

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

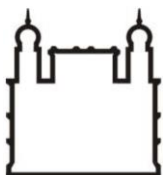
Doutorado em Biociências

VESÍCULAS EXTRACELULARES SECRETADAS POR *Trypanosoma cruzi* E A  
RELAÇÃO COM ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS NA MODULAÇÃO DA  
INFECÇÃO EXPERIMENTAL

MARIA ISABEL LOVO MARTINS BUSCH PEREIRA

Curitiba/PR

2018



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

Pós-Graduação em Biociências

MARIA ISABEL LOVO MARTINS BUSCH PEREIRA

VESÍCULAS EXTRACELULARES SECRETADAS POR *Trypanosoma cruzi* E A  
RELAÇÃO COM ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS NA MODULAÇÃO DA  
INFECÇÃO EXPERIMENTAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia do Instituto Carlos Chagas como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências.

Orientadores: Dr. Phileno Pinge Filho

Dra. Priscilla Fanini Wowk

CURITIBA/PR

2018

i

Pereira, Maria Isabel Lovo Martins Busch.

Vesículas extracelulares secretadas por *Trypanosoma cruzi* e a relação com ácidos graxos poli-insaturados na modulação da infecção experimental / Maria Isabel Lovo Martins Busch Pereira. - Curitiba, 2018.

137 f.; il.

(Doutorado) - Instituto Carlos Chagas, Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, 2018.

Orientador: Phileno Pinge Filho.

Co-orientadora: Priscilla Fanini Wowk.

Bibliografia: f. 96-123

1. imunomodulação. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. vesículas extracelulares. 4. ácidos graxos poli-insaturados n-3. 5. camundongo. I. Título.

VESÍCULAS EXTRACELULARES SECRETADAS POR *Trypanosoma cruzi* E A  
RELAÇÃO COM ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS NA MODULAÇÃO DA  
INFECÇÃO EXPERIMENTAL

Maria Isabel Lovo Martins Busch Pereira

TESE APRESENTADA AO INSTITUTO CARLOS CHAGAS DA FUNDAÇÃO  
OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ) COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS  
PARA À OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM BIOCÊNCIAS.

Examinada por:

---

Dra. Karina Alves de Toledo

---

Dra. Iara José de Messias Reason

---

Dr. Samuel Goldenberg

CURITIBA/PR

2018

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me capacitar a fazer coisas que sozinha eu não conseguiria, e por me lembrar disso quando necessário.

Ao meu marido Gabriel, meu maior incentivador, por tornar os meus objetivos também os dele. Obrigada por ser meu companheiro, pela sua compreensão e apoio.

A minha mãe Maria Augusta e a minha avó Maria Stella, por serem exemplos de que sempre podemos chegar um pouquinho mais longe do que pensamos ser capazes.

Aos meus orientadores Dr. Phileno Pinge Filho e Dra. Priscilla Fanini Wowk, com quem muito aprendi. Obrigada pela dedicação que sempre tiveram comigo, paciência, disponibilidade e confiança. Vocês são exemplos para mim.

A minha família, irmãos Luis Antônio e Luis Henrique, tia Dora, sobrinhos Thiago e Giovanna. Também a família do meu marido, cunhados André, Mariana, Daniel, Júlia, e sogros Thais e Clovis. Obrigada por muitas vezes entenderem minha ausência e por se envolverem de diversas maneiras, sempre disponíveis a me ajudar.

Aos colegas, que a convivência diária transformou em amigos mais que queridos, Bruno Lucchetti, Tassiani de Lara, Dra. Rosiane Valeriano, Dra. Vera Tatakihara, Helena Suzukawa, Dra. Sandra Lonien, Gabriella Ferreira, Jackson Myiamoto, Patrícia Morais, Rito Pereira. Obrigada pela parceria, empatia e colaboração de todos os dias.

Especialmente a Nágela Zanluqui, parceira inseparável no começo dessa jornada, e a Dra. Aparecida Malvezi, Cidinha, minha terceira orientadora, companheira e amiga.

Aos estagiários Raquel, Lucas, Giovanna e Caren, que apesar do pouco tempo de convívio sempre me ajudaram.

A todos os amigos que a convivência no Instituto Carlos Chagas me trouxe. Em especial ao Dr. Juliano Bordignon e a Dra. Ana Luiza Mosimann, que tantas vezes me receberam, tornando essa jornada mais leve.

A Dra. Priscilla e sua família, Célia, Maurício, Maylla e Rafael. Obrigada por me receberem com tanto carinho. Família que admiro e que considero um dos presentes que o doutorado me deu.

A Raquel, secretária da Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, por sempre ser tão atenciosa e solícita em tudo o que precisei.

A Universidade Estadual de Londrina, departamento de Patologia Experimental, por me receberem durante o desenvolvimento dos experimentos. Também aos Professores Dra. Marli Martins Pinge, Dra. Sueli Ogatta, Dra. Lucy Yamauchi, Dr. Fábio Kwasniewski, Dr. Waldiceu Verri Jr. e Dr. Wander Pavanelli, pela disponibilidade para discutir protocolos, resultados e perspectivas.

Aos técnicos e funcionários do departamento de Patologia Experimental da UEL, Jesus, Pedro, Adernaldo, Enéias e Tatiane. Obrigada por sempre estarem dispostos a ajudar e me ensinar.

Ao biotério do Instituto Carlos Chagas /Fiocruz-PR, em especial ao coordenador Dr. Giovanni A. C. A. Mazzarotto e à Tania do Rocio Schepainski.

A Dra. Patrícia Bozza, por ter sido tão receptiva em me auxiliar na interpretação de resultados.

As amigas de UEL, Vanessa Jacob e Fernanda C. de Campos e as amigas que conquistei ao longo da vida. Obrigada pelo incentivo e por me distraírem quando necessário.

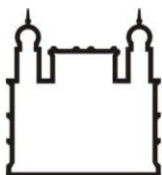
Ao CNPq e Fundação Araucária, pelo suporte financeiro.

À minha mãe Maria Augusta,  
ao meu pai João Batista,  
ao meu marido Gabriel,  
e ao meu irmão Luis Antônio.  
Não importa onde e quando,  
levo sempre vocês comigo.

*“A ciência sem religião é manca;  
A religião sem ciência é cega.”*

Albert Einstein





Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## INSTITUTO CARLOS CHAGAS

Vesículas extracelulares secretadas por *Trypanosoma cruzi* e a relação com ácidos graxos poli-insaturados na modulação da infecção experimental

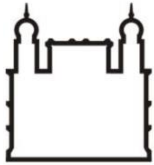
### RESUMO

#### TESE DE DOUTORADO

Maria Isabel Lovo Martins Busch Pereira

Durante a infecção por *Trypanosoma cruzi* a resposta imunológica é importante para o controle do parasitismo e sobrevivência do hospedeiro. Contudo, o parasito apresenta mecanismos de evasão que garantem sua persistência e o desenvolvimento da fase crônica da infecção. As vesículas extracelulares de *T. cruzi* Y (EVs Y) participam da comunicação intercelular ao carregarem moléculas funcionais que sinalizam para células do hospedeiro podendo modular a resposta imunológica a favor do parasito. A suplementação de dietas com ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) *n*-3 tem sido associada com redução da inflamação e modulação da resistência às infecções. Nosso grupo mostrou recentemente que a suplementação oral com óleo de peixe é benéfica para o hospedeiro durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*. O objetivo da tese foi avaliar os efeitos imunopatológicos das EVs Y, assim como a sua associação à ação imunomoduladora dos PUFAs na patogênese da doença de Chagas experimental. Camundongos C57BL/6 que receberam o inóculo de EV Y previamente à infecção por *T. cruzi* apresentaram maior parasitemia, maior parasitismo cardíaco, diminuição dos níveis de óxido nítrico (NO) plasmático e daquele produzido por células esplênicas. As EVs Y também modularam a produção de citocinas pró-inflamatórias, com redução do TNF- $\alpha$  plasmático e menor produção de TNF- $\alpha$  e de IL-6 por células esplênicas obtidas de animais infectados. Em ensaios *in vitro* utilizando macrófagos, o estímulo com EVs Y previamente à infecção por *T. cruzi* aumentou a internalização de amastigotas assim como a liberação de formas tripomastigotas. Neste mesmo cenário, as EVs Y induziram a formação de corpos lipídicos e a produção de prostaglandina E<sub>2</sub> em macrófagos, mesmo na ausência do *T. cruzi*, e diminuíram a produção de NO frente ao estímulo com LPS. A suplementação oral dos animais com óleo de milho (CO) ou óleo de peixe (FO) impediu o aumento da parasitemia em animais previamente tratados com EVs Y. Além disso, a estimulação com EVs Y não reduziu a produção de NO pelos esplenócitos dos animais suplementados com FO, indicando que a ingestão de FO rico em PUFAs *n*-3 impede os efeitos moduladores das EVs Y sobre a resposta dos animais à infecção. *In vitro*, o tratamento de macrófagos com ácido araquidônico associado às EVs Y aumentou a internalização de parasitos nessas células, enquanto o tratamento com ácido eicosapentaenóico associado às EVs Y diminuiu a internalização de parasitos. Macrófagos tratados com ácido linoleico ou oleico tiveram maior liberação de tripomastigotas, que foi potencializada pela associação desses ácidos graxos com EVs Y. Já nos macrófagos tratados com ácidos araquidônico, eicosapentaenóico ou docosahexaenóico não houve liberação de tripomastigotas, mesmo quando associados às EVs Y. Esses resultados sugerem que as EVs Y modulam a resposta do hospedeiro a favor do parasito enquanto os PUFAs *n*-3 interferem na modulação exercida pelas EVs Y.

