9, n. 11–12, p. 1122–1124, 2016. DOI: 10.1002/jbio.201670113.

HANNA, H.; DENZI, A.; LIBERTI, M.; ANDRÉ, F. M.; MIR, L. M. Electroporation of Inner and Outer Cell Membranes with Microsecond Pulsed Electric Fields: Quantitative Study with Calcium Ions. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-12960-w.

HASHMI, J. T. ., YING-YING HUANG., SULBHA K., SHARMA, D., BALACHANDRAN K., LUIS, T., JAMES, D.C., and M. R. H. Effect of Pulsing in Low-Level Light Therapy. **Lasers Surg Med**, v. 42, n. 6, p. 1–25, 2010. DOI: doi:10.1002/lsm.20950.

HIRAI, T. *et al.* Baicalein stimulates fibroblast growth factor 21 expression by up-regulating retinoic acid receptor-related orphan receptor α in C2C12 myotubes. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 109, n. October 2018, p. 503–510, 2019. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.10.154.

HORN, A.; JAISWAL, J. K. Cellular mechanisms and signals that coordinate plasma membrane repair. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 75, n. 20, p. 3751–3770, 2018. DOI: 10.1007/s00018-018-2888-7.

HORTA, M. F.; ANDRADE, L. O.; MARTINS-DUARTE, É. S.; CASTRO-GOMES, T. Cell invasion by intracellular parasites - the many roads to infection. **Journal of cell science**, v. 133, n. 4, p. 1–15, 2020. DOI: 10.1242/jcs.232488.

HU, W. P. *et al.* Helium-neon laser irradiation stimulates cell proliferation through photostimulatory effects in mitochondria. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 8, p. 2048–2057, 2007. DOI: 10.1038/sj.jid.5700826.

HUANG, YY.; CHEN, A.C.H; CARROL, J.D.; HAMBLIN, M.R. Biphasic dose response in low level light therapy. **Dose Response**, v. 7, n. 4, p. 358-383, 2009. DOI: 10.2203/dose-response.09-027.Hamblin.

HUERTAS, R. M. *et al.* Effect and Clinical Implications of the Low-Energy Diode Laser on Bone Cell Proliferation. **Biological Research for Nursing**, v. 16, n. 2, p. 191–196, 2014. DOI: 10.1177/1099800413482695.

HUSAIN, Z.; ALSTER, T. S. The role of lasers and intense pulsed light technology in dermatology. **Clin Cosmet Investig Dermatol**, v.9, p. 29-40, 2016. DOI: 10.2147/CCID.S69106.

HUYNH, T.; REED, C.; BLACKWELL, Z.; *et al.* Local IL - 10 delivery modulates the immune response and enhances repair of volumetric muscle loss muscle injury. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1983, p. 1–15, 2023. Nature Publishing Group UK. DOI: 10.1038/s41598-023-27981-x.

IACOVACHE, I.; GOOT, F. G. VAN DER; PERNOT, L. Pore formation: An ancient yet complex form of attack. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1778, n. 7–8, p. 1611–1623, 2008. DOI: 10.1016/j.bbamem.2008.01.026.

IDONE, V. *et al.* Repair of injured plasma membrane by rapid Ca²⁺ dependent endocytosis. **Journal of Cell Biology**, v. 180, n. 5, p. 905–914, 2008. DOI: 10.1083/jcb.200708010.

JARC, Eva; PETAN, Toni. Lipid droplets and the management of cellular stress. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 92, n. 3, p. 435–452 , 2019. PMID: 31543707.

JELÍNKOVÁ, H.; ŠULC, J. Laser characteristics. **Woodhead Publishing Limited**, 2013. DOI: 10.1533/9780857097545.1.17.

JENKINS, P.; CARROL, J. D. How to Report Low-Level Laser Therapy (LLLT)/ Photomedicine Dose and Beam Parameters in Clinical and Laboratory Studies. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 29, n. 12, p. 785–787, 2011. DOI: 10.1089/pho.2011.9895.

JIMENEZ, A. J. *et al.* ESCRT machinery is required for plasma membrane repair. **Science**, v. 343, p. 986–994, 2014. DOI: 10.1007/s00231-016-1766-9.

KALINSKY, P. Regulation of Immune Responses by Prostaglandin E₂. **J Immunol**, v. 188(1), p. 1-18, 2013. DOI: 10.4049/jimmunol.1101029.

KARO USSIS, I. K.; KYRIAKIDOU, K.; PSARROS, C.; *et al.* Effects and action mechanism of low level laser therapy (LLLT): applications in periodontology. **Journal of Cell Signaling**, v. 3, n. 2, p. 96–104, 2018. DOI: 10.4172/2161-1122.1000514.

KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.

49, n. 1, p. 1–17, 1999. DOI: 10.1016/S1011-1344(98)00219-X.

KARU, T. I. Mitochondrial Signaling in Mammalian Cells Activated by Red and Near-IR Radiation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 84, p. 1091–1099, 2008. DOI: 10.1111/j.1751-1097.2008.00394.x.

KIM, K. H.; HONG, S. P.; KIM, KYEONG JIN; *et al.* HCV core protein induces hepatic lipid accumulation by activating SREBP1 and PPAR γ . **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 355, n. 4, p. 883–888, 2007. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.02.044.

KIM, H. K. *et al.* Red light of 647 nm enhances osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells. **Lasers in Medical Science**, v. 24, n. 2, p. 214–222, 2009. DOI: 10.1007/s10103-008-0550-6.

