

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE IMUNOLOGIA, GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

Gustavo Henrique Castanheira Pereira

ANÁLISE DA ATIVIDADE DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE *Trypanosoma cruzi* NA MODULAÇÃO DA BIOGÊNESE DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS E DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA *IN VITRO*
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

JUIZ DE FORA

2024

Gustavo Henrique Castanheira Pereira

ANÁLISE DA ATIVIDADE DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE *Trypanosoma cruzi* NA MODULAÇÃO DA BIOGÊNESE DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS E DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA *IIN VITRO*

Dissertação de Mestrado do Curso
de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Imunologia, Genética e
Biotecnologia, apresentada como
requisito para a obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas: Área:
Imunologia e Genética.

ORIENTADORA

Profa. Dra. Patrícia Elaine de Almeida
Laboratório de Biologia Celular
Departamento de Biologia, UFJF.

Juiz de Fora

2024

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

Pereira, Gustavo Henrique Castanheira .

Análise da Atividade de Vesículas Extracelulares de *Trypanosoma cruzi* na Modulação da Biogênese de Corpúsculos Lipídicos e da Resposta Inflamatória In Vitro / Gustavo Henrique Castanheira Pereira. -- 2024.

74 p. : il.

Orientadora: Patrícia Elaine De Almeida

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2024.

1. Vesículas Extracelulares. 2. Corpúsculos Lipídicos. 3. *Trypanosoma cruzi*. I. De Almeida, Patrícia Elaine , orient. II. Título.

GUSTAVO HENRIQUE CASTANHEIRA MOREIRA

Análise da Atividade de Vesículas Extracelulares de *Trypanosoma cruzi* na Modulação da Biogênese de Corpúsculos Lipídicos e da Resposta Inflamatória *In Vitro*

Dissertação
apresentada ao
Programa de Pós-
graduação em
Ciências Biológicas
da Universidade
Federal de Juiz de
Fora como requisito
parcial à obtenção do
título de Mestre em
Ciências Biológicas.
Área de
concentração:
Imunologia e
Doenças
Infectoparasitárias.

Aprovada em 29 de novembro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Patrícia Elaine de Almeida - Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a. Dr^a. Juciane Maria de Andrade Castro

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Daniel Afonso de Mendonça Toledo

Instituto Federal de Minas Gerais



Documento assinado eletronicamente por **Patricia Elaine de Almeida, Professor(a)**, em 03/12/2024, às 09:13, 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 **Juciane Maria de Andrade Castro, Professor(a)**, em 06/12/2024, às 15:52, 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 **Daniel Afonso de Mendonça, Usuário Externo**, em 10/12/2024, às 16:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **2102884** e o código CRC **6AF5C9A6**.

DEDICAÇÃO

Dedico este trabalho a:

Minha esposa, meus filhos, minha mãe (in memorian), meu pai e a todos os meus familiares e amigos que acreditaram em mim.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela sua grande ajuda em minha caminhada, pois sem ele, principalmente nos momentos difíceis, não teria forças para seguir. A obtenção deste título significa para mim uma vitória, resultado de muita luta, dedicação e fé;

À minha esposa Marilene, que desde o início me deu todo o apoio moral e psicológico, nos momentos bons e difíceis. Seu apoio foi de suma importância para que pudesse finalizar meus trabalhos. Agradeço pelo seu apoio na minha escolha, enfim, tudo o que me proporcionou foi essencial para a conquista dessa vitória;

A meus filhos que sempre estiveram do meu lado dando apoio e até mesmo ajudando na elaboração deste projeto;

À minha orientadora Dr^a Patrícia Elaine de Almeida pela acolhida e oportunidade de aprendizado, pela confiança depositada em minha pessoa e pela paciência de cada dia. Sua paciência, apoio e ensinamentos foram de suma importância para a obtenção deste título;

Aos colegas de laboratório: Laiza, Poly, Renata, Gabriel, Luíza, Ana Luíza Albertoni, Gustavo Albertoni, Adriana, que, sem a ajuda deles nunca conseguiria finalizar meu trabalho; Agradeço de coração;

Às professoras Heloísa e Jacy, pela atenção e paciência depositada;

Meus agradecimentos ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas e Doenças Infecto-Parasitárias e também à Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) pela oportunidade de realizar e finalizar esse projeto de mestrado e por todos os recursos oferecidos para a concretização desse trabalho e aperfeiçoamento da minha capacidade profissional;

Meus agradecimentos também às agências de fomento que nos auxiliaram com recursos e financiamentos imprescindíveis: Capes, Fapemig, CNPq, PPGCBio, Laboratório de Bioquímica (UFJF) e ao Laboratório de Biologia Celular;

Enfim, a todos que de uma forma direta ou indireta, conseguiram fazer com que este sonho fosse realizado.

RESUMO

Durante a infecção pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, a resposta imunológica desempenha um papel fundamental no controle da carga parasitária e na sobrevivência do hospedeiro. No entanto, o parasita possui sofisticados mecanismos de evasão imunológica que favorecem sua persistência e a progressão para a fase crônica da doença. Dentre esses mecanismos, as vesículas extracelulares (VEs) de *T. cruzi* atuam como mediadores de comunicação intercelular, transportando moléculas funcionais que interagem com células do hospedeiro e modulam a resposta imunológica em favor do parasita. As VEs são estruturas delimitadas por uma bicamada lipídica, liberadas no meio extracelular, e participam de interações tanto entre parasitas quanto entre parasita e hospedeiro. Estudos indicam que essas nanoestruturas induzem a formação de corpúsculos lipídicos (CLs) e modulam a resposta imune do hospedeiro. Entretanto, os mecanismos moleculares pelos quais as VEs regulam o metabolismo lipídico e a resposta inflamatória ainda não são completamente elucidados. Neste estudo, avaliamos o papel das VEs derivadas de formas tripomastigotas da cepa DM28c de *T. cruzi* na ativação de células C2C12. Foram analisadas a modulação do metabolismo lipídico, a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-12 e IL-6, e anti-inflamatórias, como IL-10, além do impacto das VEs no curso da infecção pelo parasita. Os resultados indicaram que a estimulação das células C2C12 com VEs promove um aumento na formação de CLs, efeito potencializado na presença da infecção por *T. cruzi* após 24 horas. Além disso, as VEs induziram um perfil inibitório na produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-12, TNF- α e IL-6), efeito intensificado quando as células foram expostas simultaneamente às VEs e ao parasita. Em contrapartida, observamos um perfil de aumento na produção de IL-10 na presença das VEs, fenômeno amplificado durante a infecção. Esses achados sugerem que as VEs de *T. cruzi* exercem um papel imunomodulador, favorecendo a sobrevivência do parasita ao suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias e estimular a secreção de IL-10. A imunomodulação promovida pelas VEs, aliada à indução da biogênese de CLs, pode contribuir para a persistência do *T. cruzi* nas células hospedeiras, impactando a patogênese da doença de Chagas.

Palavras-chave: Vesículas Extracelulares, Corpúsculos lipídicos, *Trypanosoma cruzi*

ABSTRACT

During infection by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, the immune response plays a crucial role in controlling parasite load and ensuring host survival. However, the parasite has developed sophisticated immune evasion mechanisms that promote its persistence and the progression to the chronic phase of the disease. Among these mechanisms, extracellular vesicles (EVs) from *T. cruzi* act as intercellular communication mediators, transporting functional molecules that interact with host cells and modulate the immune response in favor of the parasite. EVs are lipid bilayer-enclosed structures released into the extracellular environment, participating in both parasite-parasite and parasite-host interactions. Studies indicate that these nanostructures induce the formation of lipid bodies (LBs) and modulate the host immune response. However, the molecular mechanisms by which EVs regulate lipid metabolism and inflammatory responses remain unclear. In this study, we evaluated the role of EVs derived from trypomastigote forms of the *T. cruzi* DM28c strain in the activation of C2C12 cells. We analyzed the modulation of lipid metabolism, the production of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-12, and IL-6, as well as the anti-inflammatory cytokine IL-10, and the impact of these EVs on the course of *T. cruzi* infection. The results indicated that EV stimulation of C2C12 cells promotes an increase in LB formation, an effect that is enhanced in the presence of *T. cruzi* infection after 24 hours. Furthermore, EVs induced a reduction in the production of pro-inflammatory cytokines (IL-12, TNF- α , and IL-6), an effect intensified when cells were simultaneously exposed to both EVs and the parasite. Conversely, we observed an increase in IL-10 production in the presence of EVs, a phenomenon amplified during infection. These findings suggest that *T. cruzi*-derived EVs exert an immunomodulatory role, favoring parasite survival by suppressing pro-inflammatory cytokine production and stimulating IL-10 secretion. The immunomodulation induced by EVs, combined with the promotion of LB biogenesis, may contribute to the persistence of *T. cruzi* in the mammalian host, impacting the pathogenesis of Chagas disease.

Keywords: Extracellular Vesicles, Lipid Droplets, *Trypanosoma cruzi*

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS

FIGURA 1: Ciclo evolutivo da Doença de Chagas.....	15
FIGURA 2: Interação entre <i>T.cruzi</i> e célula hospedeira.....	18
FIGURA 3: Imunidade inata e adquirida durante infecção pelo <i>T. cruzi</i>	20
FIGURA 4: Representação esquemática da origem das vesículas extracelulares.....	24
FIGURA 5: Escalas de tamanho dos principais tipos de vesículas extracelulares.....	24
FIGURA 6: Ilustração esquemática resumindo as moléculas identificadas em vesículas extracelulares.....	27
FIGURA 7: Vesículas Extracelulares de <i>T. cruzi</i>	29
FIGURA 8: Representação da estrutura de CLs por microscopia de luz e eletrônica de transmissão.....	30
FIGURA 9: Interações entre <i>T. cruzi</i> , VEs e a célula do hospedeiro.....	32
FIGURA 10: Representação esquemática do processo de extração de VEs.....	35
TABELAS 01,02,03: Dosagem de proteínas das VEs.....	39
FIGURA 11 A e B: Análise da biogênese de corpúsculos lipídicos em células C2C12...	41
FIGURA 12 A, B, C e D: Análise da produção de citocinas em células C2C12.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

AMPc: Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

AMPc C/EBP: Proteína de ligação ao intensificador CCAAT

BHI: Infusão de cérebro e coração

CLs: Corpúsculos lipídicos

CE: Ésteres de colesterol

DCA: Doença de Chagas aguda

DEX: Dexametasona

DGAT: Aciltransferase

DMEN: Meio eagle modificado por Dulbeccos

VEs: Vesículas extracelulares

FBS: Soro fetal bovino

FIT: Proteases transmembrana

FSA: Fator de secreção de adipócitos

GIPLs: Fosfolipídios de glicoinositol

GPI: Glicosil fosfatidilinositol

IBMX: Metilisobutilxantina

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

IL: Interleucina

IL-18: Interleucina 18

IL-4: Interleucina 4

IL-13: Interleucina 13

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

IL-1 β : Interleucina1 β

IL-6: Interleucina 6

iNOS: Óxido nítrico sintase induzível

IFN- γ : Interferon – gama

INF α : Interferon alfa

INS: Insulina

LPS: Lipopolissacarídeo

MS: Ministério da Saúde

NF-K β : Fator nuclear

NO: óxido nítrico

NLRs: Receptores contendo repetição de domínio de ligação de nucleotídeos ricos em leucina

NOS: Óxido nítrico sintase

NK: natural Killer

OMS: Organização Mundial da Saúde

PGE 2: Prostaglandinas 2

PLIN 1: Perilipinas

PPAR γ : Receptor γ ativado por proliferadores de peroxissomos

ROS: espécies reativas de oxigênio

SM: síndrome metabólica

TA: Tecido adiposo

TV: Tecido adiposo visceral

TAB: Tecido Adiposo Branco

TAG: Ttriacilglicerol

TAM: Tecido adiposo marrom

TAU: Urina artificial de triatomídeos

TGF β —beta: Fator de transformação do crescimento

TF: Fatores de transcrição

TLR: Receptor Toll-like

TNF- α : Fator de necrose tumoral – alfa

TNF-R1: Fator de necrose tumoral subtipo receptor 1

Treg: T reguladora

VEs: Vesículas Extracelulares

RE: Retículo endoplasmático

ROS: Reativo de oxigênio e nitrogênio

SUMÁRIO

1-	INTRODUÇÃO	12
1.1	DOENÇA DE CHAGAS HISTÓRICO E AGENTE ETIOLÓGICO.....	12
1.2	EPIDEMIOLOGIA E CICLO DE VIDA DO <i>T. cruzi</i>	13
1.3	INTERAÇÕES ENTRE <i>T. cruzi</i> E A CÉLULA HOSPEDEIRA	16
1.4	A INFECÇÃO POR <i>T. cruzi</i> E A RESPOSTA IMUNE	18
1.5	VESÍCULAS EXTRACELULARES: CARACTERIZAÇÃO.....	22
1.6	VESÍCULAS EXTRACELULARES DE <i>T. cruzi</i>	26
1.7	MODULAÇÃO DO METABOLISMO LIPÍDICO DO HOSPEDEIRO.....	30
2-	JUSTIFICATIVA	33
3-	OBJETIVOS	34
3.1	OBJETIVO GERAL.....	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
3.3	MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1	ISOLAMENTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	35
4.2	ESTÍMULO DE CÉLULAS C2C12 COM VESÍCULAS EXTRACELULARES	36
4.3	OBTENÇÃO E CULTURA DE <i>T. cruzi</i>	36
4.4	COLORAÇÃO COM OIL RED E CONTAGEM DE CL.....	37
4.5	AQUISIÇÃO DE IMAGENS.....	37
4.6	DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	38
4.7	DOSAGEM DE CITOCINAS.....	38
5.	RESULTADOS	39
5.1	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS REFERENTES ÀS VEs PURIFICADAS	39
5.2	ANÁLISE DA BIOGÊNESE DE CLs EM CÉLULAS C2C12 ESTIMULADOS COM VEs ORIGINADAS DE <i>T. cruzi</i> E INFECTADAS OU NÃO COM <i>T. cruzi</i>	40
5.3	ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM CÉLULAS ESTIMULADAS COM VEs ORIGINADAS DE FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE <i>T. cruzi</i> E INFECTADAS OU NÃO COM <i>T. cruzi</i> APÓS 24 HORAS	42
6	DISCUSSÃO	44
7	CONCLUSÕES	47
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1- INTRODUÇÃO

1.1. DOENÇA DE CHAGAS HISTÓRICO E AGENTE ETIOLÓGICO

A doença de Chagas é causada pelo protozoário *T. cruzi*, sendo considerada uma parasitose endêmica, sendo amplamente distribuída pela América Latina, com estimativa de mais de 06 milhões de pessoas infectadas. Afeta populações vulneráveis e tem um impacto importante na saúde pública, bem-estar social e econômico dos indivíduos infectados (Organização Mundial de Saúde, 2022, chagas-disease-american-trypanomiasis). A Doença de Chagas insere-se no grupo de doenças tropicais negligenciadas. Trata-se de uma condição infecciosa crônica, exigindo uma resposta social adequada dos sistemas nacionais a partir de suas redes de atenção à saúde, do Sistema Único de Saúde (SUS) (PEREIRA-SILVA ET AL., 2022).

No Brasil a doença de Chagas começou a ser documentada pelo médico e cientista Dr. Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (1879 a 1934), sendo que seu sobrenome foi atribuído a denominação da doença. Em seus estudos ele examinou animais da fauna local onde encontrou um protozoário flagelado que estava infectando micos. Continuando seus estudos, ele verificou a presença de outro tipo de flagelado, diferente do anterior, presente no tubo digestivo de barbeiros hematófagos, de cinetoplasto extremamente denso e movimentação intensa (FITARELLI, HORN, 2009).

A Doença de Chagas também é conhecida como tripanossomíase ou tripanossomíase americana, terminologia adotada pela Nomenclatura Internacional de Doenças (NID). Diz-se tripanossomíase qualquer enfermidade causada por protozoários do gênero *Trypanosoma*, que parasitam o sangue e os tecidos de pessoas e animais. O *T. cruzi* geralmente é transmitido de um hospedeiro a outro por insetos – no caso humano. O principal vetor é um percevejo popularmente conhecido como barbeiro ou chupão, insetos estes que povoam matas e florestas (Figura 01), a qual suas principais espécies são: *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus*, dentre mais de 300 espécies que podem transmitir o *T. cruzi* (KROPF, PETRAGLIA, 2009).

Desde 1960 programas governamentais foram implantados com o objetivo de erradicar o inseto vetor, principalmente em função da colonização de regiões antes não povoadas e o desmatamento generalizado, aumentando significativamente o número de casos, principalmente no Brasil. Em 1991 surgiu a “Iniciativa do Cone Sul”, uma união dos

governos do Brasil, Argentina, Bolívia, Chile, Paraguai, Uruguai e Peru que tinha por objetivo erradicar o principal vetor da doença de Chagas, o *Triatoma infestans*. Como resultado, o Brasil recebeu em 2006 o Certificado Internacional de Eliminação da Transmissão da Doença de Chagas (FERREIRA, SILVA 2006). Além disso, em 2008, a transmissão vetorial também foi interrompida no Chile e Uruguai (SCHOFIELD, DIAS, 1999; MASSAD, 2008).

Contudo, apesar dos esforços para eliminação do vetor, não houve posteriormente uma eficiente vigilância e prevenção. Como resultado, em áreas antes livres de insetos triatomíneos foi possível encontrar insetos vetores parasitados (SCHOFIELD, DIAS, 1999; MASSAD, 2008).

1.2. EPIDEMIOLOGIA E CICLO DE VIDA DO *Trypanosoma cruzi*

As doenças tropicais negligenciadas afetam mais de 1 bilhão de pessoas em todo o mundo, principalmente populações de baixa renda que vivem em climas tropicais e subtropicais, constituindo um problema significativo de saúde pública (MS 2019).

A doença de Chagas é uma antropozoonose, uma doença que liga o homem aos animais, a partir da domiciliação dos vetores, deslocados de seus nichos silvestres originais, pela ação do homem sobre o ambiente. A partir do momento que o homem adentrou-se nas matas e florestas em função de programas governamentais de povoamento de regiões ainda não habitadas e em função da saída do homem da cidade para o campo, o hospedeiro intermediário (Triatomínio) começou a encontrar um ambiente propício para viver e se alimentar. Primariamente, ocorre apenas na América Latina, em virtude da distribuição do vetor estar restrita a este continente. Entretanto, são registrados casos em países não endêmicos (Estados Unidos, Canadá, Austrália), países estes que tiveram grande taxa de migração de pessoas oriundas da América Latina. Devido a processos como a transfusão sanguínea vieram a proporcionar quadros de transmissão da doença (MS, 2019).

No Brasil, atualmente predominam os casos crônicos de doença de Chagas decorrentes de infecções adquiridas no passado. No entanto, nos últimos anos, a ocorrência de doença de Chagas aguda (DCA) tem sido observada nos estados da Amazônia Legal, com ocorrência de casos de transmissão vetorial e oral, como os de origem de contaminação através de alimentos contaminados, alimentos estes como o açaí e caldo de cana (CUTRIM, 2017).

Hoje, o perfil epidemiológico da doença apresenta um novo cenário com a ocorrência de casos e surtos na Amazônia Legal por transmissão oral e vetorial (MS, 2019). No Brasil,

estima-se que existam hoje de 1 a 4,6 milhões de pessoas afetadas pela doença. Trata-se de gerações de pessoas vivendo com Chagas, a maioria na invisibilidade por não ter sido sequer diagnosticada e, portanto, alheia às possibilidades de tratamentos existentes. No ano de 2019, o Brasil registrou 4.287 mortes por doença de Chagas como causa básica (MSF, 2020). No entanto, pela falta de conhecimento da doença e, conseqüentemente pouco diagnóstico e notificação, é possível que exista grande número de casos sem registro, principalmente durante o período de pandemia da COVID-19 (MSF, 2020).