Palavras-chave: imunomodulação; *Trypanosoma cruzi*; vesículas extracelulares; ácidos graxos poli-insaturados *n*-3; camundongo



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO CARLOS CHAGAS

Extracellular vesicles secreted by *Trypanosoma cruzi* and the relationship with polyunsaturated fatty acids in the modulation of experimental infection

ABSTRACT

PhD THESIS

Maria Isabel Lovo Martins Busch Pereira

During the infection by *Trypanosoma cruzi* the immune response is important for the control of parasitism and host survival. However, the parasite presents evasion mechanisms that work in favor of its chronic persistence. *T. cruzi* extracellular vesicles (EVs Y) has a role in intracellular communication by carrying functional molecules that signal to host cells and can modulate the immune response in favor of the parasite. The supplementation of diet with polyunsaturated fatty acids (PUFAs) n-3 has been associated with reduced inflammation and modulation of resistance to infections. Recently we showed that fish oil supplementation benefits the host during the acute phase of *T. cruzi* infection. Therefore, the objective of this work was to evaluate the immunopathological effects of EVs Y, as well as its association with the immunomodulatory action of PUFAs in the pathogenesis of experimental Chagas' disease. C57BL/6 mice that received the inoculum of EV Y prior to *T. cruzi* infection showed higher parasitemia, greater cardiac parasitism, decreased levels of plasma nitric oxide (NO) and that produced by splenic cells. The EVs Y also modulated the production of pro-inflammatory cytokines, with reduction of plasma TNF- $\alpha$  and lower production of TNF- $\alpha$  and IL-6 by spleen cells from infected animals. *In vitro* assays using macrophages, the stimulation with EVs Y prior to *T. cruzi* infection increased the parasites internalization rate as well as the release of trypomastigote forms by these cells. In this same scenario, EVs Y induced lipid bodies formation and prostaglandin E<sub>2</sub> release in macrophages even in the absence of *T. cruzi* infection and decreased NO production by LPS-stimulated macrophages. Oral supplementation of animals with corn oil (CO) or fish oil (FO) prevented the increase of parasitemia in animals pre-treated with EVs Y. In addition, stimulation with EVs Y did not abrogate NO production by splenocytes from animals supplemented with FO, indicating that ingestion of FO rich in n-3 PUFAs hinders the modulatory effects of EVs Y upon the response of animals to infection. *In vitro*, the treatment of macrophages with arachidonic acid associated with EVs Y increased the internalization of parasites in these cells, while the treatment with eicosapentaenoic acid associated with EVs Y decreased the internalization of parasites. Macrophages treated with linoleic or oleic acid had greater release of trypomastigotes, which was potentiated by the association of these fatty acids with EVs Y. In macrophages treated with arachidonic, eicosapentaenoic or docosahexaenoic acids there was no release of trypomastigotes, even when associated with EVs Y. These results suggest that EVs Y modulate the host response in favor of the parasite, while n-3 PUFAs interfere with the modulation exerted by EVs Y.

Keywords: immunomodulation; *Trypanosoma cruzi*; Extracellular vesicles; n-3 polyunsaturated fatty acids; mouse

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Transmissão e ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	5
Figura 1.2: Imunidade inata e adquirida durante a infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i>	14
Figura 1.3: Origem de vesículas extracelulares de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	25
Figura 1 (artigo): Previous inoculation of <i>T. cruzi</i> extracellular vesicles increases parasitemia and cardiac parasitism in C57BL/6 mice.....	42
Figura 2 (artigo): Inoculation of <i>T. cruzi</i> extracellular vesicles prior to infection decreases the plasmatic levels of nitric oxide and TNF- $\alpha$ in infected mice.....	43
Figura 3 (artigo): Inoculation of <i>T. cruzi</i> extracellular vesicles prior to infection decreases production of nitric oxide and cytokines by spleen cells from infected mice .....	44
Figura 4 (artigo): Previous inoculation of <i>T. cruzi</i> extracellular vesicles decreases production of nitric oxide in the peritoneal lavage of <i>T. cruzi</i> -infected mice.....	45
Figura 5 (artigo): Previous inoculation of <i>T. cruzi</i> extracellular vesicles alters the expression and frequency of surface activation molecules in macrophages harvested from infected-mouse peritoneum .....	46
Figura 6 (artigo): Macrophage <i>in vitro</i> stimulation with <i>T. cruzi</i> extracellular vesicles increases <i>T. cruzi</i> infection and trypomastigote release from infected cells but decreases nitric oxide release .....	47
Figura 7 (artigo): <i>T. cruzi</i> extracellular vesicles induce lipid body formation and prostaglandin E <sub>2</sub> production by macrophages ( <i>in vitro</i> ) but not by spleen cells ( <i>ex vivo</i> ).....	48
Figura suplementar 1 (artigo): Nanoparticle tracking analysis of the extracellular vesicles isolated from <i>T. cruzi</i> Y .....	54
Figura 5.1: Desenho experimental da associação de suplementação oral com óleo de milho ou óleo de peixe e inoculação de vesículas extracelulares de <i>Trypanosoma cruzi</i> Y na infecção por <i>T. cruzi in vivo</i> .....	63
Figura 5.2: Controles de marcação para a imunofenotipagem de macrófagos .....	69
Figura 5.3. Efeito da inoculação de vesículas extracelulares de <i>Trypanosoma cruzi</i> Y sobre a parasitemia de camundongos C57BL/6 suplementados por via oral com óleo de milho ou óleo de peixe.....	75
Figura 5.4: Vesículas extracelulares de <i>Trypanosoma cruzi</i> Y não alteram a produção de óxido nítrico no plasma de camundongos suplementados com óleo de milho ou óleo de peixe .....	77

Figura 5.5: A suplementação com óleo de peixe impede que vesículas extracelulares de <i>Trypanosoma cruzi</i> Y diminuam a capacidade dos esplenócitos produzirem óxido nítrico .....	79
Figura 5.6: Estratégia de <i>gate</i> e imunofenotipagem de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6.....	83
Figura 5.7: Índice de internalização de amastigotas em macrófagos tratados com diferentes ácidos graxos e expostos às vesículas extracelulares de <i>Trypanosoma cruzi</i> Y .....	85
Figura 5.8: Modulação de ácidos graxos e vesículas extracelulares de <i>Trypanosoma cruzi</i> Y na liberação de parasitos no sobrenadante de macrófagos.....	87

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	- Ácido araquidônico
ADRP	- Proteína relacionada a diferenciação de adipócitos
AO	- Ácido oleico
BSA	- Soro albumina bovino
cAMP	-3',5'-monofosfato cíclico de adenosina
CBA	- <i>Cytometric Bead Array</i>
CD	- Grupo de diferenciação ( <i>cluster of differentiation</i> )
CEMIB	- Biotério central da Unicamp
CO	- Óleo de milho ( <i>corn oil</i> )
COX	- Ciclo-oxigenases
CRP	- Proteína reguladora do complemento
DHA	- Ácido docosahexaenóico
DMEM	- <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DTUs	- <i>Discrete typing units</i>
EPA	- Ácido eicosapentaenóico
ESCRT	- Complexo de Triagem Endossomal Necessário para Transporte ( <i>endosomal sorting complex required for transport</i> )
EVs Y	- Vesículas extracelulares de <i>T. cruzi</i> Y ( <i>extracellular vesicles</i> )
FITC	- Isotiocianato de fluoresceína
FO	- Óleo de peixe ( <i>fish oil</i> )
M-CSF	- Fator estimulador de colônia macrófago
GMP	- Guanosina 3', 5'-cíclica monofosfato
gp	- Glicoproteína
GPI	- Glicosilfosfatidilinositol
GTP	- Guanosina trifosfato
HE	- Hematoxilina e Eosina
HEPES	- Ácido 4-(2-HidroxiEtil)-1-PiperazinEtanolSulfônico
IFN-	- Interferon-
Ig-	- Imunoglobulina
IL-	- Interleucina
ILVs	- Vesículas intraluminais
ISEV	- Sociedade internacional de vesículas extracelulares ( <i>International Society for Extracellular Vesicles</i> )

LA	- Ácido $\alpha$ -linoleico
LAMP	- Proteína associada a membrana do lisossomo
LDL	- Lipoproteína de baixa densidade
LOX	- Lipo-oxigenase
LPS	- Lipopolissacarídeo
LT	- Leucotrienos
LX	- Lipoxinas
MAC	- complexo de ataque a membrana
MBL	- Lectinas ligadoras de manose
MCP-1	- Quimiocina quimio-atraente de monócito
MHC	- Complexo principal de histocompatibilidade
MIF	- Mediana de intensidade de fluorescência
MMP-	- Metaloproteinases
MOI	- Multiplicidade de infecção
MUFA	- Ácidos graxos mono-insaturado
MVBs	- Corpos multivesiculares
MVs	- Microvesículas
NADPH-	- Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NF $\kappa$ B	- Fator Nuclear $\kappa$ B
NK	- Células matadoras naturais ( <i>natural killers</i> ),
NO	- Óxido nítrico
NOD- <i>like</i>	- Receptor tipo domínio de oligomerização de nucleotídeo
NOS	- Óxido nítrico sintase
NTA	- <i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>
PAMPs	- Padrões moleculares a patógenos
PBS	- Tampão salina-fosfato
PCR	- Proteínas C reativa
PDNF	- Fator neurotrófico derivado do parasito
PE	- Ficoeritrina
PECy5	- Ficoeritrina + cianina
PG	- Prostaglandina
PI-3K	- Fosfatidilinositol-3-quinase
PMA	- Forbol 12-miristato 13-acetato
PPAR- $\gamma$	- Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma
PRRs	- Receptores de reconhecimento de padrões