KLEINMAN, Y., SIMMER, S., BRAKSMA, Y., MORAG, B., LICHTENSTEIN, D. Low level laser therapy in patients with venous ulcers. **Laser Therapy**, v. 8, n. 3, p. 205–208, 1996. DOI: 10.5978/islsm.8.205.

KRAPOTH, T. C.; HENLE, G. S.; AVDYLI, M.; *et al.* Wanted : Dead or Alive Cells with Propidium Iodide Staining in Liver Tissue. **Int. J. Mol. Sci**, v. 25, n. 24, p. 1–13, 2024. DOI: 10.3390/ijms252413521.

KUERSCHNER, L.; MOESSINGER, C.; THIELE, C. Imaging of lipid biosynthesis: How a neutral lipid enters lipid droplets. **Traffic**, v. 9, n. 3, p. 338–352, 2008. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2007.00689.x.

KUMAR, Y.; COCCHIARO, J.; VALDIVIA, R. H. The Obligate Intracellular Pathogen *Chlamydia trachomatis* Targets Host Lipid Droplets. **Current Biology**, v. 16, n. 16, p. 1646–1651, 2006. DOI: 10.1016/j.cub.2006.06.060.

KUMARI, R MANKAMNA; KHATRI, AMIT.; CHAUDHARY, RITIKA.; CHOUDHARY, V. Concept of lipid droplet biogenesis. **Eur J Cell Biol**, v. 102, n. 4, p. 1–25, 2024. DOI: 10.1016/j.ejcb.2023.151362.Concept.

KUSUMI, A., FUJIWARA, T. K., CHADDA, R., XIE, M., TSUNOYAMA, T. A., KALAY, Z., KASAI, R.S., SUZUKI, K. G. N. Dynamic Organizing Principles of the Plasma Membrane that Regulate Signal Transduction: Commemorating the Fortieth Anniversary of Singer and Nicolson's Fluid-Mosaic Model. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 28, n. 1, p. 215–250, 2012. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-100809-151736.

LEVCHENKO, S. M.; KUZMIN, A. N.; OHULCHANSKY, T. Y.; *et al.* Near-Infrared Irradiation Affects Lipid Metabolism in Neuronal Cells, Inducing Lipid Droplets Formation. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 10, n. 3, p. 1517–1523, 2019. DOI: 10.1021/acscchemneuro.8b00508.

LEY, V. *et al.* The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. **The Journal of experimental medicine**, v. 171, n. 2, p. 401–413, 1990. DOI: 10.1084/jem.171.2.401.

LIBBING, C. L.; MCDEVITT, A. R.; AZCUETA, R. M. P.; AHILA, A.; MULYE, M. Lipid droplets: A significant but understudied contributor of Host–Bacterial interactions. **Cells**, v. 8, n. 4, p. 1–27, 2019. DOI: 10.3390/cells8040354.

LIN, F. *et al.* Lasers, stem cells, and COPD. **Journal of Translational Medicine**, v. 8, p. 1–10, 2010. DOI: 10.1186/1479-5876-8-16.

LIPOVSKY, A.; NITZAN, Y.; LUBART, R. A possible mechanism for visible light-induced wound healing. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 40, n. 7, p. 509–514, 2008. DOI: 10.1002/lsm.20668.

LIU, H. *et al.* Redox-dependent transcriptional regulation. **Circulation Research**, v. 97, n. 10, p. 967–974, 2005. DOI: 10.1161/01.RES.0000188210.72062.10.

LO, H. P. *et al.* The caveolin-Cavin system plays a conserved and critical role in mechanoprotection of skeletal muscle. **Journal of Cell Biology**, v. 210, n. 5, p. 833–849, 2015. DOI: 10.1083/jcb.201501046.

LO, H. P.; HALL, T. E.; PARTON, R. G. Mechanoprotection by skeletal muscle cavéolae. **BioArchitecture**, v. 6, n. 1, p. 22–27, 2016. DOI: 10.1080/19490992.2015.1131891.

LOMBARD, J. Once upon a time the cell membranes:175 years of cell boundary research. **Biology Direct**, v. 9, n. 32, p. 1-35, 2014. DOI: 10.1186/s13062-014-0032-7.

LONIEN, S. C. H.; MALVEZI, A. D.; SUZUKAWA, H. T.; *et al.* Response to *Trypanosoma cruzi* by human blood cells enriched with dendritic cells is controlled by cyclooxygenase-2 pathway. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, n. (oct), p. 1–11, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02020.

LOVO-MARTINS, M. I.; MALVEZI, A. D.; ZANLUQUI, N. G.; *et al.* Extracellular vesicles shed By *Trypanosoma cruzi* potentiate infection and Elicit Lipid body formation and PGE2 production in murine macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. Apr, p. 1–16, 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00896.

LUISONI, S.; SUOMALAINEN, M.; BOUCKE, K.; *et al.* Co-option of membrane wounding enables virus penetration into cells. **Cell Host and Microbe**, v. 18, n. 1, p. 75–85, 2015. DOI: 10.1016/j.chom.2015.06.006.

LUO, JIALIE.; ZHU, Y.; ZHU, M. X.; HU, HONGZHEN. Cell-based calcium assay for medium to high throughput screening of TRP channel functions using FlexStation 3. **Journal of Visualized Experiments** v. 54, p. 1–7 , 2011. DOI: 10.3791/3149.