O protozoário *T. cruzi* possui várias fases do ciclo de vida sendo as tripomastigotas sanguíneas, as formas circulantes no mamífero hospedeiro definitivo e as formas amastigotas que colonizam as células do hospedeiro definitivo, tendo a função de replicação (Figura 1). No barbeiro existem as formas epimastigotas que são responsáveis pela replicação que ocorre na porção média do intestino do barbeiro e as formas tripomastigotas metacíclicas que são eliminadas através da porção final do intestino do barbeiro e são responsáveis por infectarem o hospedeiro definitivo (Figura 1), (CONRADO, 2011). Estudos apontam a existência de formas intermediárias entre tripomastigota e epimastigota (BARRIAS; DE CARVALHO; DE SOUZA, 2020) sendo que algumas dessas formas também são capazes de infectar células (KESSLER et al., 2017).

Os triatomíneos, ou barbeiros infectados, alimentam-se do sangue dos mamíferos e contaminam estes com o parasita ao depositar suas fezes com as formas tripomastigota metacíclico sobre a pele. Ao coçar estas formas são inoculadas no hospedeiro. As formas tripomastigota metacíclico penetram nas células do hospedeiro e lá se diferenciam em formas amastigotas que irão se multiplicar, romper as células e se diferenciar em tripomastigotas sanguíneas que na corrente sanguínea irão infectar novamente novas células, se diferenciar em amastigotas ou na corrente sanguínea são novamente ingeridas pelo barbeiro. Uma vez no tubo digestivo do barbeiro, a forma tripomastigota sanguínea se diferencia em epimastigota que depois se diferencia em tripomastigota metacíclico, posteriormente é eliminado nas fezes junto ao ponto da “picada”, quando sugam o sangue (Figura 01).

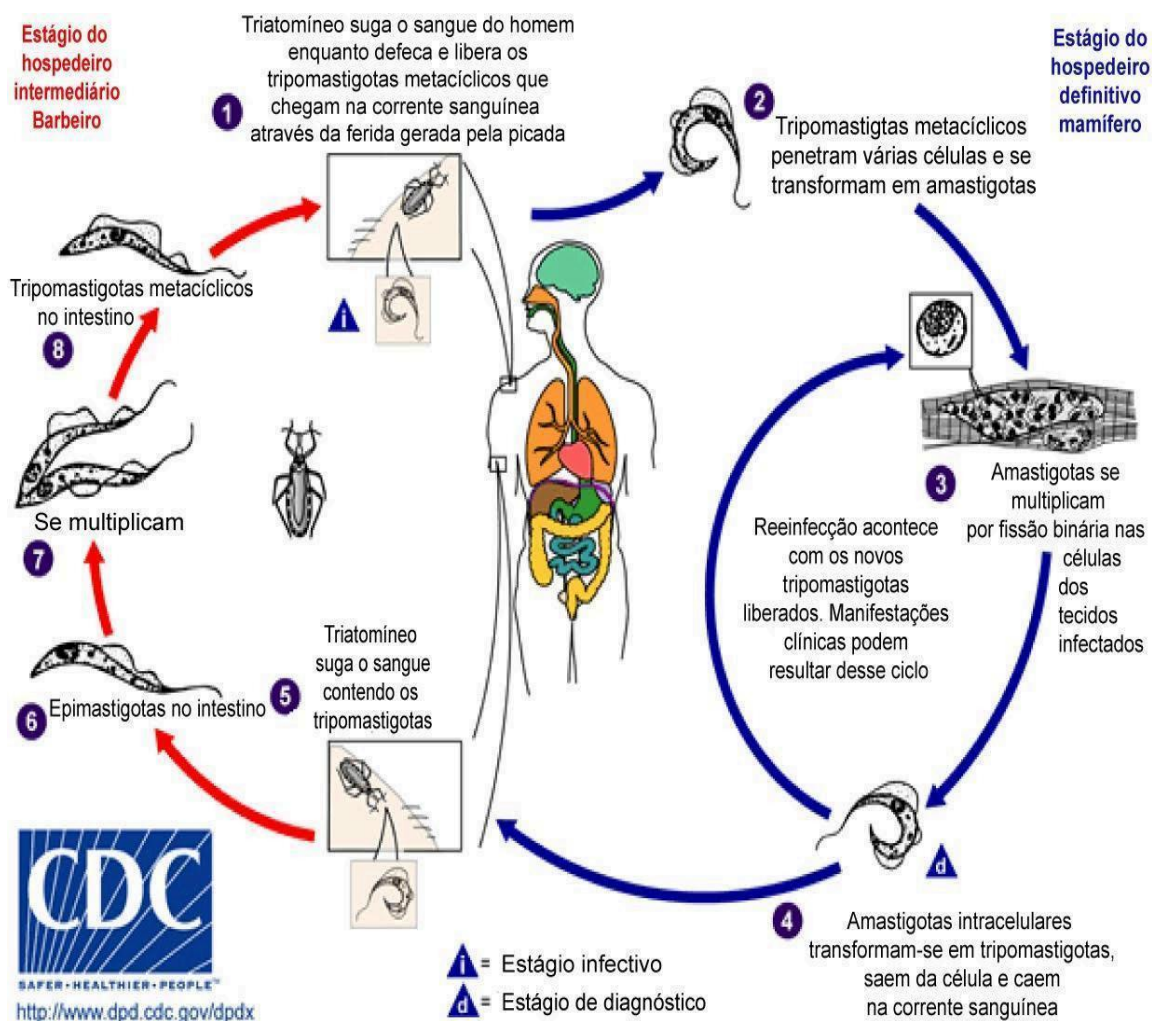


Figura 1: Ciclo evolutivo da doença de Chagas. Ciclo de vida do *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado e invertebrado. Fonte: Adaptado de DE SOUZA; DE CARVALHO e BARRIAS, 2010.

As formas tripomastigotas metacíclicas são altamente infectantes, podendo invadir os primeiros tipos celulares que encontram, como macrófagos, fibroblastos ou células epiteliais, entre outras. Após invadir estas células, as formas tripomastigotas metacíclicas se diferenciam em amastigotas, que são as formas responsáveis pela proliferação intracelular, e liberação de formas tripomastigotas sanguíneas, bem como algumas formas intermediárias e amastigotas (estas últimas em menor proporção) no espaço intercelular. Estas formas podem invadir novas células localizadas no sítio de infecção, podendo atingir a corrente sanguínea e atingir todos os tecidos do hospedeiro, onde vão invadir os mais diferentes tipos celulares (Figura 1). Não se deve esperar um comportamento homogêneo do *T. cruzi*. Realmente, a cinética do processo

descrito acima, assim como os tecidos mais infectados vão variar de acordo com a cepa do *T. cruzi*, o animal infectado, fatores moleculares da cepa e do hospedeiro. Essa variabilidade pode explicar a ampla patogênese observada nas infecções por *T. cruzi* (DEVERA et al., 2002).

1.3. INTERAÇÕES ENTRE *Trypanosoma cruzi* E A CÉLULA HOSPEDEIRA

A interação entre *T. cruzi* e célula hospedeira pode ser dividida em três etapas: adesão ou reconhecimento, sinalização e invasão. A adesão envolve o reconhecimento de moléculas presentes nas duas células envolvidas: o parasita e seu hospedeiro (SANT'ANNA; DE ALMEIDA, 2022). Portanto, a adesão é um processo mediado por receptor, restrito a domínios de membrana (Figura 2). Várias moléculas em ambas as células estão envolvidas neste reconhecimento inicial, incluindo glicoproteínas, glicolípidos e proteínas do tipo lectina (SANT'ANNA; ALMEIDA, 2022). A maioria das glicoproteínas que participam deste processo são ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GPI), cujo domínio N-terminal externo e variável está localizado na glicocálise do parasita, facilitando a conexão com vários constituintes da membrana celular hospedeira e da matriz extracelular (Figura 2), (SANT'ANNA et al., 2022).

Tem sido mostrado que o ácido siálico atua como molécula moduladora do processo de adesão entre o *T. cruzi* e as células hospedeiras. As moléculas Gp82 (presente em tripomastigotas metacíclicos) e Gp85 (presente em tripomastigota de cultivo celular) são moléculas da superfamília de gp85/sialidase (Figura 2) (SANT'ANNA et al., 2022).

Após a adesão do parasita à superfície da célula hospedeira, ocorre uma série de processos de sinalização celular, que culminarão na sua internalização pela célula hospedeira. Dentre os mecanismos de entrada, ocorre a fagocitose/macropinocitose, onde as células emitem pseudópodes e há participação de filamentos de actina (LOPES et al., 2016). O processo conhecido como autofagia também pode ser desencadeado pela entrada (e formação do autofagossoma) de *T. cruzi*. Este processo é marcado pela ativação da via de sinalização mTor e pelo recrutamento da proteína LC3b (DUQUE et al, 2017).

Nos momentos iniciais de reconhecimento do *T. cruzi* com a célula hospedeira ocorre um aumento transiente dos níveis citoplasmáticos de cálcio, tanto no parasita quanto na célula

hospedeira (Figura 2) e há também uma elevação nos níveis de AMP cíclico nas células hospedeiras durante o curso da infecção (CALER et al., 2000; SOUZA et al., 2010). Esta elevação de cálcio é de suma importância para a entrada do parasita. Caso a elevação do cálcio citoplasmático seja bloqueada (por tratamento com Tapsigargina, por exemplo), ocorre uma redução na entrada do parasita (SANT'ANNA et al, 2022). Tem sido descrito também a participação de regiões da membrana plasmática e endossomas iniciais das células hospedeiras no mecanismo de entrada. A fusão de vesículas da via endocítica (endossoma inicial, tardio e de reciclagem) é descrita como essencial para a maturação do vacúolo contendo *T. cruzi*. (CORRÊA, 2007).

Além de ser requerida a sinalização por cálcio intracelular das células - fibroblastos, células epiteliais e mioblastos - é necessária a atividade da oligopeptidase B (OPB) de *T. cruzi* para a invasão (CALER et al., 2000). Esta serino-peptidase é um agonista de cálcio, requerida para a geração de um fator solúvel que promove o aumento da concentração de cálcio livre no meio intracelular ao se ligar a um receptor, posteriormente ativa a fosfolipase C (BURLEIGH et al., 1997; CALER et al., 2000)). A cisteíno-protease mais abundante no parasito, a cruzipaina, também é necessária para a mobilização de cálcio intracelular. Ela atua sobre o cininogênio ligado à célula, ativando uma cascata que é o gatilho para o influxo de cálcio mediado por IP3 (SCHARFSTEIN et al., 2000).

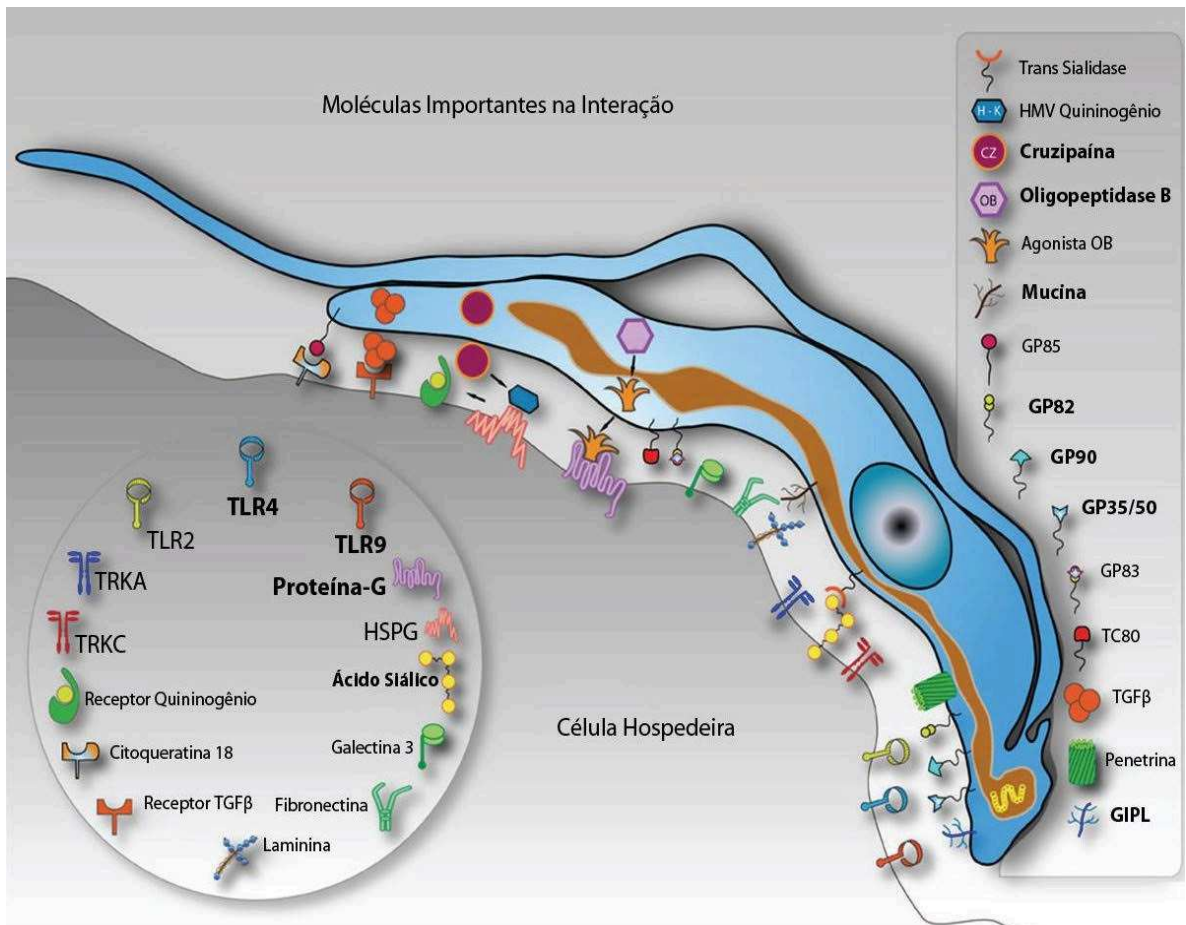


Figura 2: Interação entre *T. cruzi* e célula hospedeira. Modelo esquemático da superfície de uma célula e uma tripomastigota de *T. cruzi* hipotéticas resumindo as moléculas envolvidas na interação parasito-célula hospedeira. Fonte: Adaptado de DE SOUZA; DE CARVALHO e BARRIAS, 2010.

1.4 A INFECCÃO POR *Trypanosoma cruzi* E ATIVAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE

A ativação das células do sistema imunológico tem início através do reconhecimento de Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) do parasita pelos Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs) das células dos mamíferos. Receptores do tipo *toll-like* do complexo TLR-2, TLR-6, TLR-4 e receptores de manose presentes na membrana plasmática da célula reconhecem as moléculas de superfície do parasita (HENRIQUES-PONS; NAGARAJU, 2009). O reconhecimento de glicoproteínas do parasita

(gp82, gp85) por receptores TLR2 desencadeia, em macrófagos, sinalização via Fator Nuclear κ B (NF κ B), (COSTA, et al. 2022). Os receptores intracelulares TLR- 9, TLR-7, NOD-like, helicases RIG-like são responsáveis por reconhecerem estruturas específicas do parasita, como RNA ou DNA genômico, já dentro da célula (DUTRA et al., 2017).

O reconhecimento da infecção por macrófagos e células dendríticas logo nas primeiras horas de infecção induz a produção de citocinas como interleucina IL- 12 e TNF- α por essas células (Figura 3). Essas citocinas ativam as células Natural Killer (NK), que passam a produzir interferon gama (IFN- γ) (TEIXEIRA, 2017). Ao mesmo tempo que as células do sistema imunológico inato respondem a infecção, células apresentadoras de antígeno, particularmente células dendríticas, fazem a ponte entre a imunidade inata e adquirida (JUNQUEIRA et al., 2010). Nesse contexto, o IFN- γ secretado por células NK e linfócitos Th1 ativados também participa do recrutamento de células TCD4+ e TCD8+ (Figura 3), induzindo a expressão local de quimiocinas e moléculas de adesão (NEVES et al., 2015).

A resposta imune adaptativa atua tanto na fase aguda quanto na fase crônica da doença de Chagas, desempenhando um papel de suma importância na resposta a eliminação do parasita no hospedeiro (BRAZ et al., 2015) O *T. cruzi* induz a produção de uma série de citocinas de caráter inflamatório como IFN- γ , IL-12 e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) que caracterizam um perfil de resposta contra o *T. cruzi*. Uma das mais importantes citocinas produzidas é a IL-12, que participa do controle inicial da infecção (MEIRA, 2018). Esta citocina ativa células fagocitárias que destroem os parasitas internalizados pelo aumento da produção de reativos de nitrogênio e oxigênio, ativa células NK que serão responsáveis pela ativação de mais macrófagos, células TCD8+ e anticorpos, através da produção de INF- γ (Figura 03) (HENRIQUES-PONS, A.; NAGARAJU, K, 2009). Já a citocina IL-10 e o fator de transformação do crescimento (TGF- β) possuem papel modulador da ativação da resposta imunológica contra diversos patógenos, ou seja, perfil anti-inflamatório (TEIXEIRA, 2017).

Nos estágios iniciais da infecção as células do sistema imunológico inato (macrófagos, NK, e células dendríticas) produzem citocinas (IL-12, TNF- α e IFN- γ) e moléculas efetoras (reativos intermediários do nitrogênio e GTPases induzidas por IFN- γ) que controlam a replicação do parasito (GANNAVARAM et al., 2016). Ao mesmo tempo células dendríticas, fazem a ponte entre a imunidade inata e adquirida, produzindo citocinas (como a IL-12) necessárias para a diferenciação e expansão clonal de células T CD8+ e de linfócitos B. O IFN- γ produzido pelas células CD4+ Th1 ou T CD8+ ativam a maquinaria efetora em

macrófagos para destruir amastigotas intracelulares (KIMURA et al., 2016). Anticorpos produzidos por células B promovem a lise de formas tripomastigotas ou facilitam a fagocitose de parasitos opsonizados com IgG (Figura 03).

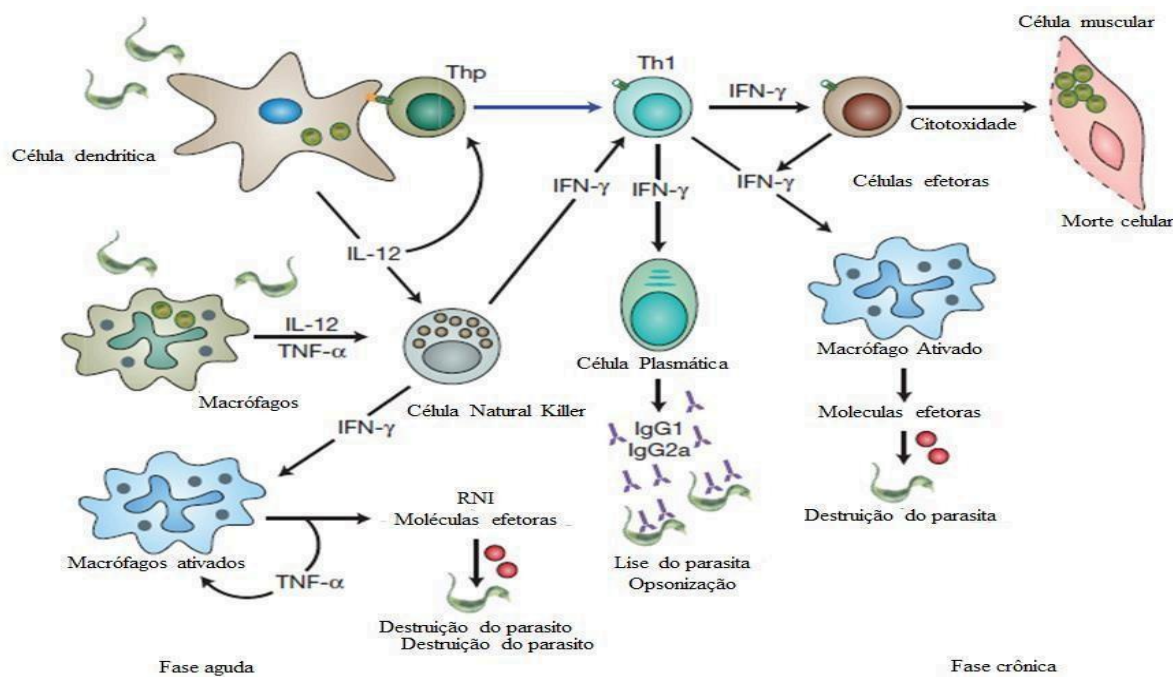


Figura 3: Representação esquemática da resposta imunológica durante a infecção pelo *T. cruzi*. Citocinas e células envolvidas na resposta imune ao protozoário *T. cruzi*. Fonte: Adaptado de JUNQUEIRA et al., 2010.