PUFAs	- Ácidos graxos poli-insaturados
RPMI-1640	- <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SBF	- Soro bovino fetal
SOD	- Superóxido desmutases
TcAg	- Antígeno de <i>T. cruzi</i>
TCH	- Tiocarbohidrazida
TGF-	- Fator de crescimento tumoral
Th-	- linfócitos T auxiliares (linfócitos T <i>helper</i> Th)
TLR-	- Receptor do tipo <i>Toll</i>
TNF- $\alpha$	- fator de necrose tumoral alfa
Trk	- Trirosina quinase
Ts	- Transialidase
TSA-1	- Glicoproteína de superfície de tripomastigota-1
TX	- Tromboxanos

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i> E DOENÇA DE CHAGAS .....	1
1.2 MECANISMOS DE INVASÃO CELULAR PELO PROTOZOÁRIO <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	7
1.3 RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA INFECÇÃO POR <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	12
1.4 CLASSIFICAÇÃO E ORIGEM DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES .....	21
1.5 VESÍCULAS EXTRACELULARES DE <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	24
1.6 ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS E RESPOSTA IMUNOLÓGICA .....	28
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>35</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>36</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	36
<b>4 CAPÍTULO I: Artigo publicado na revista <i>Frontiers in immunology</i></b> .....	<b>37</b>
4.1 <i>EXTRACELLULAR VESICLES SHED BY Trypanosoma cruzi</i> POTENTIATE INFECTION AND <i>ELICIT LIPID BODY FORMATION AND PGE<sub>2</sub> PRODUCTION IN MURINE MACROPHAGES</i> .....	38
4.2 CONCLUSÃO DO CAPÍTULO I .....	55
<b>5 CAPÍTULO II – Efeitos dos ácidos graxos poli-insaturados <i>n</i>-3 na patogênese das vesículas extracelulares liberadas por <i>Trypanosoma cruzi</i> durante a infecção experimental murina</b> .....	<b>57</b>
5.1 MATERIAIS E MÉTODOS REFERENTES AOS RESULTADOS DO CAPÍTULO II .....	58
5.1.1 MEIOS DE CULTIVO CELULAR, SOLUÇÕES E REAGENTES .....	58
5.1.2 APROVAÇÃO DO PROJETO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS .....	59
5.1.3 MANUTENÇÃO DA CEPA Y DE <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	59
5.1.4 ANIMAIS C57BL/6 .....	60
5.1.5 OBTENÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE <i>Trypanosoma cruzi</i> Y .....	60
5.1.6 ANÁLISE DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DE <i>Trypanosoma cruzi</i> Y POR <i>NANOPARTICLE TRACKING ANALYSIS</i> (MONITORAMENTO DE MOVIMENTO).....	61
5.1.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL <i>in vivo</i> .....	62
5.1.8 PARASITEMIA .....	64
5.1.9 PREPARO DO ANTÍGENO DE <i>Trypanosoma cruzi</i> (TcAg).....	64
5.1.10 OBTENÇÃO E CULTIVO DE CÉLULAS DO BAÇO.....	64
5.1.11 QUANTIFICAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO NO PLASMA E SOBRENADANTE DE CULTURA DE CÉLULAS .....	65
5.1.12 SOBRENADANTE DE CÉLULAS L929 .....	66
5.1.13 OBTENÇÃO DE CÉLULAS DA MEDULA E DIFERENCIAÇÃO PARA MACRÓFAGOS ....	66
5.1.14 IMUNOFENOTIPAGEM DE MACRÓFAGOS .....	67



5.1.15 TRATAMENTO <i>in vitro</i> DOS MACRÓFAGOS COM ÁCIDOS GRAXOS E VESÍCULAS EXTRACELULARES DE <i>Trypanosoma cruzi</i> Y .....	68
5.1.16 ENSAIO DE INTERNALIZAÇÃO DE <i>Trypanosoma cruzi</i> EM MACRÓFAGOS.....	70
5.1.17 ENSAIO DE SAÍDA DE <i>Trypanosoma cruzi</i> DE MACRÓFAGOS.....	70
5.1.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	71
5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO - CAPÍTULO II .....	71
5.2.1 PERFIL DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES SECRETADAS POR <i>Trypanosoma cruzi</i> Y .....	71
5.2.2 A SUPLEMENTAÇÃO ORAL COM ÓLEO DE PEIXE OU ÓLEO DE MILHO IMPEDE O AUMENTO DA PARASITEMIA INDUZIDO PELO TRATAMENTO COM VESÍCULAS EXTRACELULARES DE <i>Trypanosoma cruzi</i> Y.....	73
5.2.3 ÓLEO DE PEIXE IMPEDE A MODULAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO VIA VESÍCULAS EXTRACELULARES DE <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	76
5.2.4 INTERNALIZAÇÃO E CONSEQUENTE LIBERAÇÃO DE <i>Trypanosoma cruzi</i> EM MACRÓFAGOS EXPOSTOS A DIFERENTES ÁCIDOS GRAXOS E VESÍCULAS EXTRACELULARES DE <i>T. CRUZI</i> .....	82
5.3 CONCLUSÃO - CAPÍTULO II.....	88
<b>6. DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>90</b>
<b>7. CONCLUSÃO FINAL.....</b>	<b>95</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>96</b>
<b>ANEXO I- Carta de aprovação da Comissão de ética no uso de animais.....</b>	<b>124</b>
<b>ANEXO II- Artigo publicado em 2017 na revista <i>Nutrition Research</i>. .....</b>	<b>125</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. *Trypanosoma cruzi* E DOENÇA DE CHAGAS

Há mais de cem anos, em 1909, o médico epidemiologista Carlos Chagas publicou um trabalho onde descrevia de forma completa e muito elegante a ocorrência de uma nova tripanossomíase humana. Nesse trabalho pioneiro foi descrito não só o agente etiológico causador dessa enfermidade, o *Trypanosoma cruzi*, mas também suas formas evolutivas, ciclo de vida, manifestações clínicas da doença e a epidemiologia (Chagas, 1909). Em homenagem ao seu mentor, Oswaldo Cruz, Carlos Chagas nomeou o novo parasito como *Trypanosoma cruzi*. E, em sua homenagem, essa nova tripanossomíase passou a ser denominada como doença de Chagas – que também é conhecida como tripanossomíase americana (Fernandes e Andrews, 2012).

Decorrido mais de um século após essa descoberta, estima-se que atualmente a doença de Chagas ainda atinja cerca de 6 a 7 milhões de pessoas em todo o mundo, principalmente na América Latina, podendo causar incapacitação dos indivíduos acometidos e mais de 10 mil mortes por ano (WHO, 2017). Como a maior parte das pessoas infectadas é de classe social baixa, e considerando as poucas políticas públicas de prevenção e tratamento, assim como o desinteresse da indústria farmacêutica, a doença de Chagas permanece sendo considerada pela Organização Mundial da Saúde como uma doença tropical negligenciada (WHO, 2012).

Apesar da infecção por *T. cruzi* ser característica dos países da América Latina, países não endêmicos também têm apresentado registros de novos casos de infecção. Essa transmissão se deve a intensa imigração de pessoas infectadas de áreas endêmicas para países não endêmicos para a doença de Chagas. Nesse cenário, a transmissão ocorre principalmente por via congênita, transfusões sanguíneas ou transplantes de órgãos (Andrade *et al.*, 2014). Estima-se que em torno de 238 mil pessoas infectadas por *T. cruzi* vivam atualmente nos Estados Unidos. Contudo, considerando que esse estudo não abrangeu imigrantes ilegais, esse número pode estar deixando de contabilizar em torno de 100 mil casos (Manne-Goehler *et al.*, 2016). Na Europa, estima-se que existam entre 59 mil a 108 mil casos de doença de Chagas, principalmente na Espanha e Itália. Embora a maior parte dos casos documentados sejam de pacientes crônicos, alguns casos agudos foram registrados. Em virtude disso, esses países mesmo sendo não endêmicos para a

doença de Chagas passaram a adotar testes para infecção por *T. cruzi* em bancos de sangue (Angheben *et al.*, 2011).

A história da doença de Chagas na América Latina remonta a mais de 9000 anos atrás, uma vez que DNA do *T. cruzi* foi descoberto em múmias do norte do Chile e sul do Peru (Aufderheide *et al.*, 2004). Embora a infecção por *T. cruzi* ocorresse principalmente na natureza entre triatomíneos e mamíferos, caracterizando o ciclo silvestre da infecção, a ocupação do ambiente silvestre pelo homem, principalmente em casas muito simples onde o inseto vetor consegue se alojar, transformou a doença em endêmica em algumas regiões. Além disso, o contato com animais silvestres infectados, tais como ratos, camundongos, morcegos e gambás aproximaram a doença dos humanos. Dessa forma, o homem e os animais domésticos passaram a constituir o ciclo doméstico e peridomiciliar do parasito (Forattini, 1980; Teixeira *et al.*, 2001; Coura e Dias, 2009).

O protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas, pertencente à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* (Chagas, 1909; Rassi *et al.*, 2012). O ciclo de vida do parasito *T. cruzi* é do tipo heteroxênico, alternando entre o hospedeiro vertebrado e o hospedeiro invertebrado (inseto vetor). No hospedeiro vertebrado o *T. cruzi* desenvolve uma fase de multiplicação intracelular, enquanto que no hospedeiro invertebrado a multiplicação é extracelular (revisado por Tyler e Engman 2001).

Conhecido popularmente como barbeiro, o hospedeiro invertebrado pertence à classe Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae, gêneros *Triatoma spp.*, *Panstrongylus spp.*, e *Rhodnius spp.* As principais espécies transmissoras de *T. cruzi* no Brasil são *Triatoma infestans*, *Triatoma sordida* e *Panstrongylus megistus* (De Souza, 1984; Toledo *et al.*, 1997).