MACALUSO, G.; GRIPPI, F.; DI BELLA, S.; *et al.* A Review on the Immunological Response against *Trypanosoma cruzi*. **Pathogens**, v. 12, n. 2, p. 1–15, 2023. DOI:

MAHAJAN, S., *et al.* Lipid Droplets: A Dynamic Organelle in Healthy and Disease. **Indo American Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 1, p. 173–184,

2015. DOI: 10.3390/pathogens12020282.

MAIA, M.L.M; BONJARDIM, L.R., QUINTANS J. S. S., RIBEIRO, M.A.G., MAIA L. G. M., ; RODRIGUES, P. C. Effect of low-level laser therapy on pain levels in patients with temporomandibular disorders: a systematic review. **J. Appl. Oral Sci.**, v. 20, n. 6, p. 1-10, 2012. DOI: 10.1590/S1678-77572012000600002.

MAIMAM, T. H. Stimulated Optical Radiation in Rubi. **Nature**, v. 187, n. 4736, p. 493-494, 1960. DOI: 10.1038/187493a0.

MARTÍN-ESCOLANO, J.; MARÍN, C.; ROSALES, M. J.; *et al.* An Updated View of the *Trypanosoma cruzi* Life Cycle: Intervention Points for an Effective Treatment. **ACS Infectious Diseases**, v. 8, n. 6, p. 1107–1115, 2022. DOI: 10.1021/acsinfecdis.2c00123.

MARTINS, A. V, GOMES, A. P, FIETTO, J. L *et al.* Biology of *Trypanosoma cruzi*: An update. **Infectio.**, v. 16, n. 1, p. 45–48, 2012. DOI: 10.1103/PhysRevLett.78.2124.

MATTOS, K. A. *et al.* Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 87, n. 3, p. 371–384, 2010. DOI: 10.1189/jlb.0609433.

MATTOS, K. A. *et al.* Modulation of lipid droplets by *Mycobacterium leprae* in Schwann cells: A putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes. **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 259–273, 2011. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2010.01533.x.

MATTOS, K. A. *et al.* Deciphering the contribution of lipid droplets in leprosy: Multifunctional organelles with roles in *Mycobacterium leprae* pathogenesis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. SUPPL.1, p. 156–166, 2012. DOI: 10.1590/S0074-02762012000900023.

MCCULLOUGH, J.; COLF, L. A.; SUNDQUIST, W. I. Membrane Fission Reactions of the Mammalian ESCRT Pathway. **Annual Review of Biochemistry**, v. 82, n. 1, p. 663–692, 2013. DOI: 10.1146/annurev-biochem-072909-101058.

MCNEIL, P. L. Cellular and molecular adaptations to injurious mechanical stress. **Trends in Cell Biology**, v. 3, n. 9, p. 302–307, 1993. DOI: 10.1016/0962-8924(93)90012-P.

MCNEIL, P. L. *et al.* Patching plasma membrane disruptions with cytoplasmic membrane. **Journal of cell science**, v. 113 (Pt 1), p. 1891–1902, 2000. DOI: 10.1242/jcs.113.11.1891.

MCNEIL, P. L.; STEINHARDT, R. A. Loss, Restoration, and Maintenance of Plasma Membrane Integrity. v. 137, n. 1, p. 21–24, 2000. DOI: 10.1083/jcb.137.1.1.

MCNEIL, P. L.; TERASAKI, M. Coping with the inevitable: How cells repair a torn

surface membrane. **Nature Cell Biology**, v. 3, n. 5, p. 124–129, 2001. DOI:

MCNEIL, P. L.; MIYAKE, K.; VOGEL, S. S. The endomembrane requirement for cell surface repair. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 8, p. 4592–4597, 2003. DOI: 10.1073/pnas.0736739100.

MCNEIL, P. L.; KIRCHHAUSEN, T. An emergency response team for membrane repair. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 6, p. 499–505, 2005. DOI: 10.1038/nrm1665.

MEER-JANSSEN, Y. P. M. VAN DER *et al.* Lipids in host-pathogen interactions: Pathogens exploit the complexity of the host cell lipidome. **Progress in Lipid Research**, v. 49, n. 1, p. 1–26, 2010. DOI: 10.1016/j.plipres.2009.07.003.

MELO, R.C.N, FABRINO, D.L, DIAS, F.F and PARREIRA, G.G. Lipid bodies: structural markers of inflammatory macrophages in innate immunity. **Inflammation Research**, v. 55(8), p.342-8, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00011-006-5205-0>.

MELO, R.C.N, D'AVILA, H, BOZZA, P.T and WELLER, P.F. Imaging lipid bodies within leukocytes with different light microscopy techniques. **Methods Mol Biol** v. 689, p.149-61, 2011. DOI: 10.1007/978-1-60761-950-5_9.

MESQUITA-FERRARI, R. A.; MARTINS, M. D.; SILVA, J. A.; *et al.* Effects of low-level laser therapy on expression of TNF- α and TGF- β in skeletal muscle during the repair process. **Lasers in Medical Science**, v. 26, n. 3, p. 335–340, 2011. DOI: 10.1007/s10103-010-0850-5.

MESTER, E.S.B.; TOTA, J.G. Influence of laser beams on the growth of hair in mice. **Kiserl. Orvostud**, v. 19, p. 628-631, 1967.

MESTER, E.; LUDANY, G.; SELYEI, M.; SZENDE, B.; TOTAL, G.J. The stimulating effect of low power laser rays on biological systems. **Laser Rev**, v. 1, n. 3, 1968.