De fato, no início da resposta adaptativa, a maior parte dos leucócitos mononucleares presentes em infiltrados inflamatórios de tecido cardíaco de animais experimentalmente infectados são linfócitos T CD8⁺ (LEAL DE ARAÚJO et al., 2022). Essas células citotóxicas exercem um importante papel no controle parasitário durante os estágios iniciais da infecção (SILVA et al., 2017). Contudo, na fase crônica da doença a cardiomiopatia chagásica crônica em pacientes é marcada pela presença de infiltrado inflamatório mononuclear rico em células T associado a pouquíssimos parasitos nas lesões cardíacas (PAIVA, 2012).

Adicionalmente, já foi descrito que essas células T reconhecem por reação cruzada a cadeia pesada da miosina cardíaca e possuem um perfil de produção de citocinas Th1, demonstrando envolvimento de resposta auto-imune na cardiomiopatia chagásica (ABRAHAMSOHN, 1998).

Os linfócitos T auxiliares (linfócitos T *helper* Th) desempenham a função de agentes da resposta imunológica via produção de citocinas (ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014). Portanto, a ativação dos macrófagos na fase aguda da infecção, que é essencial para o controle do parasitismo, depende muito do padrão de citocinas que é produzido pelos linfócitos T *helper*, classicamente divididos em padrão Th1 e Th2 (LIU et al., 2023). O tratamento *in vitro* de macrófagos com citocinas associadas ao padrão Th1, como IFN- γ , IL-12 e TNF- α resulta em eficiente ativação dos macrófagos com consequente morte das formas amastigotas intracelulares (FIGURA 3). Por outro lado, o tratamento *in vitro* com citocinas do padrão Th2, tais como o fator TGF- β e IL-10 diminuem a ação tripanocida de macrófagos (ABRAHAMSOHN, 1998). As citocinas do padrão Th2 estão associadas à susceptibilidade do hospedeiro (SILVA *et al.*, 1998) por possuírem propriedades inibitórias sobre a proliferação de células T (caráter anti-inflamatório), redução da expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) e maturação de células dendríticas, necessárias para a resposta à infecção por *T. cruzi* (DUTRA, 2014).

A regulação da resposta imunológica é tão importante quanto a sua eficiência na eliminação do parasito. Algumas evidências apontam para a hipótese de que exista um delicado balanço entre citocinas pró-inflamatórias e citocinas moduladoras derivadas de células T *helper* distintas (equilíbrio Th1/Th2), representando um fator-chave na prevenção de lesão por excesso de inflamação no hospedeiro.

A imunidade humoral também tem sua função na resposta imune ao *T. cruzi*. A importância dos anticorpos produzidos pelos linfócitos B, ativados pelo INF- γ via Th1 (Figura 3), no controle da infecção foi demonstrado através da transferência de soro de camundongos infectados para camundongos sem infecção, que resultou em significativa redução da parasitemia nesses animais. Os anticorpos atuam principalmente fazendo a opsonização do parasito, induzindo assim a sua fagocitose (Figura 3) (KRETTLI, BRENER, 1976; KIERSZENBAU, 1980; JUNQUEIRA et al., 2010). Contudo, os anticorpos gerados na infecção por *T. cruzi* também estão relacionados com aspectos de auto-imunidade observados na patogênese da doença de Chagas (ENGMAN et al., 2015).

O óxido nítrico (NO) é uma espécie de radical livre produzido por meio da ação de isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS), dependentes de NADPH. Os efeitos tripanocidas do NO dependem de sua combinação com outros radicais livres, como o ânion superóxido, produzindo uma espécie altamente reativa denominada peroxinitrito, capaz de ligar-se a estruturas celulares como proteínas e DNA (ABRAHAMSOHN, 1998). A produção

de peroxinitrito pelos macrófagos é capaz de dificultar a motilidade ou até mesmo levar à morte formas tripomastigotas do parasito. Nas formas epimastigotas, o peroxinitrito interfere com o metabolismo energético do parasito. Além disso, esta molécula é capaz de ocasionar a nitração de proteínas do parasito, agindo como um mecanismo antiparasitário (ABRAHAMSOHN, 1998).

Durante a resposta à infecção por *T. cruzi* há intensa produção dos mediadores lipídicos denominados eicosanóides, como leucotrienos e prostaglandinas (MACHADO et al., 2011). Em geral, as células do sistema imunológico contém em sua membrana o ácido araquidônico e, adicionalmente, expressam constitutivamente todas as enzimas necessárias à metabolização desse ácido graxo via enzima 5-lipo-oxigenase (KANAOKA; BOYCE, 2004) e as enzimas ciclo-oxigenases (COX) são as principais enzimas envolvidas com a produção de prostanóides, dentre eles as prostaglandinas, dando atenção especial a prostaglandina E₂. A expressão de COX-1 está envolvida com a homeostase (proteção da mucosa gástrica, regulação do tônus vascular, entre outros), enquanto a COX-2 é induzida principalmente por estímulos inflamatórios, como infecções (ADELLIZI, 1999). No entanto, o papel específico da COX-2 e das outras enzimas da via em contextos de infecção dependem muito do agente infeccioso em questão (GOMEZ et al., 2015). A prostaglandina E₂ (PGE₂), produto final da enzima PGE₂ sintase, possui propriedades pró-inflamatórias (KRAUSE et al., 2009) e também imunossupressoras (VAN DER POWN KRAAN et al., 1995). A PGE₂ também está associada à diminuição da fagocitose por macrófagos e redução da migração de monócitos em resposta a gradientes quimiotáticos (PANZER & UGUCCIONI, 2004; ARONOFF et al., 2004).

A produção de prostaglandinas em altos níveis nos macrófagos diminui a secreção de citocinas pró-inflamatórias, reduzindo também a apresentação de antígenos e a produção de radicais livres nessas células (PUERTOLLANO et al., 2005). Foi mostrado que a inibição farmacológica da enzima COX com aspirina em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c diminui a internalização de tripomastigotas nessas células, com aumento da interleucina-1 β (IL1- β), de óxido nítrico e possivelmente de lipoxinas (HIDEKO et al., 2008).

Além disso, estudos de LOVO-MARTINS et al., (2018) demonstraram o importante papel de estruturas denominadas Vesículas Extracelulares (VEs) no curso da infecção por *T. cruzi*, com impacto na reprogramação metabólica, formação de Corpúsculos Lipídicos (CLs), e aumento de síntese de PGE₂, o que contribui para mecanismos de escape do *T. cruzi* do sistema imunológico do hospedeiro.

1.5. VESÍCULAS EXTRACELULARES: CARACTERIZAÇÃO

Recentemente, o processo de invasão de *T. cruzi* vem sendo relacionado às Vesículas Extracelulares (VEs) liberadas por esses parasitas (CORNET-GOMEZ, 2023). As VEs podem ser secretadas naturalmente ou induzidas por métodos químicos. Essas VEs, liberadas por formas tripomastigotas e amastigotas, podem conter fatores de virulência (antígenos, micro-RNA, dentre outras moléculas) envolvidas na invasão de células hospedeiras e desenvolvimento de parasitas intracelulares, evasão imune, aumento do parasitismo cardíaco, inflamação e arritmia que contribuem para a patogênese da doença de Chagas. Durante a última década, observou-se uma crescente importância nos estudos sobre VEs como mediadoras da comunicação intercelular, parasita-célula do hospedeiro (THÉRY, 2006).

Essas micropartículas, delimitadas por uma bicamada lipídica, são liberadas no espaço extracelular, podendo exercer respostas a distância (THÉRY, 2006). As VEs desempenham importantes funções em vias fisiológicas, no envelhecimento, câncer, doenças infecciosas e complicações da obesidade (THÉRY, 2006). Recentemente, a Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV) define o conceito “Vesícula Extracelular” (VE) como o termo usado para definir partículas naturalmente liberadas pela célula, que são delimitadas por uma bicamada lipídica e que não podem se replicar, ou seja, não contêm um núcleo funcional (THÉRY, 2006).

Dentre as VEs, destacam-se microvesículas (MVs), formadas a partir da membrana plasmática e exossomos, originados de um compartimento intracelular; e corpos apoptóticos (Figura 4), vesículas heterogêneas conhecidas por serem liberadas de células submetidas a processos de morte celular programada apoptótica, sendo alvo de nossos estudos as microvesículas e exossomos (VEs) (VAN DER POL et al. 2012; THÉRY, 2006). Pode-se definir os subtipos de VEs considerando: a) características físicas das VEs, como tamanho ("VEs pequenas" e "VEs médias / grandes") com intervalos definidos [por exemplo, 200 nm (grande) (Figura 5); densidade (baixa, média, alta); b) composição bioquímica (CD63, CD81, anexina V, etc.); c) descrições da célula de origem) (THÉRY, 2006).

As principais populações incluem exossomos, MVs e corpos apoptóticos. Microvesículas, formadas a partir da membrana plasmática, exossomos originados de um compartimento intracelular e corpos apoptóticos, vesículas heterogêneas conhecidas por serem liberadas de células submetidas a processos de morte celular programada apoptótica

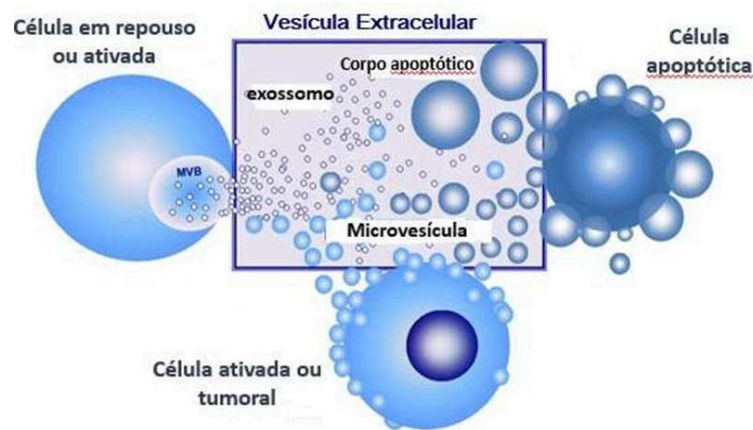


Figura 4: Representação esquemática da origem das vesículas extracelulares. Fonte: Adaptado de Gyorgy, 2011.

Enquanto os exossomos compartilham distribuição de tamanho com vírus, as MVs se sobrepõem em tamanho com bactérias e agregados de proteínas. Tanto os corpos apoptóticos quanto as plaquetas se enquadram na faixa de tamanho de 1–5 μm .

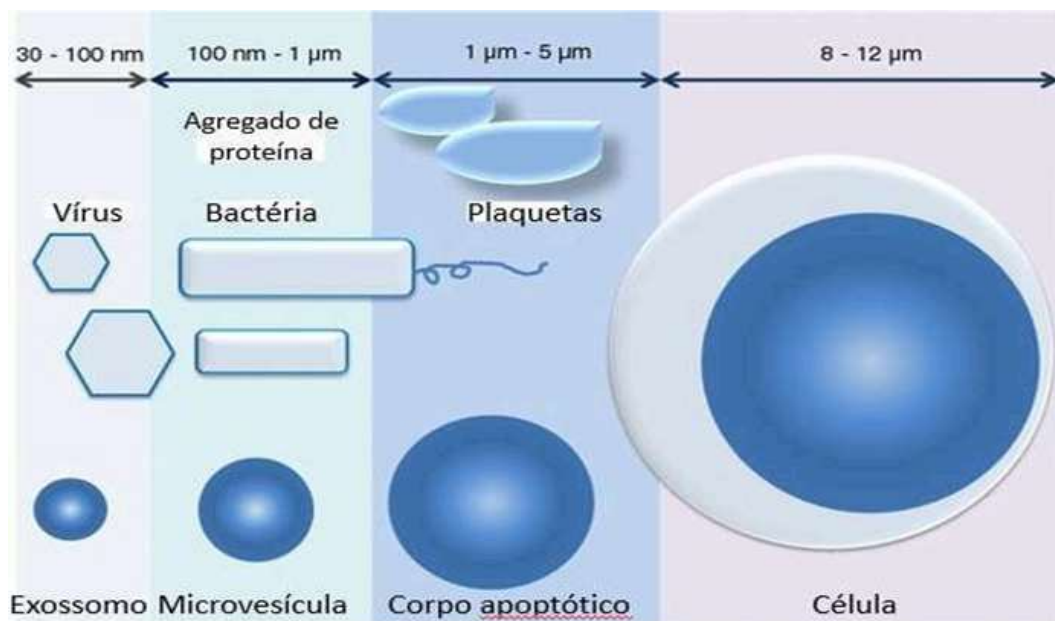


Figura 5: Escalas de tamanho dos principais tipos de vesículas extracelulares. Fonte: Adaptado de Gyorgy, 2011.

MVs são vesículas (100- 1000 nm) cobertas por membrana derivadas de muitos tipos diferentes de células em condições normais e fisiopatológicas (THÉRY, 2006). Muitas células podem liberar microvesículas, incluindo monócitos/macrófagos, adipócitos, reticulócitos e plaquetas, células B células T , células dendríticas, mastócitos células epiteliais e células

tumorais (THÉRY, 2006; RAPOSO G. et al., 2013).

Exossomos (30 a 100 nm) são ricos em tetraspaninas, moléculas de adesão, enzimas, proteínas de ligação a RNA, RNAs, DNAs e glicanos complexos (YOSHIDA, 2006; BAYER-SANTOS et al., 2013). É importante ressaltar que tanto os exossomos quanto as MVs carregam moléculas funcionais capazes de modificar o fenótipo do receptor das células-alvo (VAN DER POL et al. 2012). Os exossomos são preferencialmente endocitados e podem liberar seu conteúdo por fusão com o receptor endossômico num processo chamado *back-fusion* (LINHARES-LACERDA et al., 2015). Mesmo que algumas MVs sejam internalizadas por endocitose mediada por receptor monoacilglicerol fosfato (BMP), sua membrana é desprovida deste receptor. Assim, a fusão entre MVs e a membrana plasmática celular pode representar o mecanismo preferencial de transferência de material para as células receptoras.

Finalizando os tipos de VEs, os corpos apoptóticos são as maiores VEs, variando entre 1 e 5 µm de diâmetro. Os corpos apoptóticos são formados durante a morte celular programada e sinalizam para a fagocitose por macrófagos (Figuras 4 e 5) (AKERS et al., 2013).

As VEs podem interagir com as células alvo do hospedeiro de diversas formas. A interação pode ocorrer de forma direta, resultando na fusão da membrana da VEs com a membrana celular e consequente liberação do conteúdo da vesícula na célula receptora. Outro possível mecanismo é via endocitose da VEs, pela célula com posterior liberação do seu conteúdo. Além disso, a interação pode envolver a ligação a receptores de membrana ou a transferência de receptores das VEs para a célula (MOREL et al., 2004; TURTURICI et al., 2014). A internalização de VEs já foi atribuída também a processos de fagocitose, macropinocitose e internalização mediada por clatrina (FITZNER et al., 2011; TIAN et al., 2014). Quando internalizadas, as VEs permanecem segregadas dentro de endossomos e podem ter dois destinos: a fusão com lisossomos ou a fusão com membrana do endossomo e liberação do conteúdo das VEs no citoplasma celular (MATHIVANA et al., 2010). Além de interagir com células, foi descrito que as VEs podem exercer efeitos sobre a matriz extracelular através da inclusão de metaloproteinases, como MMP-2 e MMP-9 (CANDELA et al., 2010; LOZITO & TUAN, 2012).

1.6. VESÍCULAS EXTRACELULARES DE *Trypanosoma cruzi*

A cada dia mais evidências vem sendo apresentadas sobre a participação de VEs em infecções parasitárias, atuando tanto na comunicação parasita-parasita como na comunicação parasita-célula do hospedeiro (BARTENEVA; MALTSEV; VOROBYEV, 2013). Durante uma infecção parasitária, as VEs liberadas por diversos agentes infecciosos podem agir de diferentes formas, podendo desempenhar uma sinalização a favor do parasita ou de forma contrária, podendo favorecer a resposta do hospedeiro à infecção, dependendo de fatores como a cepa do parasita, do sistema imune do hospedeiro, dentre outros fatores (BARTENEVA; MALTSEV; VOROBYEV, 2013).

Diferentes estudos têm destacado a relação entre o conteúdo das VEs secretadas por *T. cruzi* com a comunicação intercelular, ou seja, relação parasita-hospedeiro (DEOLINDO et al., 2013; MARCILLA et al., 2014; SCHOREY & HARDING, 2016). As VEs liberadas por um determinado parasita podem ter efeitos ambíguos, elas podem carregar moléculas originadas do patógeno capazes de ativar mecanismos da resposta imunológica e induzir defesa e imunidade do hospedeiro, ao mesmo tempo, podem desencadear mecanismos favoráveis ao patógeno, promovendo sua permanência e evasão do sistema imunológico (D'AVILA, 2021)

O conteúdo das VEs, reflete a célula de origem, isso inclui proteínas citosólicas e de superfície celular, ácidos nucleicos, lipídios e metabólitos (Figura 06). As VEs medeiam a comunicação intercelular numa grande variedade de processos biológicos durante a homeostase e em condições patológicas, onde atuam como entidades mensageiras que entregam carga específica às células receptoras, alterando assim o seu estado fisiológico (D'AVILA, 2021).

Após análises proteômicas de conteúdo das VEs de *T. cruzi*, foram identificadas centenas de proteínas diferentes presentes nestas estruturas (Figura 6). Dentre elas, proteínas envolvidas na interação parasita-hospedeiro, sinalização, transporte, vias de óxido-redução e vias de metabolismo de carboidratos (BAYER-SANTOS et al., 2013). De fato, as VEs secretadas por *T. cruzi* apresentam proteínas normalmente associadas a membrana do parasita como proteína flagelar ligadora de cálcio (FCaBP), glicoconjugados α -galactosil, GP35/50 e glicoproteínas da superfamília das gp85/transialidades. (BAYER-SANTOS et al., 2013). Essas estruturas tem um importante papel para o processo de adesão do parasita à célula hospedeira,

e talvez tenham funções semelhantes nas VEs (YOSHIDA, 2006). Também componentes com atividades de fosfatases ácidas e alcalinas, relacionados à adesão e infecção do parasita, foram encontrados em VEs de *T. cruzi* (NEVES et al., 2014). Além do estágio do ciclo de vida do parasita, a cepa do *T. cruzi* representa outro fator relevante para a composição das VEs. NOGUEIRA et al., (2015), relataram a presença de diferentes proteínas em VEs obtidas das cepas Y, Colombiana, CL-14, e Yu Yu de *T. cruzi*, especialmente em relação a glicoconjugados α -galactosil.

Vários estudos proteômicos identificaram fatores de virulência de *T. cruzi* em VEs isoladas de formas tripomastigotas de *T. cruzi*, como trans-sialidases, mucinas, proteínas MASP, a protease cruzipaina, fosfatases, TcSMP e TcTASV (MARTINS et al., 2015). Outras moléculas que podem ser encontradas em VEs tripomastigotas são proteínas de sinalização, peptidases, proteínas de oxidação/redução, ATPases, proteínas de transcrição e síntese de proteínas, enzimas metabólicas, proteínas do citoesqueleto, proteínas de ligação a ácidos nucleicos, proteínas de choque térmico e chaperonas, membros da família RAB GTPase e RNA, entre outros (SRIKANTH; WOO; GWACK, 2017).