Desde 1960 programas governamentais foram implantados com o objetivo de erradicar o inseto vetor. 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*; melhorar as condições de habitação e realizar a triagem de bolsas de sangue. Como resultado o Brasil recebeu em 2006 o Certificado Internacional de Eliminação da Transmissão da doença de Chagas (Hotez, 2011). Além disso, em 2008, a transmissão vetorial também foi interrompida no Chile e Uruguai (Schofield e 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 consideradas livres de insetos triatomíneos agora é possível encontrar insetos vetores parasitados. Nos últimos anos novos casos de doença de Chagas aguda têm sido relatados. No Brasil, a infecção oral por *T. cruzi* é atualmente a transmissão mais comum, associada ao consumo de açaí, fruto da palmeira ou caldo de cana contaminado (Andrade *et al.*, 2014).

Durante seu ciclo de vida, o *T. cruzi* apresenta diferentes formas que são classificadas de acordo com a forma geral da célula, a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e o local de emergência do flagelo a partir da bolsa flagelar (De Souza, 1984). São descritas quatro formas bem definidas: epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos, amastigotas e tripomastigotas sanguíneos. As formas epimastigotas apresentam flagelo e cinetoplasto localizados anteriormente ao núcleo, e estão presentes apenas no tubo digestivo do vetor e em meio de cultivo axênico. As formas tripomastigotas possuem flagelo e cinetoplasto localizados posteriormente ao núcleo, sendo essas as formas infectantes presentes no sangue do hospedeiro vertebrado e em culturas de células, enquanto as formas tripomastigotas metacíclicos constituem as formas infectantes liberadas pelo inseto vetor. As formas amastigotas constituem as formas proliferativas no interior de células do hospedeiro vertebrado ou em cultura de células, com pequeno flagelo (Brener, 1973; Tyler e Engman, 2001).

Considerando as variações existentes em relação à gravidade das infecções por *T. cruzi* diversas classificações filogenéticas foram propostas (Momen, 1999; Zingales *et al.*, 2009) baseadas em marcadores enzimáticos e no DNA presente no cinetoplasto (Devera *et al.*, 2003). Foram descritas, a princípio, duas linhagens genéticas principais denominadas *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, geneticamente heterogêneas (Recommendations from a satellite meeting, 1999; Fernandes *et al.*, 1999). Contudo, para padronizar a classificação das cepas e facilitar a comunicação entre pesquisadores que trabalham com *T. cruzi* foi proposto, em 2009, durante o XIII Congresso Internacional de Protistologia, XXV Encontro Anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia e XXXVI Encontro Anual em Pesquisa Básica em Doença de Chagas, a classificação das cepas de *T. cruzi* em seis diferentes DTUs (“Discrete typing units”), sendo elas identificadas por números romanos (DTU I a VI) (Zingales *et al.*, 2009; Zingales *et al.*, 2012). As DTUs são definidas como “o conjunto de características que são geneticamente mais relacionadas umas com as outras do que

com qualquer outro conjunto de características e que são identificáveis por marcadores genéticos, moleculares ou imunológicos comuns” (Tibayrenc, 1998).

Dentre as cepas relacionadas com a infecção em humanos podemos destacar as cepas Colombiana e Sylvio X10C11, que são pertencentes ao DTU I; a cepa Y, pertencente ao DTU II; e a cepa Tulahuen, pertencente ao DTU VI. Entre as cepas envolvidas com o ciclo silvestre do parasito pertencem ao DTU I as cepas Dm28c, G e YuYu; e ao DTU VI a cepa CL, assim como seu clone CL Brener (Zingales *et al.*, 2009).

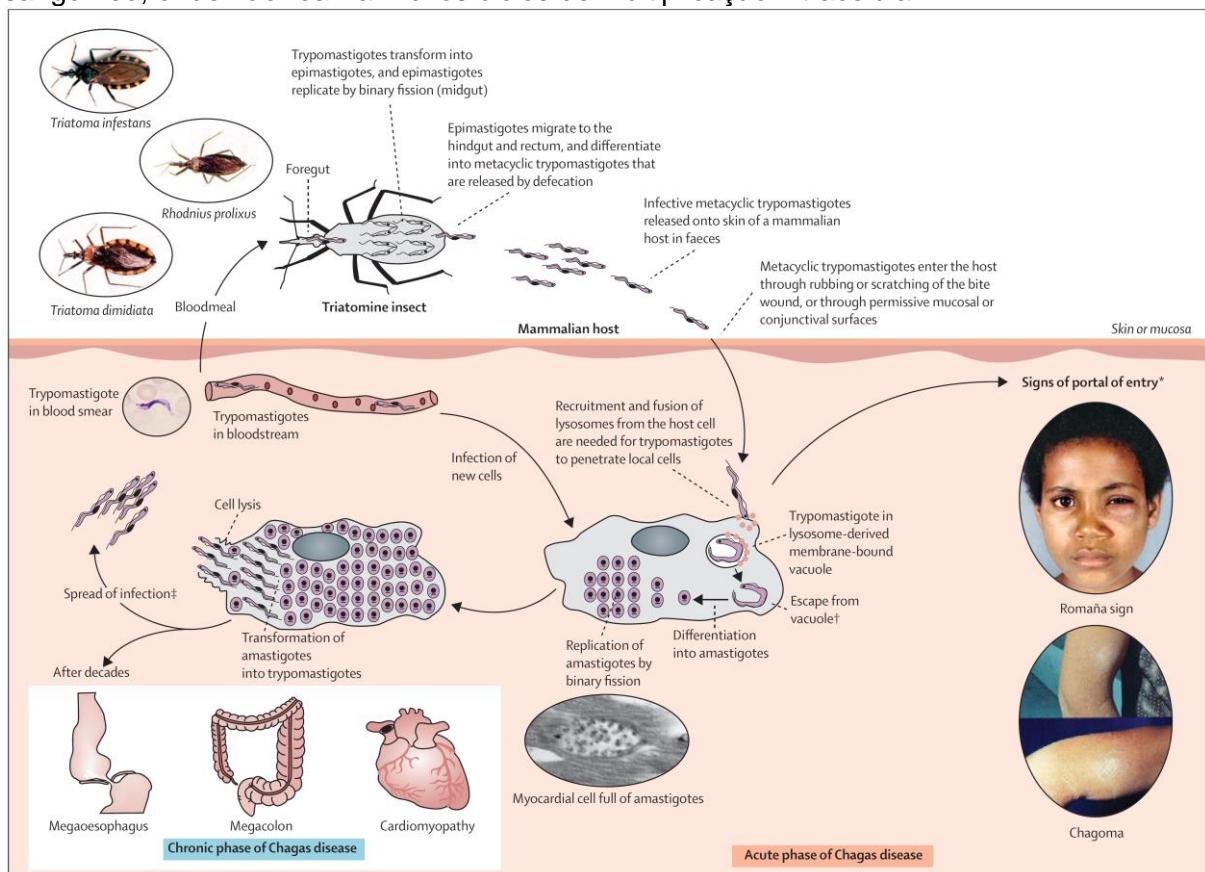
O ciclo biológico de *T. cruzi* tem início quando o vetor triatomíneo ingere formas tripomastigotas durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado (figura 1.1). No estômago do inseto vetor ocorre a transformação dessas formas tripomastigotas em epimastigotas. As epimastigotas aderem à superfície epitelial do intestino do inseto e se replicam por fissão binária. Os epimastigotas migram então para a porção final do intestino do inseto, onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos. Durante o repasto sanguíneo, os tripomastigotas metacíclicos são liberados juntamente com as fezes e urina do inseto vetor na pele do hospedeiro vertebrado (revisado por Rassi *et al.*, 2010; Bern, 2011). A saliva do inseto contém substâncias que desencadeiam resposta inflamatória no local da picada provocando sensação de prurido. Ao coçar a região da picada o parasito pode ser levado até a lesão na pele ou à mucosas (como a mucosa ocular), permitindo que o *T. cruzi* transpasse a barreira epitelial e inicie a infecção do hospedeiro vertebrado (Souza, 2000).

No hospedeiro vertebrado os tripomastigotas metacíclicos infectam, inicialmente, as células próximas ao local de inoculação, sendo infectadas tanto células fagocíticas como não fagocíticas. Posteriormente, após a replicação do parasito, as formas tripomastigotas - e até mesmo formas amastigotas - se disseminam pelo restante do organismo através da circulação sanguínea, infectam novas células, tornando a infecção sistêmica (Kahn *et al.*, 1996; Monteon *et al.*, 1996).

Uma vez no fagolisossomo o parasito consegue evadir da digestão celular em pH ácido pela secreção da proteína formadora de poros denominada Tc-Tox para o citoplasma da célula, onde se transforma em amastigota, sendo essa a forma replicativa intracelular do parasito (Andrews *et al.*, 1990). Inicia-se assim o ciclo de divisão intracelular, onde as formas amastigotas multiplicam-se por fissão binária com um tempo de duplicação de aproximadamente 12 horas e duração de 4 a 5 dias, diferenciando-se em tripomastigotas. Ao final desse processo, as formas

tripomastigotas rompem a célula e são liberados para o tecido adjacente e corrente sanguínea, completando o ciclo evolutivo do parasito através da infecção de novas células (Dvorak e Hyde, 1973). A lise prematura de algumas células libera formas amastigotas que também são capazes de invadir fagócitos e sobreviver à fagocitose, contribuindo dessa forma para a sustentação do ciclo de vida do parasito (Ley *et al.*, 1988; Mortara *et al.*, 2005; Mortara *et al.*, 2008).