MIYAKE, K.; MCNEIL, P. L. Vesicle accumulation and exocytosis at sites of plasma membrane disruption. **Journal of Cell Biology**, v. 131, n. 6 II, p. 1737–1745, 1995. DOI: 10.1083/jcb.131.6.1737.

MUKHERJEE, M.; BASU BALL, W.; DAS, P. K. *Leishmania donovani* activates SREBP2 to modulate macrophage membrane cholesterol and mitochondrial oxidants for establishment of infection. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 55, n. (sept), p. 196–208, 2014. DOI: 10.1016/j.biocel.2014.08.019.

MÜLLER, A.; MARSCHALL, S.; JENSEN, O. B.; FRICKE, J.; WENZEL, H.; SUMPF, B.; ANDERSEN, P.E.; Diode laser based light sources for biomedical applications. **Laser Photonics Rev.**, v. 7, n. 5, p. 605-627, 2013. DOI: 10.1002/lpor.201200051.

MURPHY, D. J. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. **Progress in Lipid Research**, v. 40, n. 5, p. 325–438, 2001. DOI: 10.1016/S0163-7827(01)00013-3.

NATALE, MARÍA A.; CÉSAR, GONZALO A.; ALVAREZ, M. G. *et al.* *Trypanosoma cruzi*-specific IFN- γ -producing cells in chronic Chagas disease associate with a functional IL-7 / IL-7R axis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 12, n. 12, p. e0006998, 2018. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006998.

NDE, P. N.; LIMA, M. F.; JOHNSON, C. A.; PRATAP, S.; VILLALTA, F. Regulation and use of the extracellular matrix by *Trypanosoma cruzi* during early infection. **Front Immunol.**, v.3, n. 337, 2012. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00337.

NICOLAOU, G.; GOODALL, A. H.; ERRIDGE, C. Diverse bacteria promote macrophage foam cell formation via Toll-like receptor-dependent lipid body biosynthesis. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 19, n. 2, p. 137–148, 2012. DOI: 10.5551/jat.10249.

NÓBREGA, A. A. *et al.* Oral transmission of Chagas Disease by consumption of Açai palm fruit, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 653–655, 2009. DOI: 10.3201/eid1504.081450.

NOURI, K., ELSAIE, M.L., VEJJABHINANTA, V. STEVENS, M., PATEL, S.S., CAPERTON, C., ELGART, G. Comparison of the effects of short- and long-pulse durations when using a 585-nm pulsed dye laser in the treatment of new surgical scars. **Lasers Med Sci**, v. 25, n.1, p. 121-26, 2010. DOI: 10.1007/s10103-009-0710-3.

ODORIZZI, G.; BABST, M.; EMR, S. D. Fab1p PtdIns(3)P 5-kinase function essential for protein sorting in the multivesicular body. **Cell**, v. 95, n. 6, p. 847–858, 1998. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81707-9.

OLIVEIRA, A. C. S.; REZENDE, L.; GORSHKOV, V.; *et al.* Biological and Molecular Effects of *Trypanosoma cruzi* Residence in a LAMP-Deficient Intracellular Environment. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, n. (Jan), p. 1–18, 2022. DOI: 10.3389/fcimb.2021.788482.

OLIVEIRA-SOUZA, A. I. S., MOHAMAD, N., DE CASTRO CARLETTI, E. M., MÜGGENBORG, F., DENNETT, L., DE OLIVEIRA, D. A., & ARMIJO-OLIVO, S. What are the best parameters of low-level laser therapy to reduce pain intensity and improve mandibular function in orofacial pain? A systematic review and meta-analysis. **Disability and Rehabilitation**, v. 45, n. 20, p. 3219–3237, 2022. DOI: 10.1080/09638288.2022.2127933.

OLOFSSON, SO.; BOSTRÖM, P.; ANDERSSON, L.; RUTBERG, M.; PERMAN, J.; BORÉN J. Lipid droplets as dynamic organelles connecting storage and efflux of lipids. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v, 1791, n. 6, 2009. DOI: 10.1016/j.bbalip.2008.08.001.

OLZMANN, JA.; CARVALHO, P. Dynamics and functions of lipid droplets. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, p. 137-155, 2019. DOI: 10.1038/s41580-018-0085-z.

OVERTVELT, L. VAN *et al.* *Trypanosoma cruzi* infects human dendritic cells and prevents their maturation: Inhibition of cytokines, HLA-DR, and costimulatory molecules. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 8, p. 4033–4040, 1999. DOI: 10.1128/iai.67.8.4033-4040.1999.

OZEKI, S. Rab18 localizes to lipid droplets and induces their close apposition to the endoplasmic reticulum-derived membrane. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. 12, p. 2601–2611, 2005. DOI: 10.1242/jcs.02401.

PALADE, G.E. Fine structure of blood capillaries. **J Appl Phys** v. 24(1), p.1424, 1953.

PARTON, R.G., MOLERO, J.C., FLOETENMEYER, M., GREEN, K.M., and JAMES, D.E. Characterization of a distinct plasma membrane macrodomain in differentiated adipocytes. **J Biol Chem**, v. 277, p. 46769-46778, 2002. DOI: 10.1074/jbc.M205683200.

PARTON, R. G.; DEL POZO, M. A. Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 2, p. 98-112, 2013. DOI: 10.1038/nrm3512.

PARTON, R. G. Caveolae: Structure, Function, and Relationship to Disease. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 34, p. 111–136, 2018. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-100617-062737.