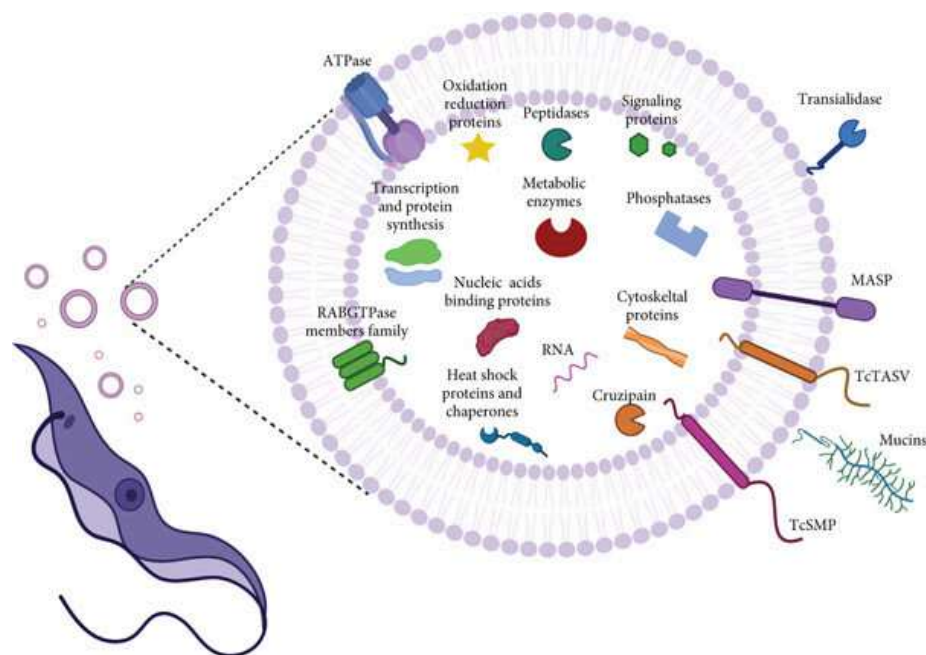


Figura 06: Moléculas identificadas em vesículas extracelulares secretadas por tripomastigotas de *T. cruzi*. Ilustração esquemática das moléculas identificadas em vesículas extracelulares secretadas por tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Fonte: Adaptado de CORTÉS SERRA et al., 2022.

Essas moléculas funcionais existentes nas VEs do *T. cruzi* fazem parte do mecanismo de comunicação intercelular parasita-parasita ou parasita-célula do hospedeiro, mudando o fenótipo da célula alvo a favor do parasita.

Em 1979 foi demonstrado pela primeira vez a liberação de VEs por *T. cruzi* no trabalho de Da Silveira et al (1979). Estes conseguiram mostrar a secreção de VEs ricas em glicoconjugados por epimastigotas de *T. cruzi*, tanto pelo corpo celular do parasito quanto pela bolsa flagelar. Mais de uma década depois esse tipo de secreção foi reportado em tripomastigotas derivados de cultivo celular (OUAISSI et al., 1986) sendo descrito como um fenômeno espontâneo dependentes de temperatura e tempo, e não influenciado pela presença de proteínas ou soro no meio de cultivo (GONÇALVES et al., 1991).

Proteínas presentes nas VEs liberadas pelo *T. cruzi* são capazes de estimular a resposta imunológica em camundongos, sem no entanto, gerar uma resposta protetora efetiva (PEREIRA, 2018). De Pablos *et al.* (2016) descreveram que regiões C-terminais das proteínas MASPs (proteínas de superfície associadas à mucina) presentes em subpopulações de VEs liberadas por *T. cruzi* que são capazes de estimular uma rápida resposta humoral em camundongos BALB/c, com produção de IgM logo após a infecção sem, no entanto, uma eficiente mudança de classe para a produção de IgG. Dessa forma, a presença dessas regiões C-terminais das proteínas MASPs em VEs de *T. cruzi* estão associadas com a evasão do parasita à resposta imunológica do hospedeiro.

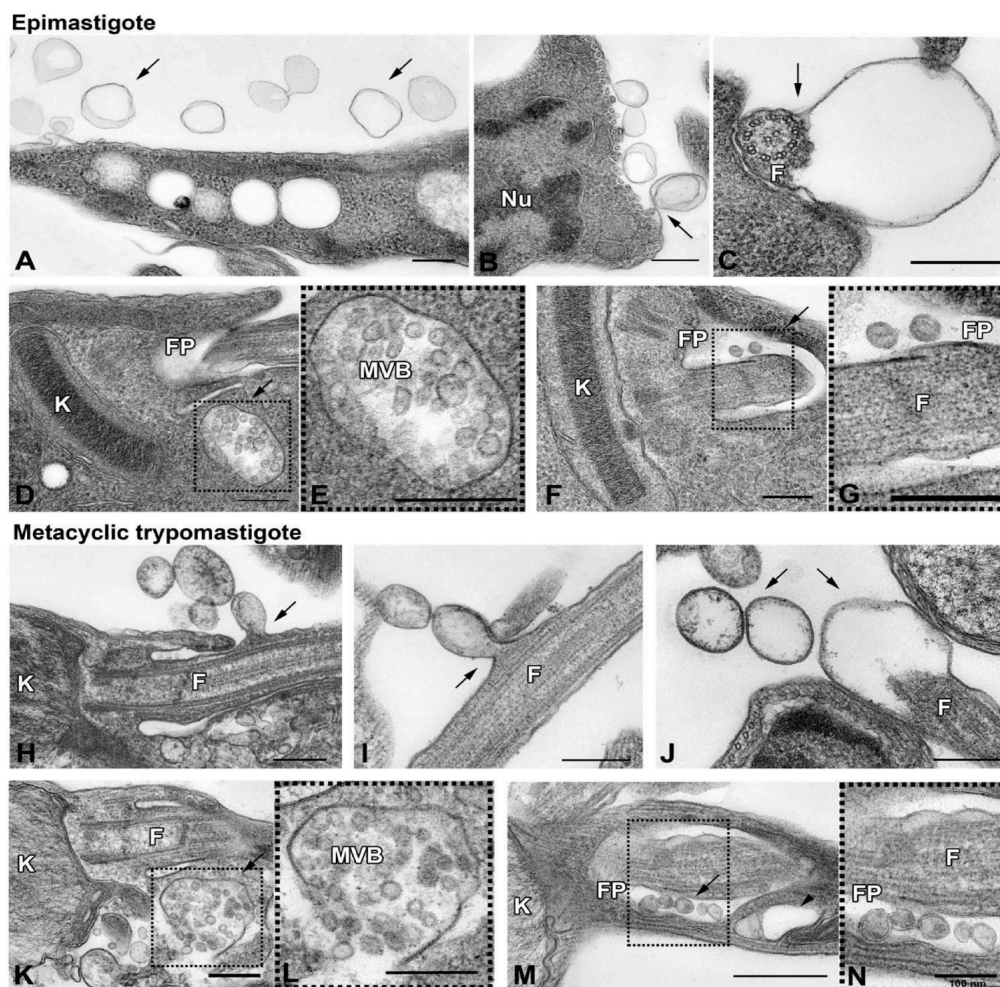


Figura 7: Vesículas extracelulares de *T. cruzi*. Através de imagens de microscopia eletrônica de transmissão de formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos (Figura 07) foram demonstradas formas epimastigotas liberando vesículas da membrana plasmática (A-C) e MVB próximos a bolsa flagelar (D e E), contendo pequenas vesículas no seu interior (F e G). Foi visualizado também formas tripomastigotas metacíclicos liberando vesículas a partir da membrana plasmática (H-J) e MVBs próximos a bolsa flagelar (K e L), contendo pequenas vesículas dentro (M e N). Pontas de flechas indicam uma grande vesícula vazia próximo a bolsa flagelar que pode ter sido resultante de exocitose de MVBs. Barra de escala = 250 nm, exceto para imagem N (=100 nm). N= núcleo, K= cinetoplasto, F= flagelo, Fp = bolsa flagelar, MVB = corpos multivesiculares. Fonte: Adaptado de BAYER-SANTOS et al., 2014.

Além disso, VEs liberadas por células do hospedeiro infectadas por *T. cruzi* desempenham funções imunomoduladoras a favor do parasita, dependendo do tipo de cepa do parasita, do sistema imune do hospedeiro, dentre outros fatores. (PEREIRA, 2018),

demonstraram que tripomastigotas metacíclicos infectam células sanguíneas e rapidamente induzem a liberação de VEs por essas células.

Em infecções por *T. cruzi*, um mecanismo potencial da persistência da parasitemia é a liberação de VEs, que participa da comunicação intracelular por transportar moléculas funcionais que sinalizam às células do hospedeiro e podem modular a resposta imune por meio da indução da formação de CLs (LOVO-MARTINS et al. 2018; D'AVILA et al. 2021). Através do aumento da produção de CLs ocorre um aumento na produção de PGE₂ que irá modular a resposta imunológica do hospedeiro a favor do parasita, aumentando sua sobrevivência.

1.7 MODULAÇÃO DO METABOLISMO LIPÍDICO DO HOSPEDEIRO DURANTE A INFECÇÃO POR *T. cruzi*

Estudos experimentais relacionados à Doença de Chagas demonstraram uma forte resposta imunológica na fase aguda da doença, com a presença de macrófagos ativados, produção de citocinas e outros mecanismos a fim de controlar a infecção e eliminar o parasita (GAZZINELLI & DENKERS, 2002). Outro fato observado na Doença de Chagas é o aumento da produção de organelas citoplasmáticas denominadas de corpúsculos lipídicos (CLs) produzidos por diferentes tipos celulares durante a resposta à infecção (Figura 07) (D'AVILA et al. 2021; FREIRE-DE-LIMA et al., 2000).

Os CLs são organelas ricas em lipídeos que podem ser encontradas em células de todos os seres vivos desde bactérias a células de mamíferos (COSTA et al., 2006). Essas organelas já foram visualizadas em diversos tipos de leucócitos, fibroblastos, mastócitos, células endoteliais (COSTA et al., 2006) e podem estar envolvidas em inúmeras funções como produção de mediadores inflamatórios, tráfego de membrana, sinalização celular e metabolismo lipídico (COSTA et al., 2006) (Figura 7).

Na figura 08 vemos o acúmulo de CLs (em verde) corados por BODIPY R 493/503 (A), em macrófago murino infectado com *T. cruzi*. O núcleo do macrófago e os parasitos internalizados foram corados por DAPI (40,6-diamidino-2-fenilindol) em azul. Em (B) vemos uma representação esquemática da composição estrutural de um CL. Em cor, as proteínas de superfície do CL. Prostaglandina E2 (PGE) 2, ácido araquidônico (AA), diacilgliceróis (DAG), triacilgliceróis (TAG) e ésteres de colesterol (CE) que são encontradas no núcleo lipídico

neutro. Em (C) vemos uma micrografia eletrônica mostrando um CL na forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*.

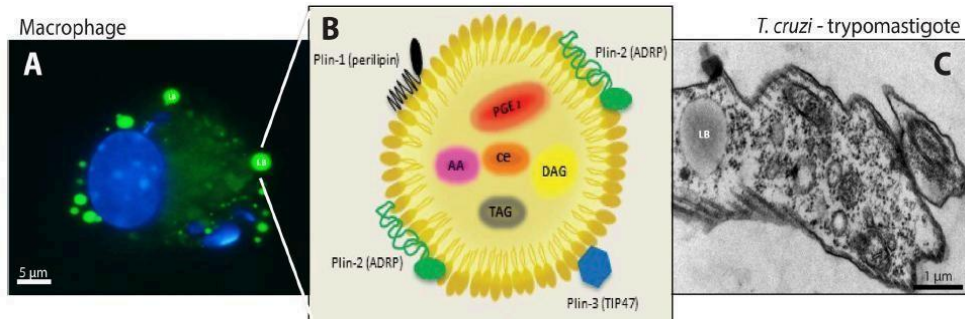


FIGURA 08 - Representação da estrutura de CLs por microscopia de fluorescência e eletrônica de transmissão. CLs (em verde) corados por BODIPY R 493/503 (A), em macrófago murino infectado com *T. cruzi*. O núcleo do macrófago e os parasitos internalizados foram corados por DAPI (40,6-diamidino-2-fenilindol) em azul. Em (B) vemos uma representação esquemática da composição estrutural de um CL. Em cor, as proteínas de superfície do CL. Prostaglandina E2 (PGE) 2, ácido araquidônico (AA), diacilcilicóis (DAG), triacilgliceróis (TAG) e ésteres de colesterol (CE) que são encontradas no núcleo lipídico neutro. Em (C) vemos uma micrografia eletrônica mostrando um CL na forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*. Fonte: ALMEIDA P.E.; et al., 2018.

A estrutura de um CL consiste basicamente em um núcleo de lipídeos neutros contendo triacilgliceróis (TAG) e éster de colesterol (CE) e envoltos por uma monocamada de fosfolipídeos (Figura 8), (DE LIMA, 2006).

Os CLs são organelas que tem a característica de se conectar com vários compartimentos celulares (DE LIMA, 2006). Existem várias proteínas descritas que estão presentes nos CLs, como as perilipinas (PLINs), enzimas biossintéticas de triacilglicerol (TAG), proteases transmembranares (FIT 1 e FIT 2) e SEIPINA, entre outras. As enzimas denominadas de aciltransferases 1 e 2 (DGAT 1 e DGAT 2) participam do armazenamento do TAG (CHITRAJU et al., 2023). Essas proteínas atuam coletivamente na membrana do retículo endoplasmático (RE) auxiliando na formação do CL.

Os triacilgliceróis (TAG) são sintetizados e se acumulam no interior da bicamada lipídica na membrana do retículo, emergindo-se para a superfície do RE em direção ao citoplasma com auxílio da FIT 2 (CHITRAJU et al., 2023). As proteínas FIT representam um grupo de proteínas que tem como papel facilitar o brotamento dos CLs nas células

(CHOUDHARY et al., 2019).

Já a SEIPINA tem um papel na biogênese das gotículas e também são importantes para a manutenção do contato dos CLs com o RE (SHPILKA & ELAZAR, 2015). Outro papel da SEIPINA consiste em auxiliar o tráfego de lipídeos em direção às gotículas (SHPILKA & ELAZAR, 2015). O brotamento do CL é determinado por uma tensão superficial local das membranas do RE (SHPILKA & ELAZAR, 2015).

Vários estudos vem demonstrando o aumento significativo do número e diâmetro dos CLs em macrófagos infectados por *T. cruzi* e no próprio protozoário em contato com a célula hospedeira (D'AVILA et al., 2021).

Os mediadores lipídicos como PGE₂ tem potencial de inibir a resposta do linfócito T helper tipo 1 (TH1) modulando dessa forma o crescimento e a sobrevivência do parasito (NASCIMENTO et al., 2020). Diversos trabalhos vêm ressaltando que os CLs favorecem a replicação do microorganismo, seja enfraquecendo a ação imunológica do hospedeiro, seja interagindo e fornecendo a matéria prima para produção das moléculas lipídicas do próprio parasita favorecendo sua sobrevivência no hospedeiro (VALLOCHI.; TEIXEIRA; OLIVEIRA; MAYA-MONTEIRO *et al.*, 2018) (Figura 9).

Assim neste trabalho, pretendemos elucidar o impacto das associações entre VEs produzidas por formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* na ativação das células C2C12, focando na modulação da produção do metabolismo lipídico através da análise de CLs e do perfil da resposta inflamatória através da análise de citocinas.

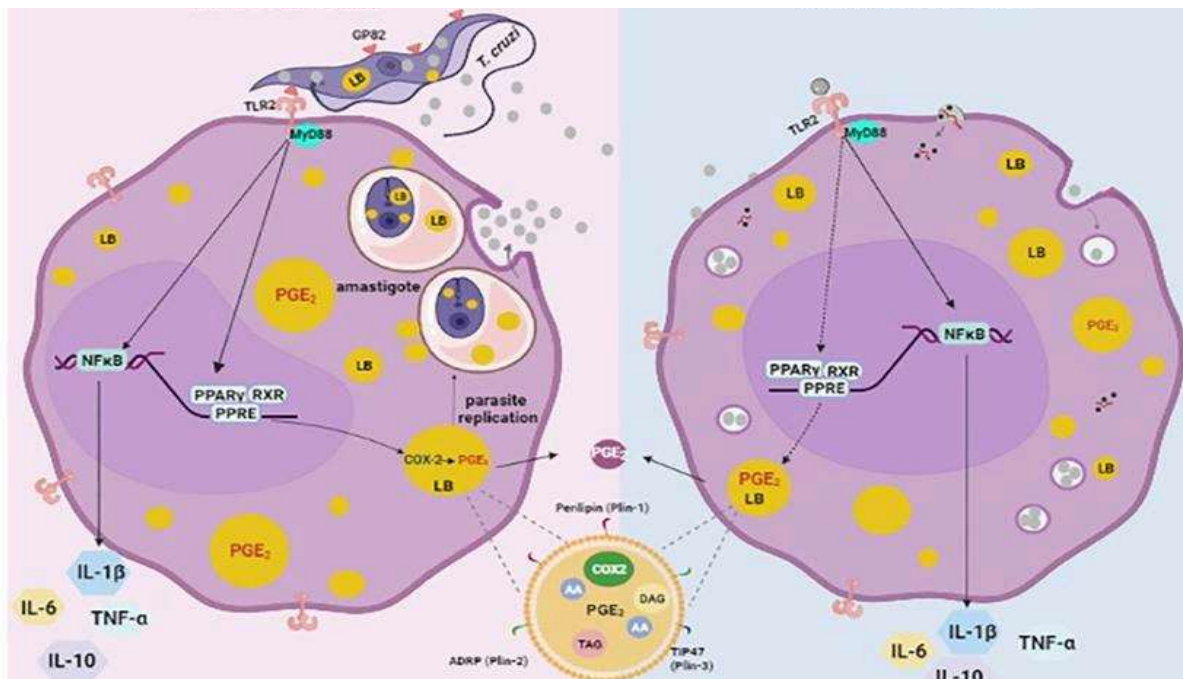


Figura 09: Interações entre *T. cruzi*, VEs e a célula do hospedeiro e o impacto do metabolismo lipídico. *T. cruzi* induz a formação de corpúsculos lipídicos (LBs) em macrófagos, e o PGE₂ gerado nesses LBs favorece a replicação dos amastigotas e a liberação de vesículas extracelulares (EVs). Essas EVs, junto com as do *T. cruzi* (EVsT), ativam macrófagos via TLR2, promovendo mais formação de LBs e PGE₂. A ativação de PPAR-γ altera o metabolismo lipídico, enquanto o PGE₂ suprime a resposta imune (reduz TNF-α e IL-6, aumenta IL-10), enfraquecendo a função microbicida do macrófago. NF-κB também regula citocinas nesse processo. Fonte: Adaptado de D'AVILA *et al.*, 2021

2. JUSTIFICATIVA

Apesar de existirem diversos estudos sobre o papel/função das interações entre VEs e células do hospedeiro na doença de Chagas, pouco se sabe sobre o impacto das VEs provenientes de patógenos na regulação do metabolismo lipídico e produção de citocinas nestas células. Desse modo, ao compreender melhor tais mecanismos, será possível o entendimento de como infecções causadas por patógenos intracelulares, como o *T. cruzi*, podem ser favorecidas e/ou controladas por fatores metabólicos/inflamatórios endógenos, buscando, assim, terapias mais eficazes no controle de doenças como as causadas por patógenos intracelulares.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Compreender o papel modulador das VEs obtidas a partir das formas tripomastigotas de *T. cruzi* no processo de ativação das células C2C12, com foco no metabolismo lipídico e resposta inflamatória *in vitro*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

(I) Quantificar e caracterizar as VEs liberadas por formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

(II) Avaliar a biogênese de CLs em células C2C12 estimuladas com VEs originadas de *T. cruzi* e infectadas ou não com *T. cruzi in vitro*.