**Figura 1.1: Transmissão e ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.** A penetração por formas tripomastigotas no hospedeiro vertebrado pode ocasionar a formação de sinais de porta de entrada, como o sinal de Romaña na mucosa ocular ou Chagoma de inoculação na pele. Ao infectar as células, os tripomastigotas escapam do vacúolo parasitóforo para citoplasma da célula, onde se diferenciam em formas amastigotas e iniciam a replicação por fissão binária. Após vários ciclos de replicação, quando a célula está repleta de formas amastigotas, estas se transformam novamente em tripomastigotas, rompem a membrana celular podendo invadir tecidos adjacentes e se disseminar para outros tecidos do hospedeiro via sistema linfático e sanguíneo, onde irão realizar novos ciclos de multiplicação intracelular.



**FONTE:** RASSI, A. JR., RASSI, A., MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. *Lancet* 375:1388–402. 2010.

A progressão da doença de Chagas caracteriza-se pela existência de três fases: aguda, indeterminada e crônica. Na fase aguda é possível encontrar parasitemia associada a sintomas inespecíficos, como febre, mal-estar, hepatoesplenomegalia e linfocitose atípica, embora alguns pacientes possam passar

sem sintomas clínicos. Após a fase aguda, a resposta imunológica do hospedeiro consegue manter a carga parasitária controlada sem que haja, no entanto, completa eliminação dos parasitos (Bern, 2015). A maior parte dos pacientes nessa fase permanecem assintomáticos, caracterizando a fase indeterminada da doença. Cerca de 20% a 30% dos pacientes evoluem para a fase crônica da doença e passam a manifestar, décadas após a infecção, cardiomiopatia chagásica, levando a quadros de arritmias, tromboembolismo e falência cardíaca. Outros 15% a 20% desenvolvem sequelas digestivas, como mega-cólon e mega-esôfago (Rassi *et al.*, 2010).

Existem dois fármacos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas. O benzonidazol (Rochagan®, Roche Pharmaceutical, cuja patente foi doada ao Ministério da Saúde, Brasil), um derivado de nitroimidazol, é considerado o fármaco de primeira escolha, apesar de ocasionar graves efeitos colaterais. Outro fármaco disponível, o Nifurtimox (Lampit®, Bayer Healthcare), da classe das nitrofurantoína, têm sua eficácia menos evidente em relação ao benzonidazol e também apresenta sérios efeitos colaterais. Ambas as drogas apresentam maior eficiência quando administradas durante a fase aguda da doença de Chagas (Bern *et al.*, 2007). Justamente em função dos sintomas de fase aguda serem inespecíficos, a grande maioria das infecções não é diagnosticada durante este período. Nos surtos de transmissão oral relatados nos últimos anos, a intensidade dos sintomas permitiu o diagnóstico desses pacientes ainda no início da infecção. Nesses casos de infecção oral observou-se maior incidência de miocardite e mortalidade na fase aguda da infecção em comparação com o que ocorre em casos de transmissão vetorial (Bern *et al.*, 2011; Shikanai-Yasuda e Carvalho, 2012).

A sobrevivência durante a fase aguda da infecção requer uma resposta inflamatória envolvendo células da imunidade inata, como macrófagos, células dendríticas e *natural killers* enquanto na fase crônica a imunidade adquirida, mediada por linfócitos T, mantem a replicação do parasito sob controle (Machado *et al.*, 2012). Contudo, evidências sugerem que a resposta inflamatória exacerbada do hospedeiro é um dos fatores mais determinantes da progressão da doença de Chagas, juntamente com a virulência e tropismo da cepa (Marin-Neto *et al.*, 2007; Dutra *et al.*, 2014). Embora a patogênese da cardiomiopatia chagásica ainda não seja completamente conhecida, existe um consenso de que a persistência do parasito é essencial para a doença, o que leva a necessidade urgente de novos tratamentos tripanocidas que tenham alta eficácia na fase crônica da doença (Marin-Neto *et al.*, 2007; Rassi *et al.*, 2010). Também a presença de auto-anticorpos em pacientes com

cardiomiopatia chagásica apontam uma possível participação de autoimunidade na patogênese da doença de Chagas, embora os mecanismos dessa patogênese ainda sejam desconhecidos (Bonney e Engman, 2015).

A eficácia do benzonidazol durante a fase crônica da doença de Chagas foi avaliada no projeto denominado BENEFIT (*Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis*). Esse estudo prospectivo, multicêntrico e randomizado envolveu 2854 pacientes com cardiomiopatia chagásica estabelecida que receberam benzonidazol ou placebo por pelo menos 80 dias e posteriormente foram acompanhados durante 5 anos, período onde foi avaliado tanto a carga parasitária como a evolução clínica dos pacientes. A terapia com benzonidazol nesses pacientes crônicos reduziu de forma significativa a detecção de *T. cruzi* no sangue (avaliado por PCR), contudo, não foi capaz de reduzir significativamente a deterioração cardíaca clínica avaliada durante os 5 anos de acompanhamento do estudo (Morillo *et al.*, 2015).

A grande maioria dos trabalhos que estudam os mecanismos de patogênese envolvidos com a cardiomiopatia chagásica crônica abordam dois aspectos principais: autoimunidade e persistência do parasito. Ainda assim, não está descartada a possibilidade de que outros mecanismos patogênicos ainda não conhecidos estejam envolvidos. Somado a isso, a gravidade da doença depende de características específicas de cada infecção, como o tropismo tecidual e capacidade de estabelecer infecção crônica de cada cepa de *T. cruzi* assim como dos polimorfismos genéticos do hospedeiro, que podem afetar a produção de citocinas e até mesmo modular a gravidade da infecção (Bonney e Engman, 2015).

## 1.2 MECANISMOS DE INVASÃO CELULAR PELO PROTOZOÁRIO *Trypanosoma cruzi*

Apesar de ainda não ter sido completamente elucidada, a interação entre a célula hospedeira e o *T. cruzi* pode ser didaticamente dividida em três eventos: a adesão do parasito à célula; os sinais intracelulares desencadeados por essa adesão; e finalmente a internalização do *T. cruzi* na célula (De Souza *et al.*, 2010).

No processo de adesão do parasito à célula hospedeira várias moléculas podem estar envolvidas. As mucinas, que são as principais glicoproteínas de superfície do *T. cruzi*, promovem adesão através da ligação dos seus resíduos de açúcar com a célula do hospedeiro mamífero (Villalta e Kierszenbaum, 1984; Yoshida *et al.*, 1989). Também outras glicoproteínas participam da adesão do *T. cruzi*. A



superfamília das gp85/ transialidases são formadas por várias proteínas que possuem motivos em comum com neuraminidases de bactérias, mas com uma região conservada específica de *T. cruzi* (VTVXNVFLYNR), dentre elas podemos citar a Tc85, gp85, gp82, TSA-1 e transialidases (Cross e Takle, 1993; Magdesian *et al.*, 2001). A proteína Tc85 é capaz de se ligar a componentes na membrana da célula, como a citoqueratina 18 (Magdesian *et al.*, 2001) ou mesmo a estruturas da matrix extracelular, como fibronectina (Ouaisi *et al.*, 1986) e laminina (Giordano *et al.*, 1999). As gp82 e gp35/50 são encontradas na superfície dos tripomastigotas metacíclicos e são altamente imunogênicas (Teixeira e Yoshida, 1986). Quando a infecção ocorre através da via oral, o sucesso do processo de invasão é determinado pela expressão de glicoproteínas de superfície do parasito, como gp82, gp35/50 e gp90, que são resistentes à degradação pelas enzimas da digestão e regulam a capacidade de invasão da mucosa gástrica em cada cepa do parasito (Yoshida, 2006; Yoshida, 2008).

As transialidases (Ts) compreendem mais de 140 enzimas que podem ser ativas ou inativas e estão presentes na superfície dos tripomastigotas ancoradas na membrana via glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Frasch, 2000). Durante a infecção, as transialidases são liberadas para o meio extracelular onde transferem ácido siálico das células do hospedeiro para as porções  $\beta$ -terminais dos glicoconjugados do *T. cruzi*, principalmente mucinas, uma vez que o parasito é incapaz de sintetizar o próprio ácido siálico (Previato *et al.*, 1985; Schenkman *et al.*, 1991). O ácido siálico na superfície do parasito está relacionado com maior infectividade (Pereira *et al.*, 1996) além de conferir resistência à lise pelo sistema complemento (Tomlinson *et al.*, 1994). No entanto, em todos os tripomastigotas que são liberados no sobrenadante de cultura de células, essa enzima está presente apenas em 20% a 30% dos tripomastigotas, sendo esses parasitos os que apresentam capacidade de infectar células de mamíferos. O significado biológico da expressão da transialidase em apenas uma pequena população de *T. cruzi*, apesar da morfologia ser idêntica entre os parasitos, ainda não é conhecido (Pereira *et al.*, 1996).

O *T. cruzi* também apresenta proteínas com atividades de proteases que estão envolvidas com a infecção de células do hospedeiro, como a cruzipaína, a oligopeptidase-B e a Tc80. A cruzipaína é uma cisteína protease descrita inicialmente no reservossomo de epimastigotas (Cazzulo *et al.*, 1990; Souto-Padron *et al.*, 1990), mas que também está presente na superfície de epimastigotas e na transição amastigota-tripomastigota. A cruzipaína é secretada pelo parasito e atua clivando

cininogênio de alto peso molecular do hospedeiro em pequenas cininas, que se ligam aos receptores de bradicinina do hospedeiro e estimulam o aumento transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  livre na célula (Scharfstein *et al.*, 2000). A Oligopeptidase-B é secretada por tripomastigotas e também atua induzindo um aumento transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  durante a invasão do *T. cruzi* (Burleigh *et al.*, 1997). Já a Tc80 é uma prolil-oligopeptidase que hidrolisa colágeno tipo I, tipo IV e fibronectina, sendo importante para a movimentação do parasito em tecidos (Grellier *et al.*, 2001) e para a infecção de células não-fagocíticas (Santana *et al.*, 1997).