PATIL, U. A.; DHAMI, L. D. Overview of lasers. **Indian J Plast Surg**, v.41, Suppl, p. 101-113, 2008. PMID: 20174534.

PENAS, F. N.; CARTA, D.; DMYTRENKO, G.; *et al.* Treatment with a new peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, pyridinecarboxylic acid derivative, increases angiogenesis and reduces inflammatory mediators in the heart of *Trypanosoma cruzi*-infected mice. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. Dec, p. 1–14, 2017. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01738

PEREIRA-DUTRA, F. S.; TEIXEIRA, L.; DE SOUZA COSTA, M. F.; BOZZA, P. T. Fat, fight, and beyond: The multiple roles of lipid droplets in infections and inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 106, n. 3, p. 563–580, 2019. DOI: 10.1002/JLB.4MR0119-035R.

PERVEEN, A.; MOLARDI, C.; FORNAINI, C. Applications of Laser Welding in Dentistry: A State-of-the- Art Review. *Micromachines*, v. 9, n. 5, p. 1-23, 2018. DOI: 10.3390/mi9050209.

PIACENZA, L. *et al.* *Trypanosoma cruzi* Antioxidant Enzymes As Virulence Factors in Chagas Disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 19, n. 7, p. 723–734, 2013. DOI: 10.1089/ars.2012.4618.

PINHEIRO, R. O. *et al.* Induction of autophagy correlates with increased parasite load of *Leishmania amazonensis* in BALB/c but not C57BL/6 macrophages. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 2, p. 181–190, 2009. DOI: 10.1016/j.micinf.2008.11.006.

PLOEGH, H. L. A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum. **Nature**, v. 448, n. 7152, p. 435–438, 2007. DOI: 10.1038/nature06004.

PODBREGAR, M. *et al.* Cytokine response of cultured skeletal muscle cells stimulated with proinflammatory factors depends on differentiation stage. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 8, 2013. DOI: 10.1155/2013/617170.

POSTEN, W. *et al.* Low-level laser therapy for wound healing: Mechanism and efficacy. **Dermatologic Surgery**, v. 31, n. 3, p. 334–340, 2005. DOI: 10.1097/00042728-200503000-00016.

RAJ N, GERKE V. Time matters: the dynamics of plasma membrane repair. **Trends Cell Biol**, Jun 16, [Epub ahead of print], 2025. DOI: 10.1016/j.tcb.2025.05.005.

RAJARAM, M.V.S., BIN, N., DODD, C.E., SCHLESINGER, L.S. Macrophage immunoregulatory pathways in tuberculosis. **Semin Immunol**, v. 26, n. 6, p. 471–485, 2014. DOI: 10.1016/j.smim.2014.09.010.

RASSI JR, A., MARIN-NETO, J. . Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 1388, p. 1388–1402, 2010. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31612-4.

RATHOD, A.; JAISWAL, P.; BAJAJ, P.; KALE, B.; MASURKAR, D. Implementation of Low-Level Laser Therapy in Dentistry: A Review. **Cureus**, v. 14, n. 9, p. 1–7, 2022. DOI: 10.7759/cureus.28799.

REDDY, A.; CALER, E. V.; ANDREWS, N. W. Plasma membrane repair is mediated by Ca²⁺-regulated exocytosis of lysosomes. **Cell**, v. 106, n. 2, p. 157–169, 2001. DOI: 10.1016/S0092-8674(01)00421-4.

RENNO, A. C. *et al.* Effect of 830 nm laser phototherapy on osteoblasts grown *in vitro* on Biosilicate scaffolds. **Photomed.Laser Surg.**, v. 28, n. 1557–8550, p. 131–133, 2010. DOI: 10.1089/pho.2009.2487.

RIBEIRO, J. M.; SILVA, P. A.; COSTA-SILVA, H. M.; SANTI, A. M. M.; MURTA, S. M. F. Deletion of the lipid droplet protein kinase gene affects lipid droplets biogenesis, parasite infectivity, and resistance to trivalent antimony in *Leishmania infantum*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 18, n. 1, p. 1–15, 2024. DOI: 10.1371/journal.pntd.0011880.

ROBENEK, M. J. *et al.* Lipids partition caveolin-1 from ER membranes into lipid droplets: updating the model of lipid droplet biogenesis. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 18, n. 7, p. 866–868, 2004. DOI: 10.1096/fj.03-0782fje.

ROBENEK, H.; ROBENEK, M. J.; TROYER, D. PAT family proteins pervade lipid droplet cores. **Journal of Lipid Research**, v. 46, n. 6, p. 1331–1338, 2005. DOI: 10.1194/jlr.M400323-JLR200.

ROBERTS, M. A.; OLZMANN, J. A. Protein Quality Control and Lipid Droplet Metabolism. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 36, p. 115–139, 2020. DOI:

ROCHA, J.G.D. Efeitos do laser de baixa potência na leishmaniose experimental: avaliação sobre a lesão cutânea (*in vitro*) e efeitos sobre *leishmânia* (*in vitro*). [dissertação]. São Paulo: University of São Paulo, Faculdade de Medicina; 2014 [citado em 23 de Ago. de 2025]. Disponível em: <http://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/4484>.

RODRÍGUEZ, A.; WEBSTER, P.; ORTEGO, J.; ANDREWS, N. W. Lysosomes behave as Ca²⁺-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells. **Journal of Cell Biology**, v. 137, n. 1, p. 93–104, 1997. DOI: doi:10.1083/jcb.137.1.93.