(III) Analisar a síntese de citocinas tanto de perfil pró-inflamatório (IL-12, IL-6, TNF- α) quanto anti-inflamatório (IL-10) em células C2C12 estimuladas com VEs de *T. cruzi* e infectadas ou não com *T. cruzi in vitro*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ISOLAMENTO DE VEs ORIGINADAS DE FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE *T. cruzi* *in vitro*

O isolamento das VEs foi realizado por centrifugação diferencial do sobrenadante obtido após a diferenciação das formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas da cepa de *T. cruzi* DM 28c. Todas as centrifugações e procedimentos foram realizados a 4 ° C para minimizar a degradação de proteínas e das VEs. Todo o conteúdo da garrafa onde se encontram as formas tripomastigotas foi pipetado e colocado em um tubo Falcon e logo após centrifugada a 3500 X g por 15 minutos a 4 graus celsius (centrífuga Multispeed ThermoScientific IEC CL31R, rotor T41 * 11210435). O pellet resultante (precipitado) foi congelado e o sobrenadante colocado em novo tubo Falcon. Após a obtenção deste sobrenadante, ele foi centrifugado a 1.700 X g por 30 minutos a 4 graus Celsius. Logo após a centrifugação, o sobrenadante obtido foi colocado em um novo tubo Falcon. O sobrenadante foi então submetido ao processo de ultracentrifugação (Théry e colaboradores, 2006) a 110.000 X G por 02 horas a 4 graus Celsius (Ultracentrífuga Beckman Coulter Optima L-100XP). Após a Ultracentrifugação, o sedimento contendo VEs foi cuidadosamente ressuspensão (Figura 08). O pellet foi então aliquotado a cada 50 µl e armazenado a -80°C ou -4°C, para posterior análise do material. Tal procedimento foi realizado em triplicata.



SOBRENADANTE

↓3.500g x 15 min x 4°C

SOBRENADANTE

↓1.700g x 30 min x 4°C

SOBRENADANTE

↓ 110.000g x 02 horas x 4°C

PELLETS 50 ul



Figura 10 – Representação esquemática do processo de extração de vesículas extracelulares.

4.2 ESTÍMULO DE CÉLULAS DA LINHAGEM CELULAR C2C12 COM VESÍCULAS EXTRACELULARES DE *T. cruzi*

O estímulo foi feito adicionando-se as VEs (50 ug/ml e 100 ug/ml, concentrações estas padronizadas a partir de trabalhos anteriores de nosso grupo). Utilizamos também formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa DM28C. Foi utilizada uma placa, onde os poços foram plaqueados com células da linhagem celular C2C12, sendo que foram estabelecidos os grupos controle (CT), poços em que só haviam células C2C12, grupo VE50 onde as células C2C12 foram sensibilizadas com 50 ug/ml de VEs, grupo VE100, células C2C12 sensibilizadas com 100 ug/ml de VEs, grupo onde as células foram sensibilizadas com *T. cruzi* (MOI 3:1) (TC) e por último os grupos onde as células foram sensibilizadas com 50 ou 100 ug de VEs mais o *T. cruzi* (TC + VE50 e TC + VE100).

Primeiramente plaquemos as células C2C12, deixamos por um período de 16 horas em estufa de CO₂ para adesão. Utilizou-se a concentração de 1×10^6 células/poço, previamente calculada através da utilização de uma câmara de NEWBAUER.

Após o período de adesão o sobrenadante foi retirado e as placas submetidas à lavagem com PBS. Após a lavagem coloca-se o meio novamente e logo após adiciona-se o *T. cruzi* nos poços. Após 24 horas retira-se novamente o sobrenadante e adiciona-se as VEs (50 e 100 ug/ml). No último dia (24 horas depois), o sobrenadante foi retirado para a dosagem de citocinas e as células fixadas na placa foram coradas com ORO para a contagem de CLs.

4.3. OBTENÇÃO E CULTURA DE *T. cruzi*

A Cultura do *T. cruzi* (cepa DM28c) foi obtida e mantida em laboratório como descrito em (MOREL et al., 2004). As culturas de *T. cruzi* foram crescidas e mantidas em Meio de Infusão de Coração e Cérebro suíno (Brain Heart Infusion Medium – BHI) (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) a 27°C em uma estufa B.O.D (Biochemical Oxygen Demand) (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) por 7 dias, contendo aproximadamente 100% de epimastigotas. No final da fase exponencial de crescimento, os parasitas foram centrifugados a 2200 rpm por 15 minutos a 10°C, ressuspendidos em meio que simula a Urina Artificial de Triatomínio (TAU) (NaCl 190 mM, tampão fosfato 8 Mm pH 6.0, KCl 17 mM, CaCl₂ 2 mM,

MgCl₂ 2 mM), e incubados por 2 h à temperatura ambiente. Os parasitas foram diluídos em TAU suplementado com bicarbonato de sódio 1,4%, 2,5% (v/v), 500 unidades de penicilina (mL), 10 mM de L-prolina (meio TAU-P) e incubados a 27°C em garrafas de cultura na incubadora B.O.D por 5 dias, obtendo assim aproximadamente 100% de tripomastigotas metacíclicos, para posterior isolamento das VEs, utilizando a metodologia citada.

4.4. COLORAÇÃO COM OIL RED O E CONTAGEM DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS

As lamínulas circulares de 13mm, foram submetidas à coloração com Oil-Red-O. A solução estoque de OilRed O (Sigma Aldrich) foi preparada utilizando-se a concentração de 0,3% (0,3 g de OilRed O/ 100 mL de isopropanol [ácido isopropílico), filtrada e acondicionada em temperatura ambiente. Para a execução da coloração, a solução de uso foi preparada diluindo-se a solução estoque em água destilada na proporção 3:2. Após a conclusão da diluição, a solução foi novamente filtrada e utilizada para a coloração de CLs, na própria placa de cultura adicionando-se 300 µl da solução de uso de Oilred O, e incubando por 5 minutos, no escuro. Decorrido o tempo, as células foram lavadas em sequência 2 vezes com água destilada, isopropanol 30% e PBS 1%. As lamínulas foram montadas com meio de montagem contendo DAPI (VECTASHIELD® mountingmediumcontaining DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) para a marcação do núcleo das células. Os CLs foram contados em 50 células consecutivas após análise em microscópio de fluorescência BX-51 acoplado com câmera digital XC-50, sob objetiva de 100x (Olympus, Tokyo, Japan).

4.5. AQUISIÇÃO DE IMAGENS

As imagens foram capturadas a partir das lâminas confeccionadas para a análise quantitativa e qualitativa quanto à biogênese de corpúsculos lipídicos e morfologia celular das células C2C12. As imagens foram processadas por meio do programa CellSens Dimension, em microscópio de fluorescência Olympus DP73, no aumento de 20x ou 100x.

4.6. DOSAGEM DE PROTEÍNAS

Quantificação de proteínas das VEs foi realizada pelo espectrofotômetro NANODROP, que utiliza o espectro completo de 220 a 750 nm, utilizando 1 a 2 ul de amostra. O sistema de retenção utiliza a tensão superficial para posicionar a amostra entre duas fibras ópticas. Em cada experimento foram utilizadas 03 alíquotas (Pellets) para serem submetidos à dosagem da concentração de proteínas. Após a dosagem, os valores obtidos serviram de base para a padronização da concentração de VEs a serem utilizadas na interação com as células C2C12.

4.7. DOSAGEM DE CITOCINAS

Os níveis das citocinas IL-12, IL-6, IL-10, TNF- α , foram detectados no sobrenadante das células C2C12 dosados pela técnica de ELISA segundo o protocolo oferecido pela fabricante (R&D Systems). A quantificação foi mensurada a partir das curvas padrão proveniente da diluição sugerida no kit (R&D). A leitura foi realizada em 450 nm utilizando o programa Softmax Pro.

5. RESULTADOS

5.1 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS REFERENTES ÀS VEs PURIFICADAS

Após a obtenção e purificação das VEs das formas tripomastigotas metacíclicas da cepa de *T. cruzi* DM28c, o material obtido foi separado em pellets e congelados a -80°. Este procedimento foi estabelecido nos 02 experimentos. Foram escolhidos aleatoriamente 03 pellets com 50 ul de amostra de cada experimento, denominando os pellets de 01 a 06, sendo que todos foram padronizados em duplicata e logo depois submetidos à dosagem de proteínas realizada por NANODROP (Rockford, USA). As concentrações totais obtidas em cada amostra encontram-se nas duas tabelas abaixo (Tabelas 01 e 02). A partir das concentrações encontradas e trabalhos anteriores do grupo, padronizamos as concentrações de uso das VEs em 50 e 100 ug/ml, para os experimentos de interações com a linhagem celular C2C12 de mioblastos.

As tabelas representam 02 (n=2) experimentos diferentes de extração de VEs dos sobrenadantes de culturas de formas tripomastigotas de *T. cruzi* cepa DM28c. As análises dos Pellets de 01 a 06 (em duplicata) correspondem ao material obtido nos respectivos experimentos com suas respectivas concentrações de proteínas, dosadas no NANODROP. A temperatura indica onde o sobrenadante contendo as VEs ficou acondicionado antes da dosagem de proteínas no freezer -80.

TABELA 01 / EXPERIMENTO 01

AMOSTRA	TEMPERATURA	mg/ml	µg/ml
PELLET 1	-80	0,024	24
PELLET 1	-80	0,030	30
PELLET 2	-80	0,034	34
PELLET 2	-80	0,028	28
PELLET 3	-80	0,027	27
PELLET 3	-80	0,030	30

TABELA 02 / EXPERIMENTO 02

AMOSTRA	TEMPERATURA	mg/dl	ug/ml
PELLET 4	-80	0,019	19
PELLET 4	-80	0,018	18
PELLET 5	-80	0,028	28
PELLET 5	-80	0,024	24
PELLET 6	-80	0,031	31
PELLET 6	-80	0,032	32

Tabelas 01 e 02. Dosagem de proteínas em VEs.

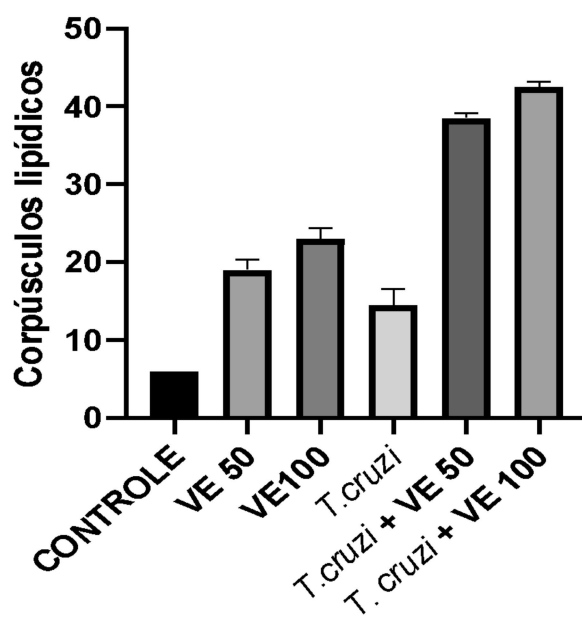
5.2. ANÁLISE DA BIOGÊNESE DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS EM CÉLULAS C2C12 ESTIMULADOS COM VEs ORIGINADAS DE *T. cruzi* E INFECTADAS OU NÃO COM *T. cruzi*.

Foi avaliada a biogênese de CLs em células C2C12 após a interação com VEs em diferentes concentrações e infectadas ou não com *T. cruzi*. Verificou-se que após a interação das VEs (VE 50ug e VE 100ug) ocorreu uma modulação positiva na formação de CLs em relação ao controle (células não estimuladas e não infectadas). Esta modulação foi potencializada quando estimulamos as células com as VEs nas diferentes concentrações, juntamente com a infecção com o *T. cruzi* (Figura 10 A). Além disso, essa indução parece ser dose-dependente onde a dose de 100 ug/ml apresentou um maior aumento das estruturas tanto nos estímulos só com VEs, quanto nas células estimuladas com VEs e infectadas com *T. cruzi*. As análises de morfologia foram obtidas através da contagem de 50 células consecutivas (Figura 11B) após análise em microscópio de fluorescência. Na figura 10 B podemos observar a morfologia e a marcação dos CLs (setas brancas) frente aos diferentes estímulos. Não houve análise de estatística, n=2.

Na quantificação de CLs os estímulos utilizados foram VE50 e VE100 (concentrações de VEs em ug/ml), Controle, *T. cruzi*, *T. cruzi* + VE50 e *T. cruzi* + VE100 (Figura 10 A). Analisamos também a formação dos CLs (setas brancas) em células C2C12 estimulados ou não com VEs e infectados ou não por *T. cruzi* (24 h) (Figura 10 B). O estímulo com VEs é indicado por VE 50 e VE 100 referente as concentrações usadas. As imagens foram obtidas por microscópio de fluorescência e a análise da formação de corpúsculos lipídicos foi feita

após coloração com Oil Red O, contra-coloração do núcleo com DAPI. As análises foram realizadas em microscópio de fluorescência Olympus BX-51 acoplado com câmera digital XC-50, sob objetiva de 100x (Olympus, Tokyo, Japan).

A)



B)

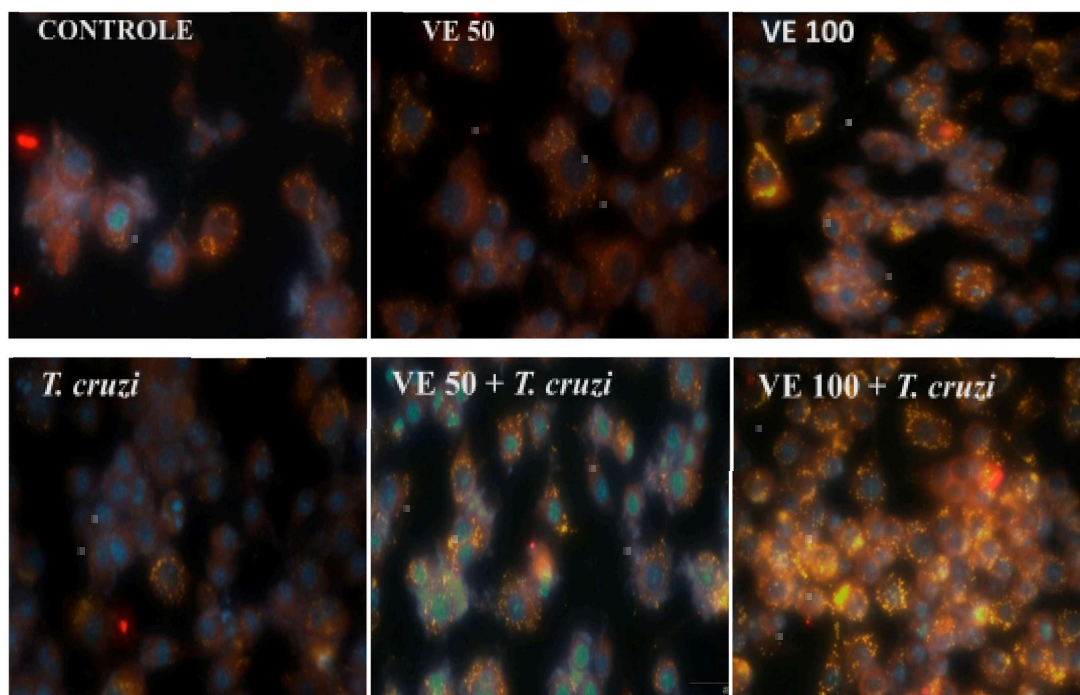


Figura 11 A e B: Análise da biogênese de corpúsculos lipídicos em células C2C12 estimuladas com diferentes concentrações de VEs originadas de *T. cruzi* e infectadas ou não com o *T. cruzi*. (n=2).

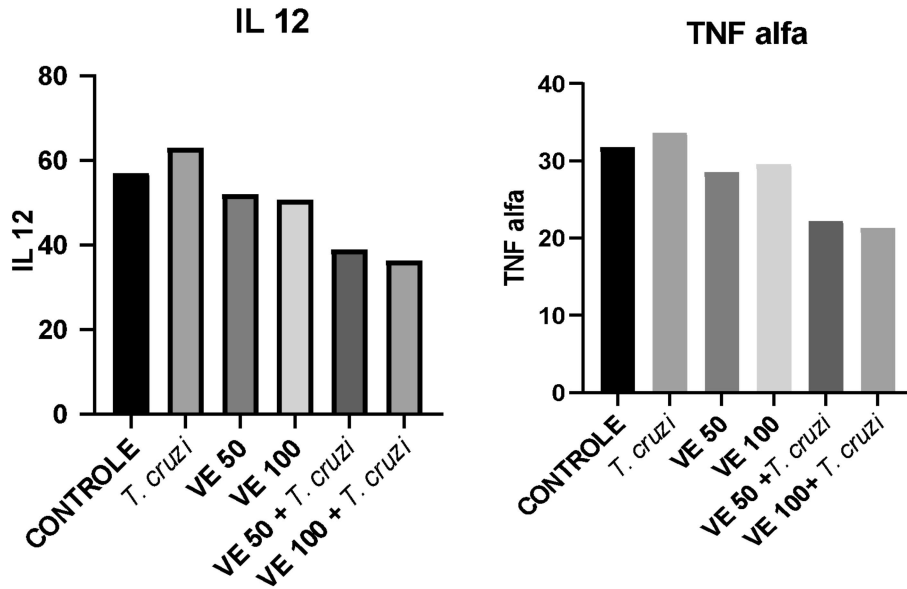
5.3. ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM CÉLULAS ESTIMULADAS COM VEs ORIGINADAS DE FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE *T. cruzi* E INFECTADAS OU NÃO COM *T. cruzi* APÓS 24 HORAS.

As análises da secreção de citocinas tanto de perfil pró-inflamatório quanto anti-inflamatório foi realizada nos sobrenadantes das culturas celulares após 24 de interação e/ou infecção. Apesar de só termos resultados referentes a dois experimentos, verificou-se que após a interação somente com as VEs em ambas concentrações ocorreu uma diminuição na concentração das citocinas de perfil pró-inflamatório (Figura 11 A, B e C) como a IL-12, TNF- α , e IL-6, em relação ao controle. Além disso, o estímulo com as VEs juntamente à infecção com *T. cruzi* parece potencializar esse perfil de redução da produção destas citocinas pelas células C2C12. Entretanto, já para a citocina IL-10 (Figura 11D), a qual apresenta um perfil anti-inflamatório, de modo interessante os dados mostram um sugestivo aumento dessa citocina, após a interação com as duas concentrações de VEs, sendo tal efeito potencializado

após o estímulo das VEs (50ug e 100ug) juntamente com a infecção pelo *T. cruzi* (Figura 11D).