Em relação as moléculas do hospedeiro, várias proteínas e glicoproteínas estão relacionadas com a adesão e reconhecimento do *T. cruzi*, dependendo do tipo de célula envolvida. A Lectina galectina-3 está relacionada com a adesão do *T. cruzi* à laminina da matrix extracelular e às células dendríticas (Moody *et al.*, 2000; Vray *et al.*, 2004) assim como em células do músculo liso de artérias (Kleshchenko *et al.*, 2004). Resíduos de carboidratos na superfície das células do hospedeiro também podem atuar como receptores (Barbosa e De Meirelles Mde, 1992). A ligação de tripomastigotas com o receptor de TGF- $\beta$  em células de mamíferos também desencadeia uma cascata de sinalização intracelular que facilita a entrada do parasito nas células (Hall e Pereira, 2000). Os receptores de bradicinina da célula do hospedeiro são ativados por cininas geradas por enzimas do parasito e provocam aumento transiente do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, evento chave na internalização do parasito (Scharfstein *et al.*, 2000). O *T. cruzi* também é capaz de estimular receptores de neurotrofinas tirosina cinase A e C (TrkA e TrkC) presentes em neurônios e células da glia através da secreção do fator neurotrófico derivado do parasito (PDNF, do inglês *parasite-derived neutrophic factor*), promovendo a sobrevivência dessas células do sistema nervoso.

Após a adesão, o *T. cruzi* invade a célula num processo semelhante à endocitose, que pode ocorrer por diversos mecanismos, dentre eles por fagocitose, macropinocitose, autofagia, endocitose mediada por receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL), através de endocitose mediada por *rafts* lipídicos ou ainda via mecanismos de reparo da membrana citoplasmática da célula hospedeira. Todos esses mecanismos culminam com a formação de um compartimento intracelular chamado vacúolo parasitóforo (Tanowitz *et al.*, 1975; Nogueira e Cohn, 1976; Araújo-Jorge, 1989; Fernandes *et al.*, 2011; Barrias *et al.*, 2013).

A fagocitose foi o primeiro mecanismo descrito de internalização do *T. cruzi* em células de mamíferos, mais especificamente macrófagos peritoneais, células

L929, células HeLa e fibroblastos de embriões bovinos (Nogueira e Cohn, 1976). Posteriormente, a internalização de tripomastigotas via fagocitose também foi demonstrada em células do músculo cardíaco (Barbosa e Meirelles, 1995). Esses estudos indicam que apesar da fagocitose ser um mecanismo comum em células especializadas do sistema imunológico, esse mecanismo também ocorre na internalização do *T. cruzi* em células não fagocíticas. Após o contato do tripomastigotas com a membrana celular ocorre a ativação de proteínas tirosina-quinases com consequente recrutamento de fosfatidilinositol-3-quinase (PI-3K), levando à polimerização dos filamentos de actina e extensão dos pseudópodes (Vieira *et al.*, 1994).

A macropinocitose é uma via endocítica de células de mamíferos que pode ser induzida por ativação de vias de sinalização disparadas por fatores de crescimento e por estímulos externos que ativam receptores tirosina-quinases. Esse processo de endocitose é mediado por actina e envolve a formação de grandes extensões unilaterais da membrana plasmática (Kerr e Teasdale, 2009). A participação dessa via na internalização de tripomastigotas foi demonstrada em células fagocíticas e não-fagocíticas, com identificação de moléculas características de macropinocitose, tais como PI-3K, Rac e Cdc 42, no vacúolo parasitóforo. O bloqueio dessa via leva a menor internalização de amastigotas na célula, assim como o seu estímulo com PMA (forbol 12-miristato 13-acetato ativador de proteína cinase C) resulta em maior internalização de amastigotas (Barrias *et al.*, 2012).

Embora classicamente o processo de autofagia celular - que consiste em auto-degradação da célula - ocorra em situações de estresse nutricional, degradação de proteínas ou organelas, ou ainda durante o desenvolvimento do organismo, a internalização do *T. cruzi* por essa via parece ter papel chave na colonização de células de mamíferos. Isso foi demonstrado pela presença da proteína autofágica LC3 na membrana do vacúolo parasitóforo contendo o parasito, assim como pelo aumento da infecção de células tratadas com rapamicina, um agonista de mTOR e consequente ativador da via de autofagia. De forma complementar, o bloqueio da autofagia diminuiu a internalização de *T. cruzi* nas células. Adicionalmente, foi demonstrado que durante esse processo há o recrutamento de auto-lisossomos para os locais de entrada do parasito na membrana plasmática da célula, evento importante para a efetividade da infecção (Romano *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2011).

Outro mecanismo descrito de internalização de *T. cruzi* é através de microdomínios com função endocítica presentes na membrana plasmática, contendo

colesterol, glicolipídios e proteínas estruturais denominadas caveolina-1 e flotilina-1, as cavéolas. Durante a internalização do *T. cruzi*, marcadores moleculares de cavéolas foram observados na interface entre o parasito e a membrana plasmática da célula. A alteração dessa estrutura com o uso de drogas que removem o colesterol desses microdomínios diminuíram a infecção das células por *T. cruzi* (Barrias *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2007). Também o receptor de LDL foi descrito como um mecanismo importante na invasão e subsequente fusão do vacúolo parasitóforo com lisossomos, sugerindo portanto a participação de regiões ricas em clatrina, onde estão concentrados os receptores de LDL (Nagajyothi *et al.*, 2011).

Os lisossomos têm uma participação importante durante o processo de internalização do *T. cruzi*. Durante este processo em células não-fagocíticas por vias independentes de actina, lisossomos são mobilizados próximos à membrana plasmática, onde o parasito está aderido, ocorrendo a exocitose dos lisossomos no local. Esse transporte dos lisossomos ocorre via microtúbulos/cinesinas (Tardieux *et al.*, 1992; Rodriguez *et al.*, 1996). A fusão dos lisossomos com a membrana plasmática é dependente do aumento intracelular transiente de  $Ca^{2+}$ , que por sua vez é potencializado pela elevação de cAMP (3',5'-monofosfato cíclico de adenosina) produzido pela ativação da enzima adenilato ciclase (Rodriguez *et al.*, 1999).

Apesar da via da exocitose de lisossomos dependente de  $Ca^{2+}$  ter sido considerada por algum tempo como a única maneira eficiente de internalização do *T. cruzi* em células não-fagocíticas, um novo processo, independente da exocitose de lisossomos, foi descrito em 2003. Nesse processo ocorre a formação de um vacúolo de membrana plasmática ao redor do parasito enriquecidos em produtos lipídicos da enzima fosfatidilinositol-3-cinase (PI-3K). Somente após a formação desse vacúolo é que começa a ocorrer, gradualmente, a fusão do lisossomo com o vacúolo parasitóforo. Enquanto o mecanismo dependente de exocitose de lisossomos é usado por aproximadamente 20% dos parasitos internalizados, a via dependente de PI-3k corresponde a cerca de 50% das internalizações de *T. cruzi* (Woolsey *et al.*, 2003). Ainda que tardiamente, a fusão com o lisossomo é de extrema importância para a entrada efetiva do parasito. Se a fusão com os lisossomos for inibida, o parasito não consegue completar a sua internalização e escapa novamente para o meio extracelular (Andrade e Andrews, 2004).

Outro mecanismo descrito para a internalização de *T. cruzi* nas células mostra que o parasito se utiliza de vias de reparo da membrana celular para efetivar sua entrada na célula. O *T. cruzi* é capaz de induzir lesões na membrana plasmática

da célula, ativando com isso vias de reparo que envolvem exocitose de lisossomos de forma dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ , exposição de esfingomielinase ácida no folheto externo da membrana plasmática e uma rápida endocitose que tem como objetivo a internalização da membrana lesionada, mas que acaba internalizando também o parasito. Dessa forma, o *T. cruzi* subverte mecanismos de reparo da membrana celular para infectar a célula hospedeira (Fernandes *et al.*, 2011).

### 1.3 RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA INFECÇÃO POR *Trypanosoma cruzi*

Durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi* ocorre o primeiro contato do parasito com a resposta imunológica do hospedeiro e, antes da resposta imune adquirida se desenvolver, a resposta imune inata precisa desempenhar papéis cruciais para a sobrevivência do hospedeiro e que influenciam diretamente o desfecho da doença durante a fase crônica. Dessa forma, cabe ao sistema imune inato iniciar uma resposta inflamatória nos tecidos infectados e conseqüentemente controlar a replicação e a disseminação do parasito. Caso essa resposta inflamatória tão importante no início da infecção se desenvolva sem controle e de forma exacerbada, o resultado é, além do controle parasitário, a ocorrência de lesões teciduais (Junqueira *et al.*, 2010; Andrade *et al.*, 2014).

O sistema complemento consiste num dos primeiros eventos da resposta imune inata que ocorre em resposta a infecções. Esse sistema consiste em proteínas solúveis e de membrana que, ao interagirem com patógenos, ativam uma cascata de proteases que eliminam o micro-organismo invasor. As três possíveis vias de ativação do sistema complemento, clássica, alternativa e das lectinas, convergem para a produção de C3 convertase, seguido de C5 convertase, levando a formação do complexo de ataque a membrana (MAC) e conseqüente lise do patógeno (Cardoso *et al.*, 2015). Na infecção por *T. cruzi*, principalmente após o primeiro ciclo de replicação do parasito, ocorre a ativação do sistema complemento sobre parasitos extracelulares. No entanto, é importante considerar que essas interações são dependentes da forma evolutiva do parasito. O complemento pode ser ativado em amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas, mas apenas as formas epimastigotas são susceptíveis à lise pelo sistema complemento (Lidani *et al.*, 2017). Isso ocorre devido aos mecanismos de escape do *T. cruzi*, discutidos ao final desse capítulo.