RODRÍGUEZ-ACOSTA, A. *et al.* Liver ultrastructural pathology in mice infected with *Plasmodium berghei*. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v. 30, n. 2, p. 299–307, 1998. PMID: 9648294.

RODRÍGUEZ-BEJARANO, O. H.; AVENDAÑO, C.; PATARROYO, M. A. Mechanisms associated with *Trypanosoma cruzi* host target cell adhesion, recognition and internalization. **Life**, v. 11, n. 6, p. 1–23, 2021. DOI: 10.3390/life11060534.

ROLA, P.; WŁODARCZAK, S.; LESIAK, M.; DOROSZKO, A. Changes in Cell Biology under the Influence of Low-Level Laser Therapy. **Photonics**, v. 9, n. 502, p. 1–15, 2022. DOI: 10.3390/photonics9070502.

ROMANAZZO, S. *et al.* IL-12 involvement in myogenic differentiation of C2C12 *in vitro*. **Biomaterials Science**, v. 3, n. 3, p. 469–479, 2015. DOI: 10.1039/c4bm00315b.

ROTHBERG, K. G. *et al.* Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. **Cell**, v. 68, n. 4, p. 673–682, 1992. DOI: 10.1016/0092-8674(92)90143-z.
 RYU, J. H.; PARK, J.; KIM, B. Y.; *et al.* Photobiomodulation ameliorates inflammatory parameters in fibroblast-like synoviocytes and experimental animal models of rheumatoid arthritis. **Frontiers in Immunology**, v. 14, n. (mar), p. 1–13, 2023. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1122581.

SAFAVI, S. M. *et al.* Effects of low-level He-Ne laser irradiation on the gene expression of IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , TGF- β , bFGF, and PDGF in rat's gingiva. **Lasers in Medical Science**, v. 23, n. 3, p. 331–335, 2008. DOI: 10.1007/s10103-007-0491-5.

SAKURAI, Y.; YAMAGUCHI, M.; ABIKO, Y. Inhibitory effect of low-level laser irradiation on LPS-stimulated prostaglandin E2 production and cyclooxygenase-2 in human gingival fibroblasts. **European Journal of Oral Sciences**, v. 108, n. 1, p. 29–34, 2000. DOI: 10.1034/j.1600-0722.2000.00783.x.

SALES, P. A.; MOLINA, I.; MURTA, S. M. F.; *et al.* Experimental and clinical treatment of Chagas disease: A review. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 5, p. 1289–1303, 2017. DOI: 10.4269/ajtmh.16-0761.

SANT'ANNA, E. F.; ARAÚJO, M.T.S.; NOJIMA, L.I.; CUNHA, A.C.; SILVEIRA, B.L.; MARQUEZAN, M. High-intensity laser application in Orthodontics. **Dental Press J. Orthod** v. 22, n. 6, p. 99-109, 2017. DOI: 10.1590/2177-6709.22.6.099-109.sar.

SANTOS, E. DE S.; SILVA, D. K. C.; REIS, B. P. Z. C. DOS; *et al.* Immunomodulation for the Treatment of Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy: A New Approach to an Old Enemy. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, n. November, p. 1–12, 2021. DOI: 10.3389/fcimb.2021.765879.

SARKAR, B.; SINGH, J.; YADAV, M.; *et al.* PPAR γ mediated enhanced lipid biogenesis fuels *Mycobacterium tuberculosis* growth in a drug-tolerant hepatocyte environment. **Microbiology and Infectious Disease**, v. 2, p. 1–64, 2025. DOI: 10.7554/eLife.103817.2.

SAYGUN, I. *et al.* Effects of laser irradiation on the release of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin like growth factor-1 (IGF-1), and receptor of IGF-1 (IGFBP3) from gingival fibroblasts. **Lasers in Medical Science**, v. 23, n. 2, p. 211–215, 2008. DOI: 10.1007/s10103-007-0477-3.

SCHEFFER, L. L. *et al.* Mechanism of Ca²⁺ -triggered ESCRT assembly and regulation of cell membrane repair. **Nat commun**, v. 5, p. 1–25, 2015. DOI: 10.1038/ncomms6646.Mechanism.

SCHERER, P. E. *et al.* Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 1, p. 131–135, 1996. DOI: 10.1073/pnas.93.1.131.

SCHULTZ, R. J. *et al.* Effects of varying intensities of laser energy on articular cartilage: A preliminary study. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 5, n. 6, p. 577–588, 1985. DOI: 10.1002/lsm.1900050606.

SHAMLOO, S.; DEFENSOR, E.; CIARI, P.; *et al.* The anti-inflammatory effects of photobiomodulation are mediated by cytokines: Evidence from a mouse model of inflammation. **Frontiers in Neuroscience**, v. 17, n. (april), p. 1–11, 2023. DOI: 10.3389/fnins.2023.1150156.

SHEN, C.C, YANG, Y.C, HUANG, T.B, CHAN S.C, and LIU, B.S. Low-Level Laser-Accelerated Peripheral Nerve Regeneration within a Reinforced Nerve Conduit across a Large Gap of the Transected Sciatic Nerve in Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-12, 2013. DOI: 10.1002/jbm.a.34581.

SKINNER, J. R. *et al.* Perilipin 1 moves between the fat droplet and the endoplasmic reticulum. **Adipocyte**, v. 2, n. 2, p. 80–86, 2013. DOI:

10.4161/adip.22864.

SRINIVASAN, S., AVADHANI, N. Cytochrome c Oxidase Dysfunction in Oxidative Stress. **Free Radic Biol Med.**, v. 53, n. 6, p. 1252–1263, 2012. DOI: 10.1038/jid.2014.371.