A)

B)



C)

D)

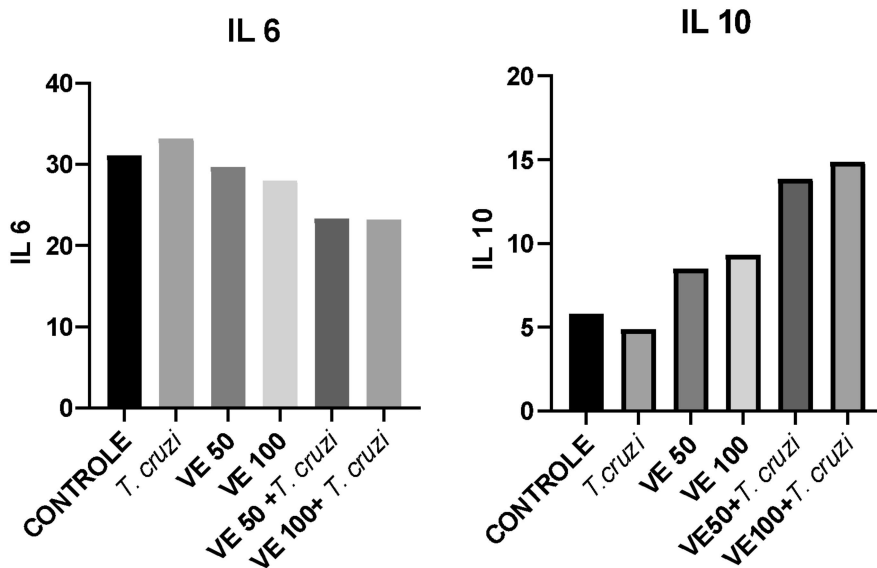


Figura 12 A, B, C, e D. Análise da produção de citocinas em células C2C12. As dosagens foram realizadas nos sobrenadantes das culturas celulares após 24 h de estímulos. As citocinas foram dosadas através da técnica de ELISA. A quantificação foi mensurada a partir das curvas

padrão proveniente da diluição realizada. A leitura realizada em 450 nm utilizando o programa Softmax Pro.

6. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, diversos estudos têm evidenciado o papel das VEs no curso de infecções causadas por patógenos intracelulares, incluindo o *T. cruzi*. Entretanto, os mecanismos celulares e moleculares que mediam a ativação das células hospedeiras pelas VEs do *T. cruzi* ainda são pouco compreendidos (LOVO-MARTINS et al., 2017). Assim, este trabalho traz como contribuição um melhor entendimento sobre como essas interações podem modular o metabolismo lipídico e a resposta inflamatória *in vitro*, através da análise de CLs e do estudo da produção de citocinas.

Neste estudo, o estímulo das células C2C12 com VEs em diferentes concentrações (50 e 100 µg/mL) revelou um aumento na formação de CLs. Esse aumento foi mais acentuado quando as células foram co-infectadas com *T. cruzi* durante 24h. Esses achados corroboram com os resultados descritos por LOVO-MARTINS et al. (2019), que também relataram a capacidade das VEs em induzir a formação de CLs. Esse fenômeno reflete o papel das VEs como mediadores do metabolismo lipídico, participando tanto na sinalização célula-célula quanto na modulação da interação parasita-hospedeiro (LOVO-MARTINS et al., 2017).

Corroborando nossos dados, outros trabalhos também têm demonstrado que VEs são as responsáveis pela indução da formação de CLs, com participação na modulação do sistema imune do hospedeiro (NOGUEIRA et al. 2015). Essas micropartículas, delimitadas por uma bicamada lipídica, são liberadas no espaço extracelular, podendo exercer respostas a distância (RUSSELL, Ashley E. et al., 2019) e participar de interações parasita-parasita e parasita-hospedeiro (D'AVILA H., et al., 2021).

Além disso, a análise da produção de citocinas revelou uma modulação diferencial pelos estímulos com VEs. Observamos um perfil de inibição das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6 e IL-12, enquanto a produção de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, foi aumentada. Esse efeito foi intensificado na presença da infecção pelo *T. cruzi*, sugerindo que as VEs não apenas favorecem a sobrevivência do parasito, mas também contribuem para a evasão do sistema imunológico, ao regular negativamente a resposta inflamatória do hospedeiro. Esses resultados corroboram com estudos prévios que destacaram o papel imuno-modulador das VEs em modelos *in vitro* e *in vivo*, como os descritos por

TROCOLI-TORRECILHAS et al. (2009) e LOVO-MARTINS et al. (2018), que relataram alterações na produção de citocinas e na resistência do hospedeiro à infecção.

Em estudos em macrófagos cultivados *in vitro*, o estímulo com VEs resultou em um aumento da internalização do parasita, aumento da liberação de formas tripomastigotas infectantes, além da formação de CLs e produção de prostaglandina E2 (PGE2), mesmo na ausência de *T. cruzi*. Em macrófagos infectados, VEs diminuíram a produção de PGE2 e citocinas TNF- α e IL-6, 24 horas após a infecção, sugerindo que as VEs modulam a resposta do hospedeiro a favor do parasita e indica um papel dos CLs e da PGE2 na modulação imunológica exercida por VEs (LOVO-MARTINS et al., 2017).

Estudos realizados analisando os efeitos das VEs de *T. cruzi* em modelos murinos de infecção experimental ainda são escassos. A inoculação de VEs em camundongos antes da infecção por *T. cruzi* resultou em um aumento da parasitemia, aumento do parasitismo cardíaco, diminuição do óxido nítrico (NO) plasmático, redução da produção de NO pelas células do baço e modulação da produção de citocinas, com redução do TNF- α no plasma e diminuição da produção de TNF- α e IL-6 pelas células do baço de animais infectados (LOVO-MARTINS et al., 2017).

O trabalho de TROCOLI TORRECILHAS et al. (2009) avaliou os efeitos da inoculação de VEs secretadas por tripomastigotas de *T. cruzi* cepa Y em camundongos BALB/c. Os resultados indicaram que a inoculação prévia de VEs, aumentou o parasitismo cardíaco e modulou a produção de citocinas, sendo encontrados maiores níveis de IL-4 e IL-10 no tecido cardíaco, indicando efeitos imunomoduladores das VEs de *T. cruzi in vivo* e consequente redução da resistência do hospedeiro à infecção, aumentando a sobrevivência do parasita no hospedeiro.

Estes dados em conjunto com a literatura nos permitem evidenciar que as VEs têm papel relevante na patogênese do *T. cruzi* (THERY et al., 2006). Embora alguns mecanismos desencadeados pelas VEs a favor do parasita já tenham sido descritos (inativação do complemento, modulação na produção de citocinas, aumento da infecção de células por *T. cruzi*) assim, é provável que mecanismos ainda desconhecidos estejam envolvidos. O estudo de outras vias relacionadas à patogênese das VEs de *T. cruzi* representa um avanço tanto no entendimento da biologia do parasita como da interação *T. cruzi*-célula hospedeira.

Importante destacar também que formas tripomastigostas de Tripanossomatídeos secretam várias moléculas, como proteínas, enzimas, ácidos nucleicos e glicoconjugados, na forma solúvel ou em VEs, que contribuem significativamente para o seu comportamento parasitário. Vários estudos têm documentado a relação entre o conteúdo das VEs secretadas por *T. cruzi* com a comunicação intercelular (NOGUEIRA et al. 2015).

Nesse sentido, a presença de pequenos fragmentos de RNAs nas VEs de *T. cruzi* pode representar um mecanismo relevante de modulação tanto do ciclo de vida do parasita como da célula hospedeira (LINHARES-LACERDA et al., 2015). Os pequenos fragmentos de RNAs presentes em VEs de *T. cruzi* variam de acordo com o estágio do ciclo que o parasita se encontra, sendo derivados tanto de RNAs transportadores como de RNAs ribossomais do *T. cruzi* (BAYER-SANTOS et al., 2014). Adicionalmente, a exposição de células HELa a VEs de *T. cruzi* provoca mudança no padrão de expressão gênica dessas células, principalmente de genes envolvidos com vias da resposta imunológica, citoesqueleto e matriz extracelular (GARCIA-SILVA & CABRERA-CABRERA, 2014) mostraram que as VEs de epimastigotas de *T. cruzi* possuem pequenos RNAs específicos, com distribuição diferente da que é encontrada no parasita, evidenciando um mecanismo específico de processamento e secreção de pequenos RNAs nas VEs de *T. cruzi*.

Por fim, considerando a ausência de vacinas ou biomarcadores eficazes para a doença de Chagas, as VEs representam potenciais alvos terapêuticos, seja para o desenvolvimento de vacinas, seja para a identificação de novos biomarcadores diagnósticos e prognósticos. Contudo, estudos adicionais são necessários para explorar os mecanismos específicos pelos quais as VEs modulam o metabolismo lipídico e a resposta imune. Como perspectivas futuras, pretende-se investigar mediadores lipídicos, como a prostaglandina E2 (PGE2), além de proteínas envolvidas no metabolismo lipídico, como PLIN2, DGAT-1 e PPAR γ . Essas análises podem ampliar nosso entendimento sobre as estratégias de evasão imunológica do *T. cruzi* e contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem inferir aspectos do papel modulador das VEs na ativação de células C2C12 durante a infecção pelo *T. cruzi in vitro*. As principais conclusões são:

- Produção de corpúsculos lipídicos (CLs): O estímulo de células C2C12 com VEs induziu um aumento na formação de CLs, efeito que foi ainda mais pronunciado na presença da infecção pelo *T. cruzi* após 24 horas.
- Modulação de citocinas pró-inflamatórias: O estímulo das células C2C12 com VEs resultou no perfil de supressão das citocinas de perfil pró-inflamatório (TNF- α , IL-6 e IL-12) no tempo avaliado. Essa inibição foi intensificada quando as VEs foram combinadas com a infecção pelo *T. cruzi*.
- Produção de citocinas anti-inflamatórias: O estímulo com VEs parece aumentar a produção de IL-10 em comparação ao grupo controle após 24 horas, com esse efeito sendo amplificado nos grupos infectados.

Esses dados reforçam a hipótese de que as VEs desempenham um papel crítico na comunicação parasita-hospedeiro. Especificamente, as VEs podem transportar moléculas patogênicas que desencadeiam mecanismos favoráveis à permanência do parasita no organismo hospedeiro o que contribuiria para progressão da Doença e um pior prognóstico.

Perspectivas

Apesar das contribuições deste estudo, mais investigações são necessárias para validar os dados aqui apresentados e aprofundar o entendimento dos mecanismos de ação das VEs sobre as células hospedeiras. Assim pretendemos:

- Estudar produção de mediadores lipídicos, como a prostaglandina E2 (PGE2) e mediadores inflamatórios como óxido nítrico (NO);
- Investigar das vias de sinalização relacionadas ao metabolismo lipídico, com ênfase na expressão de proteínas como PLIN2, DGAT-1 e PPAR γ .

Essas análises complementares visam esclarecer os mecanismos moleculares que permitem a evasão imunológica e a adaptação metabólica mediadas pelas VEs do *T. cruzi*, oferecendo subsídios para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para a doença de Chagas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, G. K.; FARIA, G. E.; SILVA, K. T.; CASTRO, E. C.; REIS, M. A.; MICHELIN, M. A. Trypanosoma cruzi: the role of PGE2 in immune response during the acute phase of experimental infection. **Experimental Parasitology**, v. 118, n. 4, p. 514-521, Apr. 2008.

ABRAHAMSOHN, I. A. Cytokines in innate and acquired immunity to Trypanosoma cruzi infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 1, p. 117-121, Jan. 1998.

ADELIZZI, R. A. COX-1 and COX-2 in health and disease. **Journal of the American Osteopathic Association**, v. 99, n. 11 Suppl, p. S7-S12, Nov. 1999.

AKERS, J. C.; GONDA, D.; KIM, R.; CARTER, B. S.; CHEN, C. C. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 113, n. 1, p. 1-11, Feb. 2013.

ALBERTTI, L. A.; MACEDO, A. M.; CHIARI, E.; ANDREWS, N. W.; ANDRADE, L. O. Role of host lysosomal associated membrane protein (LAMP) in Trypanosoma cruzi invasion and intracellular development. **Microbes Infect**, v 10, p.784-9, Set 2010.

ALIBERTI, J. C.; MACHADO, F. S.; SOUTO, J. T.; CAMPANELLI, A. P.; TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. Beta-chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbiostatic activity in murine inflammatory macrophages infected with Trypanosoma cruzi. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 9, p. 4819-4826, Sep. 1999.

AMBROZOVA, G.; PEKAROVA, M.; LOJEK, A. Effect of polyunsaturated fatty acids on the reactive oxygen and nitrogen species production by RAW 264.7 macrophages. **European Journal of Nutrition**, v. 49, n. 3, p. 133-139, Apr. 2010.

ANDRADE, D. V.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Acute Chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, p. e3010, 2014.

ARAÚJO-JORGE, T. C. D. The biology of Trypanosoma cruzi-macrophage interaction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, p. 441-462, 1989.

ARMAH, H.; WIRED, E. K.; DODOO, A. K.; ADJEI, A. A.; TETTEY, Y.; GYASI, R. Cytokines and adhesion molecules expression in the brain in human cerebral malaria. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 2, n. 1, p. 123-131, Apr. 2005.

BARBOSA, H. S.; DE MEIRELLES, M. N. Ultrastructural detection in vitro of WGA-, RCA I-, and Con A-binding sites involved in the invasion of heart muscle cells by Trypanosoma cruzi. **Parasitology Research**, v. 78, n. 5, p. 404-409, 1992.

BARBOSA, H. S.; MEIRELLES, M. N. Evidence of participation of cytoskeleton of heart muscle cells during the invasion of Trypanosoma cruzi. **Cell Structure and Function**, v. 20, n. 4, p. 275-284, Aug. 1995.

BARRIAS, E. S.; DE CARVALHO, T. M.; DE SOUZA, W. Trypanosoma cruzi: entry into mammalian host cells and parasitophorous vacuole formation. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 186, 2013.

BARTENEVA, N. S.; MALTSEV, N.; VOROBYEV, I. A. Microvesicles and intercellular communication in the context of parasitism. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, p. 49, 2013.

BAYER-SANTOS, E.; AGUILAR-BONAVIDES, C.; RODRIGUES, S. P.; CORDERO, E. M.; MARQUES, A. F.; VARELA-RAMIREZ, A.; CHOI, H.; YOSHIDA, N.; DA SILVEIRA, J. F.; ALMEIDA, I. C. 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, Feb. 2013.

BELLUZZI, A.; BRIGNOLA, C.; CAMPIERI, M.; PERA, A.; BOSCHI, S.; MIGLIOLI, M. Effect of an enteric-coated fish-oil preparation on relapses in Crohn's disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 334, n. 24, p. 1557-1560, Jun. 13, 1996.

BERN, C.; MONTGOMERY, S. P.; HERWALDT, B. L.; RASSI, A., JR.; MARIN-NETO, J. A.; DANTAS, R. O.; MAGUIRE, J. H.; ACQUATELLA, H.; MORILLO, C.; KIRCHHOFF, L. V.; GILMAN, R. H.; REYES, P. A. United States: a systematic review. **JAMA**, v. 298, n. 18, p. 2171-2181, Nov. 14, 2007.

BLOK, W. L.; RABINOVITCH, M.; ZILBERFARB, V.; NETEA, M. G.; BUURMAN, W. A.; VAN DER MEER, J. W. The influence of dietary fish-oil supplementation on cutaneous *Leishmania amazonensis* infection in mice. **Cytokine**, v. 19, n. 5, p. 213-217, Sep. 7, 2002.

BONILLA, D. L.; LY, L. H.; FAN, Y. Y.; CHAPKIN, R. S.; MCMURRAY, D. N. Incorporation of a dietary omega-3 fatty acid impairs murine macrophage responses to *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS ONE**, v. 5, n. 5, p. e10878, May 28, 2010.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annual Review of Microbiology**, v. 27, p. 347-382, 1973.

BURLEIGH, B. A.; CALER, E. V.; WEBSTER, P.; ANDREWS, N. W. A cytosolic serine endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* is required for the generation of Ca²⁺ signaling in mammalian cells. **The Journal of Cell Biology**, v. 136, n. 3, p. 609-620, Feb. 10, 1997.

CALDER, P. C. Long-chain fatty acids and inflammation. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 71, n. 2, p. 284-289, May 2012.

CALDER, P. C.; YAQOUB, P.; HARVEY, D. J.; WATTS, A.; NEWSHOLME, E. A. Incorporation of fatty acids by concanavalin A-stimulated lymphocytes and the effect on fatty acid composition and membrane fluidity. **The Biochemical Journal**, v. 300 (Pt 2), p. 509-518, Jun. 1, 1994.

CANDELA, M. E.; GERACI, F.; TURTURICI, G.; TAVERNA, S.; ALBANESE, I.; SCONZO, G. Membrane vesicles containing matrix metalloproteinase-9 and fibroblast growth factor-2 are released into the extracellular space from mouse mesoangioblast stem cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 224, n. 1, p. 144-151, Jul. 2010.

CARDILLO, F.; CUNHA, F. Q.; TAMASHIRO, W. M.; RUSSO, M.; GARCIA, S. B.; MENGEL, J. NK1.1+ cells and T-cell activation in euthymic and thymectomized C57Bl/6 mice during acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 55, n. 1, p. 96-104, Jan. 2002.

CARON, E.; DESSEYN, J. L.; SERGENT, L.; BARTKE, N.; HUSSON, M. O.; DUHAMEL, A.; GOTTRAND, F. Impact of fish oils on the outcomes of a mouse model of acute *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. **British Journal of Nutrition**, v. 113, n. 2, p. 191-199, Jan. 28, 2015.

CAZZULO, J. J.; CAZZULO FRANKE, M. C.; MARTINEZ, J.; FRANKE DE CAZZULO, B. M. Some kinetic properties of a cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1037, n. 2, p. 186-191, Feb. 09, 1990.

CESTARI, I.; ANSA-ADDO, E.; DEOLINDO, P.; INAL, J. M.; RAMIREZ, M. I. *Trypanosoma cruzi* immune evasion mediated by host cell-derived microvesicles. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 4, p. 1942-1952, Feb. 15, 2012.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1909.

CHITRAJU, C.; FISCHER, A. W.; AMBAW, Y. A.; WANG, K.; YUAN, B.; HUI, S.; WALTHER, T. C.; FARESE, R. V. Jr. Mice lacking triglyceride synthesis enzymes in adipose tissue are resistant to diet-induced obesity. **eLife**, 2 out. 2023.

CHOUDHARY, D. K.; BHAKT, P.; KAUR, R. Essential Role for the Phosphatidylinositol 3,5-Bisphosphate Synthesis Complex in Caspofungin Tolerance and Virulence in *Candida glabrata*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 8, p. e00886-19, 25 jul. 2019.

COLASANTI, M.; GRADONI, L.; MATTU, M.; PERSICHINI, T.; SALVATI, L.; VENTURINI, G.; ASCENZI, P. Molecular bases for the anti-parasitic effect of NO (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 9, n. 2, p. 131-134, Feb. 2002.

COLASANTI, M.; SUZUKI, H. The dual personality of NO. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 21, n. 7, p. 249-252, Jul. 2000.

CONRADO, M. A. D. O. Fauna de Triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae) e sua associação com Tripanosomatídeos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) nas cidades de Manaus e Rio Preto da Eva, Amazonas. **XX Jornada de Iniciação Científica PIBIC INPA–CNPq/FAPEAM**, 2011.

CORNET-GOMEZ, A.; MOREIRA, L. R.; GOMEZ-SAMBLÁS, M.; OSUNA, A. Extracellular vesicles of *Trypanosoma cruzi* and immune complexes they form with sialylated and non-sialylated IgGs increase small peritoneal macrophage subpopulation and elicit different cytokines profiles. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1215913, 2 ago. 2023.

COSTA, V. M.; TORRES, K. C.; MENDONÇA, R. Z.; GRESSER, I.; GOLLOB, K. J.; ABRAHAMSOHN, I. A. Type I IFNs stimulate nitric oxide production and resistance to

Trypanosoma cruzi infection. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 5, p. 3193-3200, Sep. 01, 2006.

CUNHA-NETO, E.; NOGUEIRA, L. G.; TEIXEIRA, P. C.; RAMASAWMY, R.; DRIGO, S. A.; GOLDBERG, A. C.; FONSECA, S. G.; BILATE, A. M.; KALIL, J. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 252-258, Jul. 2009.

CUROTTO DE LAFAILLE, M. A.; BARBOSA DE OLIVEIRA, L. C.; LIMA, G. C.; ABRAHAMSOHN, I. A. Trypanosoma cruzi: maintenance of parasite-specific T cell responses in lymph nodes during the acute phase of the infection. **Experimental Parasitology**, v. 70, n. 2, p. 164-174, Feb. 1990.