A ativação das células do sistema imunológico tem início através do reconhecimento de Padrões Moleculares Associados à Patógenos (PAMPs) do

parasito pelos Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs) das células dos mamíferos (Rodrigues *et al.*, 2012). 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 parasito (Bafica *et al.*, 2006; Gazzinelli e Denkers, 2006; Pellegrini *et al.*, 2011). O reconhecimento de glicoproteínas do parasito por receptores TLR2 desencadeia, em macrófagos, sinalização via Fator Nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), ativação de interferons e fagocitose mediada por ativação de Rab5 (Ropert *et al.*, 2001; Maganto-Garcia *et al.*, 2008). Os receptores intracelulares TLR-9, TLR-7, NOD-*like*, helicases RIG-*like* são responsáveis por reconhecerem estruturas específicas do parasito, como RNA ou DNA genômico, já dentro da célula (Meylan *et al.*, 2006; Tarleton, 2007; Rodrigues *et al.*, 2012).

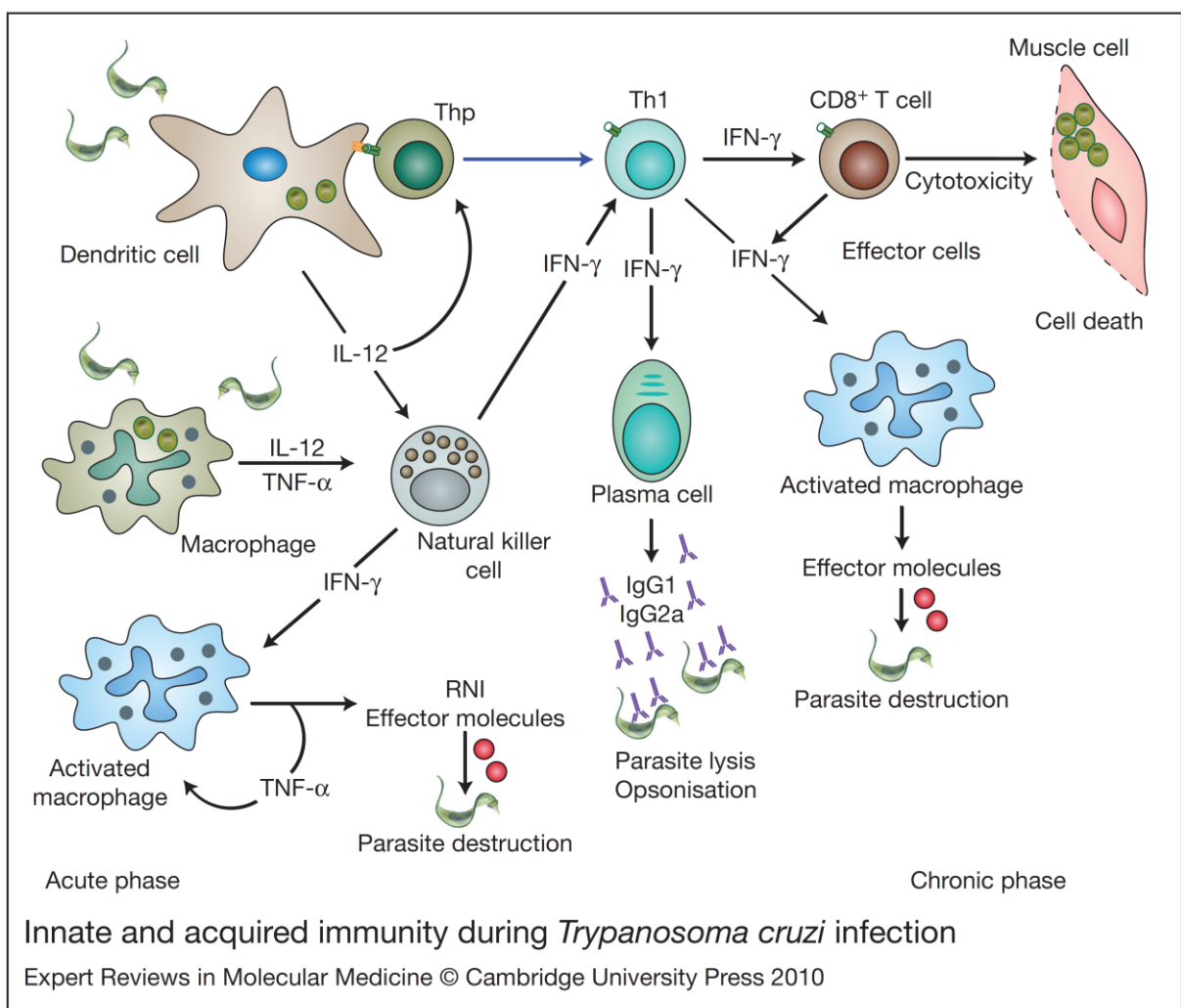
Além dos receptores TLR e NOD-1 estarem envolvidos no controle do *T. cruzi*, mais recentemente o papel dos inflamassomas também foi descrito no controle da infecção. Durante a infecção por *T. cruzi* a ativação do complexo inflamassoma NLRP3 e caspase-1 induz a secreção de IL1 $\beta$  de forma dependente de Catepsina B. Animais NLRP3<sup>-/-</sup> e caspase-1<sup>-/-</sup> apresentam altos picos de parasitemia, semelhantes aos observados nos animais sabidamente susceptíveis MyD88<sup>-/-</sup> e iNOS<sup>-/-</sup>, indicando o papel do inflamassoma NLRP3 no controle da fase aguda da infecção por *T. cruzi*. Adicionalmente, esses animais mostraram diminuição severa na produção de NO e redução na capacidade tripanocida de macrófagos (Goncalves *et al.*, 2013).

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 fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) por essas células. Essas citocinas ativam as células *natural killers* (NK), que passam a secretar interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) (Aliberti *et al.*, 1996). Também já foi mostrado que monócitos são capazes de produzir IL-12 e ativar células NK, que respondem produzindo IFN- $\gamma$  (Guilmot *et al.*, 2013). Já a presença de IFN- $\gamma$  é capaz de ativar ainda mais os macrófagos, potencializado a produção de citocinas pró-inflamatórias e de mediadores com atividade tripanocida por essas células (figura 1.2, fase aguda) (Cardillo *et al.*, 2002).

Ao mesmo tempo que as células do sistema imune 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- $\gamma$  secretado por células NK e linfócitos Th1 ativados também participa

do recrutamento de células T induzindo a expressão local de quimiocinas e moléculas de adesão (Lannes-Vieira, 2003).

**Figura 1.2: Imunidade inata e adquirida durante a infecção por *Trypanosoma cruzi*.** Nos estágios iniciais da infecção as células do sistema imune inato (macrófagos, *Natural Killers*-NK, e células dendríticas) produzem citocinas (IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) e moléculas efetoras (reativos intermediários do nitrogênio e GTPases induzidas por IFN) que controlam a replicação do parasito. Ao mesmo tempo, células do sistema imunológico, particularmente 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 *helper* 1 (Th1) CD4<sup>+</sup> assim como de células T CD8<sup>+</sup> e de linfócitos B. O IFN- $\gamma$  produzido pelas células CD4<sup>+</sup> Th1 ou T CD8<sup>+</sup> ativam a maquinaria efetora em macrófagos para destruir amastigotas intracelulares. Anticorpos produzidos por células B promovem a lise de formas tripomastigotas ou facilitam a fagocitose de parasitos opsonizados com IgG.



**FONTE:** JUNQUEIRA *et al.*, The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert Reviews in Molecular Medicine**. 12:1-23. 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<sup>+</sup>. Essas células citotóxicas exercem um importante papel no controle parasitário durante os estágios iniciais da

infecção (Tarleton *et al.*, 1992; Reis *et al.*, 1993) (figura 1.2, fase crônica). 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 (Cunha-Neto *et al.*, 2009). 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 (Cunha-Neto e Kalil, 2001).

Os linfócitos T auxiliares (linfócitos T *helper* Th) desempenham a função de regentes da resposta imunológica via produção de citocinas (Andrade *et al.*, 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. O tratamento *in vitro* de macrófagos com citocinas associadas ao padrão Th1, como IFN- $\gamma$ , IL-12 e TNF- $\alpha$  resulta em eficiente ativação dos macrófagos com conseqüente morte das formas amastigotas intracelulares (figura 1.2, fase crônica). Por outro lado, o tratamento *in vitro* com citocinas do padrão Th2, tais como o fator de crescimento tumoral (TGF- $\beta$ ) 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, 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* (Taylor *et al.*, 2006).

Como exposto anteriormente, a resposta imunológica exacerbada, apesar de controlar o parasitismo, ocasiona lesões teciduais prejudiciais ao hospedeiro. Nesse sentido, 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, representando um fator-chave na prevenção de lesão por excesso de inflamação no hospedeiro. O papel essencial da IL-10 nesse contexto de imunomodulação foi ilustrado por experimentos mostrando o papel dessa citocina na modulação da resposta inflamatória desencadeada por TNF- $\alpha$  em camundongos infectados por *T. cruzi* (Holscher *et al.*, 2000). Também a citocina IL-17, que em outros contextos apresenta atividade pró-inflamatória, está associada



ao controle da inflamação cardíaca via modulação da resposta Th1 em camundongos na fase aguda da infecção por *T. cruzi* (Da Matta Guedes *et al.*, 2010).