SOARES, V. C.; DIAS, S. S. G.; SANTOS, J. C.; *et al.* Inhibition of the SREBP pathway prevents SARS-CoV-2 replication and inflammasome activation. **Life Science Alliance**, v. 6, n. 11, p. 1–16, 2023. DOI: 10.26508/lsa.202302049.

SÖLLNER, T. *et al.* SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. **Nature**, v. 362, n. 6418, p. 318–324, 1993. DOI: 10.1038/362318a0.

SONG, K. S. *et al.* Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 25, p. 15160–15165, 1996. DOI: 10.1074/jbc.271.25.15160.

SOUZA, W. DE. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. SUPPL. 1, p. 89–100, 2009. DOI: 10.1155/2010/295394.

SOUZA, W. DE; DE CARVALHO, T. M. U.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host cell interaction. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, n. 1, p. 1–118, 2010. DOI:

SOUZA, NHC.; FERRARI, RAM.; NUNES, FD.; BUSSADORI, SK.; FERNANDES, KPS. Effect of low-level laser therapy on the modulation of the mitochondrial activity of macrophages. **Brazil J Phys Ther**, v. 18, n.4, p. 308-314, 2014. DOI: 10.1590/bjpt-rbf.2014.0046.

STEA, M. D.; D'ALESSIO, A. Caveolae: Metabolic Platforms at the Crossroads of Health and Disease. **Int J Mol Sci**, v. 26, n. 7, p. 1-29, 2025. DOI: 10.3390/ijms26072918.

STEINER, R. Laser-Tissue Interactions. *In*: RAULIN, C.; KARSAI, S. (Ed.). **Laser and IPL Technology in Dermatology and Aesthetic Medicine**. Berlin: Springer, 2011. p. 23-36. DOI: 10.1007/978-3-642-03438-1.

SU, C. T.; CHIU, F. C.; MA, S. H.; WU, J. H. Optimization of Photobiomodulation Dose in Biological Tissue by Adjusting the Focal Point of Lens. **Photonics**, v. 9, n. 5, p. 1–10, 2022. DOI: 10.3390/photonics9050350.

SU, CHUAN-TSUNG; WU, JIH-HUAH. Photobiomodulation in biological tissues: Light penetration, dosimetry, and potential applications. **Optics and Lasers in Engineering**, v. 186, p. 108852, 2025. DOI: 10.1016/j.optlaseng.2025.108852.

TAM, C. *et al.* Exocytosis of acid sphingomyelinase by wounded cells promotes endocytosis and plasma membrane repair. **Journal of Cell Biology**, v. 189, n. 6, p. 1027–1038, 2010. DOI: 10.1083/jcb.201003053.

TAN, Y.J.; ZHOU, J.; YANG, Y.F. Lipid droplets in pathogen infection and host immunity. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 45, p. 449-464, 2024. DOI: 10.1038/s41401-023-01189-1.

TANCINI, B.; BURATTA, S.; DELO, F.; *et al.* Lysosomal exocytosis: The extracellular role of an intracellular organelle. **Membranes**, v. 10, n. 12, p. 1–21, 2020. DOI: 10.3390/membranes10120406.

TANG, Z. *et al.* Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 4, p. 2255–2261, 1996. DOI: 10.1074/jbc.271.4.2255.

TANIGAWA, K.; LUO, Y.; KAWASHIMA, A.; *et al.* Essential roles of ppar α in lipid metabolism during mycobacterial infection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 14, p. 1–11, 2021. DOI: 10.3390/ijms22147597.

TARDIEUX, I. *et al.* Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. **Cell**, v. 71, n. 7, p. 1117–1130, 1992. DOI: 10.1016/S0092-8674(05)80061-3.

TARDIEUX, I.; Nathanson, M. H.; Andrews, N. W. Role in Host Cell Invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced Cytosolic-free Ca²⁺ Transients. **J. Exp. Med**, v. 179, n. 4, p. 1017–1022, 1994. DOI: 10.1084/JEM.179.3.1017.

TARLETON, R. L. CD8⁺ T Cells in *Trypanosoma cruzi* Infection. **Semin Immunopathol**, v. 37, n. 3, p. 233–238, 2015. DOI: 10.1007/s00281-015-0481-9.CD8.

TAUCHI-SATO, K. *et al.* The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 46, p. 44507–44512, 2002. DOI: 10.1074/jbc.M207712200.

TAVARES, V. D. S.; DE CASTRO, M. V.; SOUZA, R. D. S. O.; *et al.* Lipid droplets from protozoan parasites: Survival and pathogenicity. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 116, n. 6, p. 1-8, 2021. DOI: 10.1590/0074-02760210270.

TAYLOR, D. N.; WINFIELD, T.; WYND, S. Low-Level Laser Light Therapy Dosage Variables vs Treatment Efficacy of Neuromusculoskeletal Conditions: A Scoping Review. **Journal of Chiropractic Medicine**, v. 19, n. 2, p. 119–127, 2020. DOI: 10.1016/j.jcm.2020.06.002.

TIM, C. R.; BOSSINI, P. S.; KIDO, H. W.; *et al.* Effects of low level laser therapy on inflammatory and angiogenic gene expression during the process of bone healing: A microarray analysis. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 154, p. 8–15, 2016. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2015.10.028.