CUTRIM, F. E. R. F. et al. Estudo dos casos agudos de Doença de Chagas no Maranhão, Brasil, e sua relação com a pobreza. 2017. Tese (Doutorado).

DA SILVA, L. R. et al. Negligência e desafios na saúde coletiva: análise epidemiológica dos casos de doença de Chagas aguda no Brasil, no período de 2009 a 2018. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 61734-61752, 2020.

DA MATTA GUEDES, P. M.; GUTIERREZ, F. R.; MAIA, F. L.; MILANEZI, C. M.; SILVA, G. K.; PAVANELLI, W. R.; SILVA, J. S. IL-17 produced during Trypanosoma cruzi infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 2, p. e604, Feb. 16, 2010.

DA SILVEIRA, J. F.; ABRAHAMSOHN, P. A.; COLLI, W. Plasma membrane vesicles isolated from epimastigote forms of Trypanosoma cruzi. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 550, n. 2, p. 222-232, Jan. 19, 1979.

D'AVILA, H.; SOUZA, N. P. D.; ALBERTONI, A. L. D. S.; CAMPOS, L. C.; RAMPINELLI, P. G.; CORREA, J. R.; ALMEIDA, P. E. D. Impact of the extracellular vesicles derived from *Trypanosoma cruzi*: a paradox in host response and lipid metabolism modulation. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 768124, 2021.

DE LIMA, T. M.; DE SA LIMA, L.; SCAVONE, C.; CURI, R. Fatty acid control of nitric oxide production by macrophages. **FEBS Letters**, v. 580, n. 13, p. 3287-3295, May 29, 2006.

DE PABLOS, L. M.; DIAZ LOZANO, I. M.; JERCIC, M. I.; QUINZADA, M.; GIMENEZ, M. J.; CALABUIG, E.; ESPINO, A. M.; SCHIJMAN, A. G.; ZULANTAY, I.; APT, W.; OSUNA, A. The C-terminal region of *Trypanosoma cruzi* MASPs is antigenic and secreted via exovesicles. **Scientific Reports**, v. 6, p. 27293, Jun. 8, 2016.

DE SOUZA, W.; BARRIAS, E. M. Membrane-bound extracellular vesicles secreted by parasitic protozoa: cellular structures involved in the communication between cells. **Parasitology Research**, v. 119, n. 7, p. 2005-2023, 2020.

DE SOUZA, W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **International Review of Cytology**, v. 86, p. 197-283, 1984.

DEOLINDO, P.; EVANS-OSES, I.; RAMIREZ, M. I. Microvesicles and exosomes as vehicles between protozoan and host cell communication. **Biochemical Society Transactions**, v. 41, n. 1, p. 252-257, Feb. 2013.

DEVERA, R. et al. Biodemas de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas de humanos de três áreas endêmicas de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, p. 323-330, 2002.

DUQUE, T. L. A. et al. A autofagia do hospedeiro na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*: possíveis mecanismos envolvidos e resposta imune. 2017. Tese (Doutorado).

DUTRA, W. O.; MENEZES, C. A.; MAGALHÃES, L. M.; GOLLOB, K. J. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 8, p. 377-387, Aug. 2014.

DVORAK, J. A.; HYDE, T. P. Trypanosoma cruzi: interaction with vertebrate cells in vitro. 1. Individual interactions at the cellular and subcellular levels. **Experimental Parasitology**, v. 34, n. 2, p. 268-283, Oct. 1973.

ENGLER, M. D.; VALDEZ, Y. E.; LEHNERT, N. M.; LEHNERT, B. E. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor is expressed and secreted in cultures of murine L929 cells. **Journal of Immunological Methods**, v. 184, n. 2, p. 281-283, Aug. 1995.

FABER, J.; BERKHOUT, M.; VOS, A. P.; SIJZEN, J. W.; CALDER, P. C.; GARSSSEN, J.; VAN HELVOORT, A. Supplementation with a fish oil-enriched, high-protein medical food leads to rapid incorporation of EPA into white blood cells and modulates immune responses within one week in healthy men and women. **Journal of Nutrition**, v. 141, n. 5, p. 964-970, May 2011.

FENTON, J. I.; HORD, N. G.; GHOSH, S.; GURZELL, E. A. Immunomodulation by dietary long chain omega-3 fatty acids and the potential for adverse health outcomes. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 89, n. 6, p. 379-390, Nov.-Dec. 2013.

FERNANDES, M. C.; ANDREWS, N. W. Host cell invasion by Trypanosoma cruzi: a unique strategy that promotes persistence. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 3, p. 734-747, May 2012.

FERNANDES, M. C.; CORTEZ, M.; FLANNERY, A. R.; TAM, C.; MORTARA, R. A.; ANDREWS, N. W. Trypanosoma cruzi subverts the sphingomyelinase-mediated plasma

membrane repair pathway for cell invasion. **Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 5, p. 909-921, May 9, 2011.

FERNANDES, M. C.; CORTEZ, M.; GERALDO YONEYAMA, K. A.; STRAUS, A. H.; YOSHIDA, N.; MORTARA, R. A. Novel strategy in *Trypanosoma cruzi* cell invasion: implication of cholesterol and host cell microdomains. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 13, p. 1431-1441, Nov. 2007.

FERNANDEZ-CALERO, T.; GARCIA-SILVA, R.; PENA, A.; ROBELLO, C.; PERSSON, H.; ROVIRA, C.; NAYA, H.; CAYOTA, A. Profiling of small RNA cargo of extracellular vesicles shed by *Trypanosoma cruzi* reveals a specific extracellular signature. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 199, n. 1-2, p. 19-28, Jan.-Feb. 2015.

FITARELLI, D. B.; HORN, J. F. Descarte de bolsas de sangue devido à reatividade para doença de Chagas em um laboratório de triagem sorológica de doadores em Porto Alegre-RS. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, p. 310-314, 2009.

FISCHER, E.; OUAISSI, M. A.; VELGE, P.; CORNETTE, J.; KAZATCHKINE, M. D. gp 58/68, a parasite component that contributes to the escape of the trypomastigote form of *T. cruzi* from damage by the human alternative complement pathway. **Immunology**, v. 65, n. 2, p. 299-303, Oct. 1988.

FORATTINI, O. P. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 14, p. 265-299, 1980.

FOX, J. E.; AUSTIN, C. D.; BOYLES, J. K.; STEFFEN, P. K. Role of the membrane skeleton in preventing the shedding of procoagulant-rich microvesicles from the platelet plasma membrane. **Journal of Cell Biology**, v. 111, n. 2, p. 483-493, Aug. 1990.

FRASCH, A. C. Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol Today**, v. 16, n. 7, p. 282-286, Jul. 2000.

FREIRE-DE-LIMA, C. G.; NASCIMENTO, D. O.; SOARES, M. B.; BOZZA, P. T.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; DE MELLO, F. G.; DOSREIS, G. A.; LOPES, M. F. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. **Nature**, v. 403, n. 6766, p. 199-203, Jan. 13, 2000.

FRITSCHKE, K. Fatty acids as modulators of the immune response. **Annual Review of Nutrition**, v. 26, p. 45-73, 2006.

GANNAVARAM, S.; BHATTACHARYA, P.; ISMAIL, N.; KAUL, A.; SINGH, R.; NAKHASI, H. L. Modulation of innate immune mechanisms to enhance Leishmania vaccine-induced immunity: role of coinhibitory molecules. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p. 187, 13 maio 2016.

GARCIA-SILVA, M. R.; CABRERA-CABRERA, F. Gene expression changes induced by *Trypanosoma cruzi* shed microvesicles in mammalian host cells: relevance of tRNA-derived halves. **Biomed Res Int**. v. 2014, p. 305239, 2014.

GAZZINELLI, R. T.; DENKERS, E. Y. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 12, p. 895-906, Dec. 2006.

GIORDANO, R.; FOUTS, D. L.; TEWARI, D.; COLLI, W.; MANNING, J. E.; ALVES, M. J. Cloning of a surface membrane glycoprotein specific for the infective form of *Trypanosoma cruzi* having adhesive properties to laminin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 6, p. 3461-3468, Feb. 5, 1999.

GODFREY, D. G. Influence of dietary cod liver oil upon *Trypanosoma congolense*, *T. cruzi*, *T. vivax* and *T. brucei*. **Experimental Parasitology**, v. 7, n. 3, p. 255-268, May 1958.

GOMEZ GARCIA, V.; SANZ SAMPELAYO, M. R.; FERNANDEZ NAVARRO, J. R.; CARMONA LOPEZ, F. D.; GUERRERO, N. A.; CAMACHO, M.; VILA, L.; INIGUEZ, M. A.; CHILLON-MARINAS, C.; CUERVO, H.; POVEDA, C.; FRESNO, M.; GIRONES, N. Cyclooxygenase-2 and Prostaglandin E2 Signaling through Prostaglandin Receptor EP-2 Favor the Development of Myocarditis during Acute Trypanosoma cruzi Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 8, p. e0004025, 2015.

GUILMOT, A.; BOSSE, J.; CARLIER, Y.; TRUYENS, C. Monocytes play an IL-12-dependent crucial role in driving cord blood NK cells to produce IFN-g in response to Trypanosoma cruzi. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 6, p. e2291, 2013.

GUTIERREZ, F. R.; MINEO, T. W.; PAVANELLI, W. R.; GUEDES, P. M.; SILVA, J. S. The effects of nitric oxide on the immune system during Trypanosoma cruzi infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 236-245, Jul. 2009.

HALL, B. S.; PEREIRA, M. A. Dual role for transforming growth factor beta-dependent signaling in Trypanosoma cruzi infection of mammalian cells. **Infectious Immunology**, v. 68, n. 4, p. 2077-2081, Apr. 2000.

HENRIQUES-PONS, A.; NAGARAJU, K. Nonimmune mechanisms of muscle damage in myositis: role of the endoplasmic reticulum stress response and autophagy in the disease pathogenesis. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 21, n. 6, p. 581-587, Nov. 2009.

HIDEKO TATAKIHARA, V. L.; CECCHINI, R.; BORGES, C. L.; MALVEZI, A. D.; GRACA-DE SOUZA, V. K.; YAMADA-OGATTA, S. F.; RIZZO, L. V.; PINGE-FILHO, P. Effects of cyclooxygenase inhibitors on parasite burden, anemia and oxidative stress in murine Trypanosoma cruzi infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 47-58, Jan. 2008.

HOKARI, R.; MATSUNAGA, H.; MIURA, S. Effect of dietary fat on intestinal inflammatory diseases. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 28 Suppl 4, p. 33-36, Dec. 2013.

HOLSCHER, C.; MOHRS, M.; DAI, W. J.; KOHLER, G.; RYFFEL, B.; SCHAUB, G. A.; MOSSMANN, H.; BROMBACHER, F. Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in Trypanosoma cruzi-infected interleukin 10-deficient mice. **Infectious Immunology**, v. 68, n. 7, p. 4075-4083, Jul. 2000.

HURLEY, J. H.; HANSON, P. I. Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 8, p. 556-566, Aug. 2010.

INAL, J. M.; FAIRBROTHER, U.; HEUGH, S. Microvesiculation and disease. **Biochemical Society Transactions**, v. 41, n. 1, p. 237-240, Feb. 1, 2013.

INOUE, S.; KAWANISHI, S. Oxidative DNA damage induced by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide. **FEBS Letters**, v. 371, n. 1, p. 86-88, Aug. 28, 1995.

IRONS, R.; ANDERSON, M. J.; ZHANG, M.; FRITSCHKE, K. L. Dietary fish oil impairs primary host resistance against Listeria monocytogenes more than the immunological memory response. **Journal of Nutrition**, v. 133, n. 4, p. 1163-1169, Apr. 2003.

JUNQUEIRA, C.; CAETANO, B.; BARTHOLOMEU, D. C.; MELO, M. B.; ROPERT, C.; RODRIGUES, M. M.; GAZZINELLI, R. T. The endless race between Trypanosoma cruzi and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert Review of Molecular Medicine**, v. 12, p. e29, Sep. 15, 2010.

KAECH, C.; BOCHUD, P. Y.; CALANDRA, T. Cytokines and Escherichia coli Sepsis. **EcoSal Plus**, v. 2, n. 1, Jan. 2006.

KANAOKA, Y.; BOYCE, J. A. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: cellular distribution and function in immune and inflammatory responses. **Journal of Immunology**, v. 173, n. 3, p. 1503-1510, Aug. 01, 2004.

KANNO, S.; LEE, P. C.; ZHANG, Y.; HO, C.; GRIFFITH, B. P.; SHEARS, L. L., 2ND; BILLIAR, T. R. Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury by superinduction of inducible nitric oxide synthase. **Circulation**, v. 101, n. 23, p. 2742-2748, Jun. 13, 2000.

KESSLER, RAFAEL LUIS et al. Recently differentiated epimastigotes from *Trypanosoma cruzi* are infective to the mammalian host. **Molecular Microbiology**, v. 104, n. 5, p. 712-736, 2017.

KIERSZENBAUM, F. Protection of congenitally athymic mice against *Trypanosoma cruzi* infection by passive antibody transfer. **Journal of Parasitology**, v. 66, n. 4, p. 673-675, Aug. 1980.

KIM, G. D.; LEE, S. E.; YANG, H.; PARK, H. R.; SON, G. W.; PARK, C. S.; PARK, Y. S. $\beta 2$ integrins (CD11/18) are essential for the chemosensory adhesion and migration of polymorphonuclear leukocytes on bacterial cellulose. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 103, n. 5, p. 1809-1817, May 2015.

KIMURA, D.; MIYAKODA, M.; KIMURA, K.; HONMA, K.; HARA, H.; YOSHIDA, H.; YUI, K. Interleukin-27-producing CD4(+) T cells regulate protective immunity during malaria parasite infection. **Immunity**, v. 44, n. 3, p. 672-682, 15 mar. 2016.

KRAUSE, P.; BRUCKNER, M.; UERMOSI, C.; SINGER, E.; GROETTRUP, M.; LEGLER, D. F. Prostaglandin E(2) enhances T-cell proliferation by inducing the costimulatory molecules OX40L, CD70, and 4-1BBL on dendritic cells. **Blood**, v. 113, n. 11, p. 2451-2460, Mar. 12, 2009.

KRETTLI, A. U.; BRENER, Z. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. **Journal of Immunology**, v. 116, n. 3, p. 755-760, Mar. 1976.

KROPF, SIMONE PETRAGLIA. Doença de Chagas, doença do Brasil: ciência, saúde e nação, 1909-1962. **Editora Fiocruz**, 2009.

KROMANN, N.; GREEN, A. Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950-1974. **Acta Medica Scandinavica**, v. 208, n. 5, p. 401-406, 1980.

LANDS, B. Historical perspectives on the impact of n-3 and n-6 nutrients on health. **Progress in Lipid Research**, v. 55, p. 17-29, Jul. 2014.

LANNES-VIEIRA, J. Trypanosoma cruzi-elicited CD8⁺ T cell-mediated myocarditis: chemokine receptors and adhesion molecules as potential therapeutic targets to control chronic inflammation? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p. 299-304, Apr. 2003.

LEAL DE ARAÚJO, J.; RECH, R. R.; RODRIGUES-HOFFMANN, A.; GIARETTA, P. R.; CIRQUEIRA, C.; WENCESLAU, R. R.; TIZARD, I.; DIAZ-DELGADO, J. Immunophenotype of the inflammatory response in the central and enteric nervous systems of cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) experimentally infected with parrot bornavirus 2. **Veterinary Pathology**, v. 59, n. 3, p. 493-497, maio 2022.

LEY, V.; ANDREWS, N. W.; ROBBINS, E. S.; NUSSENZWEIG, V. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 168, n. 2, p. 649-659, Aug. 01, 1988.

LIDANI, K. C. F.; BAVIA, L.; AMBROSIO, A. R.; DE MESSIAS-REASON, I. J. The Complement System: A Prey of *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 607, 2017.

LINHARES-LACERDA, L.; PALU, C. C.; RIBEIRO-ALVES, M.; PAREDES, B. D.; MORROT, A.; GARCIA-SILVA, M. R.; CAYOTA, A.; SAVINO, W. Differential expression of microRNAs in thymic epithelial cells from *Trypanosoma cruzi* acutely

infected mice: putative role in thymic atrophy. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 428, 21 ago. 2015.

LIU, Z.; WANG, L.; GAO, P.; YU, Y.; ZHANG, Y.; FOTIN, A.; WANG, Q.; XU, Z.; WEI, X.; FOTINA, T.; MA, J. Salmonella Pullorum effector SteE regulates Th1/Th2 cytokine expression by triggering the STAT3/SOCS3 pathway that suppresses NF- κ B activation. **Veterinary Microbiology**, v. 284, p. 109817, set. 2023.

LOPES, MARIANA EDUARDA APARECIDA DE SOUZA ASSUNÇÃO et al. Ensaio funcional de internalização de formas epimastigotas de Trypanosoma cruzi por leucócitos do sangue periférico humano para avaliação de substâncias potencialmente ativas contra a Doença de Chagas. 2016.

LOVO-MARTINS, M. I.; MALVEZI, A. D.; DA SILVA, R. V.; ZANLUQUI, N. G.; TATAKIHARA, V. L. H.; CAMARA, N. O. S.; DE OLIVEIRA, A. P. L.; PERON, J. P. S.; MARTINS-PINGE, M. C.; PINGE-FILHO, P. Fish oil supplementation benefits the murine host during the acute phase of a parasitic infection from Trypanosoma cruzi. **Nutrition Research**, v. 41, p. 73-85, May 2017.

LOZITO, T. P.; TUAN, R. S. Endothelial cell microparticles act as centers of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) activation and vascular matrix remodeling. **Journal of Cell Physiology**, v. 227, n. 2, p. 534-549, Feb. 2012.

MAALOULY, G.; WARD, C.; SMAYRA, V.; SALIBA, Y.; AFTIMOS, G.; HADDAD, F.; FARES, N. Fish oil attenuates neurologic severity of antiphospholipid syndrome in a mice experimental model. **Nutritional Neuroscience**, p. 1-8, Jul. 17, 2016.

MACHADO, F. S.; MUKHERJEE, S.; WEISS, L. M.; TANOWITZ, H. B.; ASHTON, A. W. Bioactive lipids in Trypanosoma cruzi infection. **Advances in Parasitol**, v. 76, p. 1-31, 2011.

MACMICKING, J.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annual Review of Immunology**, v. 15, p. 323-350, 1997.

MANNE-GOEHLER, J.; UMEH, C. A.; MONTGOMERY, S. P.; WIRTZ, V. J. Estimating the Burden of Chagas Disease in the United States. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 11, p. e0005033, Nov. 2016.

MARCILLA, A.; MARTIN-JAULAR, L.; TRELIS, M.; DE MENEZES-NETO, A.; OSUNA, A.; BERNAL, D.; FERNANDEZ-BECERRA, C.; ALMEIDA, I. C.; DEL PORTILLO, H. A. Extracellular vesicles in parasitic diseases. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 3, p. 25040, 2014.

MARIN-NETO, J. A.; CUNHA-NETO, E.; MACIEL, B. C.; SIMOES, M. V. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, v. 115, n. 9, p. 1109-1123, Mar. 6, 2007.

MARTINS, R. M.; ALVES, R. M.; MACEDO, S.; YOSHIDA, N. Starvation and rapamycin differentially regulate host cell lysosome exocytosis and invasion by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms. **Cell Microbiology**, v. 13, n. 7, p. 943-954, Jul. 2011.

MARTINS, N. O.; SOUZA, R. T.; CORDERO, E. M.; MALDONADO, D. C.; CORTEZ, C.; MARINI, M. M.; FERREIRA, E. R.; BAYER-SANTOS, E.; ALMEIDA, I. C.; YOSHIDA, N.; SILVEIRA, J. F. Molecular characterization of a novel family of *Trypanosoma cruzi* surface membrane proteins (TcSMP) involved in mammalian host cell invasion. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 11, p. e0004216, 2015.

MAS, E.; CROFT, K. D.; ZAHRA, P.; BARDEN, A.; MORI, T. A. Resolvins D1, D2, and other mediators of self-limited resolution of inflammation in human blood following n-3 fatty acid supplementation. **Clinical Chemistry**, v. 58, n. 10, p. 1476-1484, Oct. 2012.

MASSAD, E. The elimination of Chagas disease from Brazil. **Epidemiology and Infection**, v. 136, n. 9, p. 1153-1164, Sep. 2008.

MATHIVANAN, S.; JI, H.; SIMPSON, R. J. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 10, p. 1907-1920, Sep. 10, 2010.

MAYER, B.; HEMMENS, B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, n. 12, p. 477-481, Dec. 1997.

MICHELIN, M. A.; SILVA, J. S.; CUNHA, F. Q. Inducible cyclooxygenase released prostaglandin mediates immunosuppression in acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Experimental Parasitology**, v. 111, n. 2, p. 71-79, Oct. 2005.

MILES, E. A.; CALDER, P. C. Influence of marine n-3 polyunsaturated fatty acids on immune function and a systematic review of their effects on clinical outcomes in rheumatoid arthritis. **British Journal of Nutrition**, v. 107 Suppl 2, p. S171-S184, Jun. 2012.

MOODY, T. N.; OCHIENG, J.; VILLALTA, F. Novel mechanism that *Trypanosoma cruzi* uses to adhere to the extracellular matrix mediated by human galectin-3. **FEBS Letters**, v. 470, n. 3, p. 305-308, Mar. 31, 2000.

MOREL, O.; TOTI, F.; HUGEL, B.; FREYSSINET, J. M. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. **Current Opinion in Hematology**, v. 11, n. 3, p. 156-164, May 2004.

MORTARA, R. A.; ANDREOLI, W. K.; FERNANDES, M. C.; DA SILVA, C. V.; FERNANDES, A. B.; L'ABBATE, C.; DA SILVA, S. Host cell actin remodeling in response to *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote versus amastigote entry. **Subcell Biochemistry**, v. 47, p. 101-109, 2008.

MORTARA, R. A.; ANDREOLI, W. K.; TANIWAKI, N. N.; FERNANDES, A. B.; SILVA, C. V.; FERNANDES, M. C.; L'ABBATE, C.; SILVA, S. Mammalian cell invasion and intracellular trafficking by Trypanosoma cruzi infective forms. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 1, p. 77-94, Mar. 2005.

NAGAJYOTHI, F.; WEISS, L. M.; SILVER, D. L.; DESRUISSEAU, M. S.; SCHERER, P. E.; HERZ, J.; TANOWITZ, H. B. Trypanosoma cruzi utiliza o receptor de lipoproteína de baixa densidade do hospedeiro na invasão. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 2, p. e953, Feb. 01, 2011.

NASCIMENTO, I. S.; RADIN, M.; GÂNDARA, A. P. R.; SCIASCIA, S.; DE ANDRADE, D. C. O. Global antiphospholipid syndrome score and anti-β2-glycoprotein I domain I for thrombotic risk stratification in antiphospholipid syndrome: A four-year prospective study. **Lupus**, v. 29, n. 7, p. 676-685, jun. 2020.

NAVARRO-GONZALVEZ, J. A.; GARCIA-BENAYAS, C.; ARENAS, J. Medição semiautomática de nitrato em fluidos biológicos. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 3, p. 679-681, Mar. 1998.

NEVES, R. F.; FERNANDES, A. C.; MEYER-FERNANDES, J. R.; SOUTO-PADRON, T. Vesículas secretadas por Trypanosoma cruzi têm atividades de fosfatase ácida e alcalina capazes de aumentar a adesão e a infecção do parasita. **Parasitol Research**, v. 113, n. 8, p. 2961-2972, Aug. 2014.

NOGUEIRA, N.; COHN, Z. Trypanosoma cruzi: mecanismo de entrada e destino intracelular em células mamíferas. **Journal of Experimental Medicine**, v. 143, n. 6, p. 1402-1420, Jun. 01, 1976.

NOGUEIRA, P. M.; RIBEIRO, K.; SILVEIRA, A. C.; CAMPOS, J. H.; MARTINS-FILHO, O. A.; BELA, S. R.; CAMPOS, M. A.; PESSOA, N. L.; COLLI, W.; ALVES, M. J.; SOARES, R. P.; TORRECILHAS, A. C. Vesículas de diferentes cepas de

Trypanosoma cruzi induzem respostas imunes inatas e crônicas diferentes. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 4, p. 28734, 2015.

NORRIS, K. A. Transfecção estável de epimastigotas Trypanosoma cruzi com cDNA do regulador de complemento específico do trypomastigote confere resistência ao complemento. **Infect Immun**, v. 66, n. 6, p. 2460-2465, Jun. 1998.

OLIVEIRA, A. C. S. Mecanismos parasitários de escape ao sistema imunológico. 2011. Dissertação de Mestrado. **Universidade Fernando Pessoa (Portugal)**.

OUAISSI, M. A.; CORNETTE, J.; AFCHAIN, D.; CAPRON, A.; GRAS-MASSE, H.; TARTAR, A. Infecção por Trypanosoma cruzi inibida por peptídeos modelados a partir de um domínio de ancoragem celular da fibronectina. **Science**, v. 234, n. 4776, p. 603-607, Oct. 31, 1986.

PAIVA, C. N.; FEIJO, D. F.; DUTRA, F. F.; CARNEIRO, V. C.; FREITAS, G. B.; ALVES, L. S.; MESQUITA, J.; FORTES, G. B.; FIGUEIREDO, R. T.; SOUZA, H. S.; FANTAPPIE, M. R.; LANNES-VIEIRA, J.; BOZZA, M. T. O estresse oxidativo alimenta a infecção por Trypanosoma cruzi em camundongos. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 7, p. 2531-2542, Jul. 2012.

PAKIANATHAN, D. R.; KUHN, R. E. Interleukin-2 receptors in experimental Chagas' disease. **Infect Immun**, v. 60, n. 9, p. 3904-3908, Sep. 1992.

PANZER, U.; UGUCCIONI, M. Prostaglandin E2 modulates the functional responsiveness of human monocytes to chemokines. **European Journal of Immunology**, v. 34, n. 12, p. 3682-3689, Dec. 2004.

PAVANELLI, W. R.; GUTIERREZ, F. R.; MARIANO, F. S.; PRADO, C. M.; FERREIRA, B. R.; TEIXEIRA, M. M.; CANETTI, C.; ROSSI, M. A.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. 5-lipoxygenase is a key determinant of acute myocardial inflammation and mortality during

Trypanosoma cruzi infection. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 8-9, p. 587-597, Aug. 2010.

PEREIRA-SILVA, FERNANDA SANTÁNA; MELLO, MARCIO LUIZ BRAGA CORRÊA de; ARAÚJO-JORGE, TANIA CREMONINI de. Doença de Chagas: enfrentando a invisibilidade pela análise de histórias de vida de portadores crônicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 27, p. 1939-1949, 2022.

PEREIRA, M. E.; ZHANG, K.; GONG, Y.; HERRERA, E. M.; MING, M. Invasive phenotype of Trypanosoma cruzi restricted to a population expressing trans-sialidase. **Infect Immun**, v. 64, n. 9, p. 3884-3892, Sep. 1996.

PETERSEN, C. A.; BURLEIGH, B. A. Role for interleukin-1 beta in Trypanosoma cruzi-induced cardiomyocyte hypertrophy. **Infect Immun**, v. 71, n. 8, p. 4441-4447, Aug. 2003.

PETRAY, P.; ROTTENBERG, M. E.; GRINSTEIN, S.; ORN, A. Release of nitric oxide during the experimental infection with Trypanosoma cruzi. **Parasite Immunology**, v. 16, n. 4, p. 193-199, Apr. 1994.

PIACENZA, L.; PELUFFO, G.; ALVAREZ, M. N.; MARTINEZ, A.; RADI, R. Trypanosoma cruzi antioxidant enzymes as virulence factors in Chagas disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 19, n. 7, p. 723-734, Sep. 1, 2013.

PINGE-FILHO, P.; TADOKORO, C. E.; ABRAHAMSOHN, I. A. Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute Trypanosoma cruzi infection. **Cell Immunology**, v. 193, n. 1, p. 90-98, Apr. 10, 1999.

PUERTOLLANO, M. A.; CRUZ-CHAMORRO, L.; PUERTOLLANO, E.; PEREZ-TOSCANO, M. T.; ALVAREZ DE CIENFUEGOS, G.; DE PABLO, M. A. Assessment of interleukin-12, gamma interferon, and tumor necrosis factor alpha secretion

in sera from mice fed with dietary lipids during different stages of *Listeria monocytogenes* infection. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 12, n. 9, p. 1098-1103, Sep. 2005.

RAIBORG, C.; STENMARK, H. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. **Nature**, v. 458, n. 7237, p. 445-452, Mar. 26, 2009.

RAJAEI, E.; MOWLA, K.; GHORBANI, A.; BAHADORAM, S.; BAHADORAM, M.; DARGAHI-MALAMIR, M. The Effect of Omega-3 Fatty Acids in Patients With Active Rheumatoid Arthritis Receiving DMARDs Therapy: Double-Blind Randomized Controlled Trial. **Global Journal of Health Science**, v. 8, n. 7, p. 18-25, Nov. 3, 2015.

RAMIREZ, M. I.; DEOLINDO, P.; DE MESSIAS-REASON, I. J.; ARIGI, E. A.; CHOI, H.; ALMEIDA, I. C.; EVANS-OSES, I. Dynamic flux of microvesicles modulate parasite-host cell interaction of *Trypanosoma cruzi* in eukaryotic cells. **Cell Microbiology**, v. 19, n. 4, p. e12672, Apr. 2017.

RAPOSO, G.; STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. **Journal of Cell Biology**, v. 200, n. 4, p. 373-383, Feb. 18, 2013.

RASSI, A., JR.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infectious Diseases Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 275-291, Jun. 2012.

ROBBINS, P. D.; MORELLI, A. E. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 3, p. 195-208, Mar. 2014.

RODRIGUES, M. M.; OLIVEIRA, A. C.; BELLIO, M. The Immune Response to *Trypanosoma cruzi*: Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development. **Journal of Parasite Research**, v. 2012, p. 507874, 2012.

RODRIGUEZ, A.; SAMOFF, E.; RIOULT, M. G.; CHUNG, A.; ANDREWS, N. W. Host cell invasion by trypanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport. **Journal of Cell Biology**, v. 134, n. 2, p. 349-362, Jul. 1996.

ROMANO, P. S.; ARBOIT, M. A.; VAZQUEZ, C. L.; COLOMBO, M. I. The autophagic pathway is a key component in the lysosomal dependent entry of *Trypanosoma cruzi* into the host cell. **Autophagy**, v. 5, n. 1, p. 6-18, Jan. 2009.

RUSSELL, Ashley E. et al. Biological membranes in EV biogenesis, stability, uptake, and cargo transfer: an ISEV position paper arising from the ISEV membranes and EVs workshop. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 8, n. 1, p. 1684862, 2019.

SANT'ANNA, JULIA; PARRAVANO, RAFAEL DE ALMEIDA. *Trypanosoma cruzi*, a interação entre o parasita e a célula hospedeira. 2022.

SCHARFSTEIN, J.; SCHMITZ, V.; MORANDI, V.; CAPELLA, M. M.; LIMA, A. P.; MORROT, A.; JULIANO, L.; MULLER-ESTERL, W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B2 receptors. **Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 9, p. 1289-1300, Nov. 6, 2000.

SHPIILKA, T.; ELAZAR, Z. Lipid droplets regulate autophagosome biogenesis. **Autophagy**, v. 11, n. 11, p. 2130-2131, 2 nov. 2015.

CHENKMAN, S.; DIAZ, C.; NUSSENZWEIG, V. Attachment of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to receptors at restricted cell surface domains. **Experimental Parasitology**, v. 72, n. 1, p. 76-86, Jan. 1991.

SCHOFIELD, C. J.; DIAS, J. C. The Southern Cone Initiative against Chagas disease. **Advances in Parasitology**, v. 42, p. 1-27, 1999.

SILVA, J. S.; ALIBERTI, J. C.; MARTINS, G. A.; SOUZA, M. A.; SOUTO, J. T.; PADUA, M. A. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 1, p. 111-115, Jan. 1998.

SILVA, DOS SANTOS, DANIELLI et al. Unraveling Chagas disease transmission through the oral route: Gateways to *Trypanosoma cruzi* infection and target tissues. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 4, p. e0005507, 2017.

SOKOLOWSKA, M.; CHEN, L. Y.; LIU, Y.; MARTINEZ-ANTON, A.; QI, H. Y.; LOGUN, C.; ALSAATY, S.; PARK, Y. H.; KASTNER, D. L.; CHAE, J. J.; SHELHAMER, J. H. Prostaglandin E2 Inhibits NLRP3 Inflammasome Activation through EP4 Receptor and Intracellular Cyclic AMP in Human Macrophages. **Journal of Immunology**, v. 194, n. 11, p. 5472-5487, Jun. 1, 2015.

SRIKANTH, S.; WOO, J. S.; GWACK, Y. A large Rab GTPase family in a small GTPase world. **Small GTPases**, v. 8, n. 1, p. 43-48, 2017.

STUFFERS, S.; SEM WEGNER, C.; STENMARK, H.; BRECH, A. Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. **Traffic**, v. 10, n. 7, p. 925-937, Jul. 2009.

STURGILL-KOSZYCKI, S.; SCHLESINGER, P. H.; CHAKRABORTY, P.; HADDIX, P. L.; COLLINS, H. L.; FOK, A. K.; ALLEN, R. D.; GLUCK, S. L.; HEUSER, J.; RUSSELL, D. G. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. **Science**, v. 263, n. 5147, p. 678-681, Feb. 4, 1994.

SZANTO, A.; NAGY, L. The many faces of PPARgamma: anti-inflammatory by any means? **Immunobiology**, v. 213, n. 9-10, p. 789-803, 2008.

TAKEDA, G. K.; STAROBINAS, N.; MARCONDES, M. C.; MELLO, E. A.; RUSSO, M.; STOLF, A. M. Oral administration of fish-oil induces high levels of seric TNF in

Trypanosoma cruzi infected C57BL/6 mice. **Acta Tropica**, v. 60, n. 3, p. 215-219, Dec. 1995.

TALVANI, A.; MACHADO, F. S.; SANTANA, G. C.; KLEIN, A.; BARCELOS, L.; SILVA, J. S.; TEIXEIRA, M. M. Leukotriene B4 induces nitric oxide synthesis in Trypanosoma cruzi-infected murine macrophages and mediates resistance to infection. **Infectious Immunology**, v. 70, n. 8, p. 4247-4253, Aug. 2002.

TARLETON, R. L. Tumour necrosis factor (cachectin) production during experimental Chagas' disease. **Clinical Experimental Immunology**, v. 73, n. 2, p. 186-190, Aug. 1988.

TAYLOR, A.; VERHAGEN, J.; BLASER, K.; AKDIS, M.; AKDIS, C. A. Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells. **Immunology**, v. 117, n. 4, p. 433-442, Apr. 2006.

TEIXEIRA, M. M.; YOSHIDA, N. Stage-specific surface antigens of metacyclic trypomastigotes of Trypanosoma cruzi identified by monoclonal antibodies. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 18, n. 3, p. 271-282, Mar. 1986.

THÉRY, C.; AMIGORENA, S.; RAPOSO, G.; CLAYTON, A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. **Current Protocols in Cell Biology**, abr. 2006

TRUYENS, C.; ANGELO-BARRIOS, A.; TORRICO, F.; VAN DAMME, J.; HEREMANS, H.; CARLIER, Y. Interleukin-6 (IL-6) production in mice infected with Trypanosoma cruzi: effect of its paradoxical increase by anti-IL-6 monoclonal antibody treatment on infection and acute-phase and humoral immune responses. **Infectious Immunology**, v. 62, n. 2, p. 692-696, Feb. 1994.

TOMLINSON, S.; PONTES DE CARVALHO, L. C.; VANDEKERCKHOVE, F.; NUSSENZWEIG, V. Role of sialic acid in the resistance of Trypanosoma cruzi

trypomastigotes to complement. **Journal of Immunology**, v. 153, n. 7, p. 3141-3147, Oct. 1, 1994.

VAN DER POUW KRAAN, T. C.; BOEIJJE, L. C.; SMEENK, R. J.; WIJDENES, J.; AARDEN, L. A. Prostaglandin E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production. **Journal of Experimental Medicine**, v. 181, n. 2, p. 775-779, Feb. 1, 1995.

RUSSELL, Ashley E. et al. Biological membranes in EV biogenesis, stability, uptake, and cargo transfer: an ISEV position paper arising from the ISEV membranes and EVs workshop. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 8, n. 1, p. 1684862, 2019.

VIEIRA, M. C.; DE CARVALHO, T. U.; DE SOUZA, W. Effect of protein kinase inhibitors on the invasion process of macrophages by *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 203, n. 2, p. 967-971, Sep. 15, 1994.

VILLALTA, F.; KIERSZENBAUM, F. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: role of cell surface galactose residues. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 119, n. 1, p. 228-235, Feb. 29, 1984.

WAN, F.; LENARDO, M. J. The nuclear signaling of NF- κ B: current knowledge, new insights, and future perspectives. **Cell Research**, v. 20, n. 1, p. 24-33, Jan. 2010.

WHO, W. H. O. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Mar. 2017. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acesso em: 31/03/2018.

WONG, S. W.; KWON, M. J.; CHOI, A. M.; KIM, H. P.; NAKAHIRA, K.; HWANG, D. H. Fatty acids modulate Toll-like receptor 4 activation through regulation of receptor dimerization and recruitment into lipid rafts in a reactive oxygen species-dependent manner. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 40, p. 27384-27392, Oct. 2, 2009.

WOOLSEY, A. M.; SUNWOO, L.; PETERSEN, C. A.; BRACHMANN, S. M.; CANTLEY, L. C.; BURLEIGH, B. A. Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. **Journal of Cell Science**, v. 116, n. Pt 17, p. 3611-3622, Sep. 1, 2003.

XIE, Q. W.; WHISNANT, R.; NATHAN, C. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. **Journal of Experimental Medicine**, v. 177, n. 6, p. 1779-1784, Jun. 1, 1993.

YAQOOB, P.; PALA, H. S.; CORTINA-BORJA, M.; NEWSHOLME, E. A.; CALDER, P. C. Encapsulated fish oil enriched in alpha-tocopherol alters plasma phospholipid and mononuclear cell fatty acid compositions but not mononuclear cell functions. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 30, n. 3, p. 260-274, Mar. 2000.

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 1, p. 87-111, Mar. 2006.

YOSHIDA, N. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. **Parasite Immunology**, v. 57, n. 2, p. 105-109, Jun. 2008.

ZHANG, H. G.; GRIZZLE, W. E. Exosomes: a novel pathway of local and distant intercellular communication that facilitates the growth and metastasis of neoplastic lesions. **American Journal of Pathology**, v. 184, n. 1, p. 28-41, Jan. 2014.

ZHANG, M.; FRITSCHKE, K. L. Fatty acid-mediated inhibition of IL-12 production by murine macrophages is independent of PPARgamma. **British Journal of Nutrition**, v. 91, n. 5, p. 733-739, May 2004.

ZHAO, Y.; JOSHI-BARVE, S.; BARVE, S.; CHEN, L. H. Eicosapentaenoic acid prevents LPS-induced TNF-alpha expression by preventing NF-kappaB activation. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 23, n. 1, p. 71-78, Feb. 2004.

ZINGALES, B.; MILES, M. A.; CAMPBELL, D. A.; TIBAYRENC, M.; MACEDO, A. M.; TEIXEIRA, M. M.; SCHIJMAN, A. G.; LLEWELLYN, M. S.; LAGES-SILVA, E.; MACHADO, C. R.; ANDRADE, S. G.; STURM, N. R. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infectious Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 240-253, Mar. 2012.