TOOBIAN, D.; GHOSH, P.; KATKAR, G. D. Parsing the Role of PPARs in Macrophage Processes. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. (dec), p. 1–17, 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2021.783780.

TOGO, T. Disruption of the plasma membrane stimulates rearrangement of microtubules and lipid traffic toward the wound site. **Journal of Cell Science**, v. 119, n. 13, p. 2780–2786, 2006. DOI: 10.1242/jcs.03006.

TOLEDO, D. A. M. *et al.* Lipid body organelles within the parasite *Trypanosoma cruzi*: A role for intracellular arachidonic acid metabolism. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, p. 1–22, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0160433.

TOMAZONI, S. S.; COSTA, L. O. P.; JOENSEN, J.; *et al.* Photobiomodulation Therapy is Able to Modulate PGE2 Levels in Patients With Chronic Non-Specific Low Back Pain: A Randomized Placebo-Controlled Trial. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 53, n. 2, p. 236–244, 2021. DOI: 10.1002/lsm.23255.

TYLER, K.; OLSON, C.; ENGMAN, D. The Life Cycle Of *Trypanosoma cruzi*. **American Trypanosomiasis**, v. 7, p. 1–11, 2002. DOI: 10.1016/S0020-7519(01)00153-9.

VALLOCHI, A. L.; TEIXEIRA, L.; OLIVEIRA, K. DA S.; MAYA-MONTEIRO, C. M.; BOZZA, P. T. Lipid droplet, a key player in host-parasite interactions. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. (may), p. 1–18, 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01022.

VAN MEER, G., VOELKER, D.R., FEIGENSON, G.W. Membrane lipids: where they are and how they behave. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 2, p. 112-124, 2008. DOI: 10.1038/nrm2330.

VIETRI, M.; RADULOVIC, M.; STENMARK, H. The many functions of ESCRTs. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 1, p. 25–42, 2020. DOI: 10.1038/s41580-019-0177-4.

VONTZALIDIS, A., TERZIS, G., MANTA, P. Increased dysferlin expression in Duchenne muscular dystrophy. **Anal Quan Cytopathol Histpathol**, v. 36(1), p. 15-22, 2014. PMID: 24902367.

XIE, X. Y.; BARRETT, J. N. Membrane resealing in cultured rat septal neurons after neurite transection: evidence for enhancement by Ca(2+)-triggered protease activity and cytoskeletal disassembly. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 11, n. 10, p. 3257–67, 1991. DOI: 10.1093/eurpub/ckm107.

WHO, Working to overcome the global impact neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases Health Organization, Geneva, Switzerland, 2018.

WON, M. M.; KRÜGER, T.; ENGSTLER, M.; BURLEIGH, B. A. The Intracellular Amastigote of *Trypanosoma cruzi* Maintains an Actively Beating Flagellum. **mBio**, v. 14, n. 2, p. 1–5, 2023. DOI: 10.1128/mbio.03556-22.

YAMAURA, M. *et al.* Low level light effects on inflammatory cytokine production by rheumatoid arthritis synoviocytes. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 41, n. 4, p. 282–290, 2009. DOI: 10.1002/lsm.20766.

YANG, Q.; ZHANG, P.; LU, Q.; YAN, H.; SHI, H.; YU, Z.; SUN, T.; LI, R.; WANG, Q.; WU, Y.; CHEN, J. Application and development of blue and green laser in industrial manufacturing: a review. **Optics & Laser Technology**, v. 170, p. 1-19, 2024. DOI: 10.1016/j.optlastec.2023.110202.

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 78, n. 1, p. 1–25, 2006. DOI: 10.1590/S0001-37652006000100010.

ZADOORIAN, A.; DU, X.; YANG, H. Lipid droplet biogenesis and functions in health and disease. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 19, n. 8, p. 443–459, 2023. DOI: 10.1038/s41574-023-00845-0.

ZEIN, R.; SELTING, W.; HAMBLIN, M. R. Review of light parameters and photobiomodulation efficacy: dive into complexity. **Journal of Biomedical Optics**, v. 23, n. 12, p. 1–18, 2018. DOI: 10.1117/1.jbo.23.12.120901

ZHANG, L. *et al.* Low-power laser irradiation inhibiting A β 25-35-induced PC12 cell apoptosis via PKC activation. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 22, n. 1–4, p. 215–222, 2008. DOI: 10.1159/000149799.

ZHANG, Z.; YU, Z.; LIANG, D.; *et al.* Roles of lipid droplets and related proteins in metabolic diseases. **Lipids in Health and Disease**, v. 23, n. 1, p. 1–19, 2024. DOI: 10.1186/s12944-024-02212-y.

ZHEN, Y.; RADULOVIC, M.; VIETRI, M.; STENMARK, H. Sealing holes in cellular membranes. **The EMBO Journal**, v. 40, n. 7, p. 1–13, 2021. DOI: 10.15252/embj.2020106922.

ZHEVAGO, N.A., SAMOILOVA, K.A. Pro- and anti-inflammatory cytokine content *in human* peripheral blood after its transcutaneous (*in vitro*) and direct (*in vitro*) irradiation with polychromatic visible and infrared light. **Photomed Laser Surg**, v. 24, n.2, p. 129-139, 2006. DOI: 10.1089/pho.2006.24.129.

ZHONG, D.; WANG, R.; ZHANG, H.; *et al.* Induction of lysosomal exocytosis and biogenesis via TRPML1 activation for the treatment of uranium-induced nephrotoxicity. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, p. 1–18, 2023. DOI: 10.1038/s41467-023-39716-7.