A imunidade humoral também tem sua função na resposta imune ao *T. cruzi*. A importância dos anticorpos produzidos pelos linfócitos B 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 1.1, fase crônica) (Krettl e Brener, 1976; Kierszenbaum, 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 (Bonney e Engman, 2015).

Outra citocina pró-inflamatória produzida em resposta à infecção por *T. cruzi* é a IL-6. Essa citocina possui propriedades indutoras sobre a produção de anticorpos por células B e sobre a produção hepática de proteínas de fase aguda, além de induzir a diferenciação de linfócitos T citotóxicos (Truyens *et al.*, 1994; Panis *et al.*, 2011). Já na fase crônica da infecção, foi encontrada correlação entre os níveis de IL-6 e de proteína C reativa (PCR) com a progressão de pacientes crônicos sintomáticos para quadros de deterioração da função cardíaca (Lopez *et al.*, 2006). A citocina IL-1 $\beta$  é outro mediador pró-inflamatório associado ao desenvolvimento de cardiomiopatias em animais infectados por *T. cruzi*, tanto nos estágios iniciais como na fase crônica da doença (Petersen e Burleigh, 2003).

A produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos e células esplênicas, tanto *in vivo* como *in vitro* em resposta a infecção por *T. cruzi* foi descrita pela primeira vez por Tarleton (1988). Posteriormente, o estudo de Silva *et al.* (1995) relacionou o TNF- $\alpha$  a resistência do hospedeiro à infecção por *T. cruzi*. Além do TNF- $\alpha$ , o IFN- $\gamma$  também é uma importante citocina mediadora de resistência à infecção por *T. cruzi*. O IFN- $\gamma$  atua induzindo a ativação de macrófagos, sendo essencial para a produção da molécula tripanocida óxido nítrico (NO) por essas células (Vespa *et al.*, 1994; Cardillo *et al.*, 2002). Além do IFN- $\gamma$ , os interferons do tipo I (IFN- $\alpha$  e  $\beta$ ) também exercem importante papel no controle da parasitemia na fase aguda da infecção via produção de NO (Costa *et al.*, 2006).

O NO é uma espécie radicalar livre produzido por meio da ação de isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS), dependentes de NADPH. Estas

enzimas são classificadas em constitutivas e cálcio-dependentes (cNOS, nNOS ou NOS I, eNOS ou NOS III), ou induzível e cálcio independente (iNOS ou NOS II). Essas enzimas oxidam a L-arginina, gerando L-citrulina e liberando a molécula de NO. Esse radical livre tem papel tanto em situações fisiológicas, como regulação do tônus vascular e neurotransmissão através do estímulo da síntese de GMP cíclico (Guanosina 3', 5'-cíclica monofosfato) mas também em processos patológicos (Stamler, 1994; Bloodsworth *et al.*, 2000). A molécula de NO é relativamente pequena e apresenta características lipofílicas, permitindo rápida difusão e reação com uma grande variedade de moléculas biológicas intracelulares, tais como metaloproteínas e outros radicais livres (superóxido, radicais alcoxil e peroxil) (Mayer e Hemmens, 1997).

Nos macrófagos, as citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  ativam as vias dos fatores de transcrição JAK/STAT e NF- $\kappa$ B, levando a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Xie *et al.*, 1993). Por outro lado, a citocina TGF- $\beta$ , pertencente ao padrão Th2, é descrita como a principal molécula capaz de controlar a produção de NO. O TGF- $\beta$  desencadeia alterações no mecanismo pós-transcricional da iNOS, desestabilizando e acelerando a degradação de seu mRNA, retardando dessa forma a síntese da proteína funcional (Macmicking *et al.*, 1997).

O próprio NO exerce efeito modulador sobre a ativação e expressão da iNOS e cNOS. Concentrações fisiológicas de NO inibem a transcrição da iNOS através da inativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, mantendo a atividade da cNOS (Colasanti *et al.*, 1995; Colasanti e Suzuki, 2000). Entretanto, quando os níveis de NO aumentam, o NF- $\kappa$ B deixa de ficar suprimido, criando condições para superexpressão da iNOS (Kanno *et al.*, 2000).

A produção de NO derivado da iNOS por macrófagos ativados é descrita como principal mecanismo microbicida em diversas infecções ocasionadas por patógenos intracelulares, como *Leishmania major*, *T. cruzi*, *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium falciparum* (Colasanti *et al.*, 2002).

Durante a infecção experimental por *T. cruzi*, o NO é descrito como o principal mecanismo efetor contra o parasito (Talvani *et al.*, 2002). Experimentos *in vivo* utilizando inibidores da produção de NO (Petray *et al.*, 1994) ou desenvolvidos com animais deficientes para a produção de iNOS (Holscher *et al.*, 1998) resultam em maior parasitemia e redução da sobrevivência dos animais durante a fase aguda da doença de Chagas.

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 (Inoue e Kawanishi, 1995). 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 (Naviliat *et al.*, 2005).

Em adição as citocinas e quimiocinas, durante resposta a infecção por *T. cruzi* há intensa produção dos mediadores lipídicos denominados eicosanóides, como leucotrienos e prostaglandinas (Machado *et al.*, 2012). 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 e Boyce, 2004). A partir dessa via são produzidas grandes quantidades de leucotrienos (LT) e tromboxanos (TX) instantes após a célula receber algum estímulo (Peters-Golden *et al.*, 2005). Estudos dos eicosanóides na infecção por *T. cruzi* mostraram que o LTB<sub>4</sub> induz fagocitose e morte de *T. cruzi* por macrófagos (Talvani *et al.*, 2002). O parasito também é capaz de produzir eicosanóides que modulam a resposta do hospedeiro a seu favor. O mediador lipídico TXA<sub>2</sub> é o principal eicosanóide liberado por todos os estágios do *T. cruzi* e desempenha um papel regulador da patogênese da doença de Chagas durante a infecção por *T. cruzi* (Ashton *et al.*, 2007).

As enzimas ciclo-oxigenases (COX) são as principais enzimas envolvidas com a produção de prostanóides, dentre eles as prostaglandinas. 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 (Adelizzi, 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 (Guerrero *et al.*, 2015). A prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), produto final da enzima PGE<sub>2</sub> sintase, possui propriedades pró-inflamatórias (Krause *et al.*, 2009) e também imunossupressoras (Van Der Pouw Kraan *et al.*, 1995). A PGE<sub>2</sub> também está associada a diminuição da fagocitose por macrófagos e redução da migração de monócitos em resposta a gradientes quimiotáticos (Panzer e Uguccioni, 2004; Aronoff *et al.*, 2004).

Em modelos experimentais de infecção aguda por *T. cruzi*, os níveis de PGF<sub>2α</sub>, TXB<sub>2</sub>, 6-oxo-PGF<sub>1α</sub> (Celentano *et al.*, 1995) e de PGE<sub>2</sub> (Cardoni e Antunez, 2004)

no plasma desses animais está aumentado. Adicionalmente, macrófagos de ratos infectados apresentam maior número de corpos lipídicos intracelulares, que são utilizados pelas COX-2 para a síntese de PGE<sub>2</sub> (D'Avila *et al.*, 2011). Recentemente, foi descrito que a PGE<sub>2</sub> exerce papel central no desenvolvimento de cardiomiopatias chagásicas (Guerrero *et al.*, 2015).

Durante a primeira semana de infecção por *T. cruzi*, a ativação da resposta imune adaptativa se desenvolve com estímulo para a proliferação substancial de linfócitos, em decorrência principalmente da citocina IL-2. Ao mesmo tempo em que a IL-2 é produzida, seus receptores são expressos na superfície das células T (IL-2R) e liberados na sua forma solúvel (sIL-2R) (Pakianathan e Kuhn, 1992), sob forte influência de moléculas inflamatórias como os leucotrienos (Marcinkiewicz *et al.*, 1997).

No entanto, em torno da segunda semana de infecção, ocorre um pico de imunossupressão, com baixa produção de IL-2 (Kierszenbaum *et al.*, 1994) e ausência de respostas proliferativas de linfócitos T frente à mitógenos, mediadas principalmente pela produção de NO e em parte por prostaglandinas (Pinge-Filho *et al.*, 1999). Nesta fase, também é relatada a presença de fatores supressores do parasito, como glicoproteínas de membrana, proteínas secretadas pelo parasito e antígenos de superfície (Kierszenbaum *et al.*, 1999).

A produção de prostaglandinas em altos níveis nos macrófagos diminuí a secreção de citocinas pró-inflamatórias, reduzindo também a apresentação de antígenos e a produção de radicais livres nessas células (Rangel Moreno *et al.*, 2002; Alvarez *et al.*, 2010). Adicionalmente, nosso grupo mostrou que a inibição farmacológica da enzima COX com aspirina em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c diminuí a internalização de tripomastigotas nessas células, com aumento da interleucina-1 $\beta$  (IL1- $\beta$ ), de óxido nítrico e possivelmente de lipoxinas (Malvezi *et al.*, 2014).

Apesar de todos os mecanismos de resposta imunológica e inflamação do hospedeiro que são ativados frente à infecção por *T. cruzi*, o parasito possui ainda mecanismos de escape que vão além da modulação de citocinas, e que permitem a sua sobrevivência dentro do hospedeiro (Cardoso *et al.*, 2015).

Como dito anteriormente, a fusão do vacúolo parasitóforo com lisossomo, formando o fagolisossomo, consiste num evento-chave na infecção de células pelo *T. cruzi* (Andrade e Andrews, 2004). A sobrevivência do parasito nesse meio ácido é mediada por uma rede de enzimas anti-oxidantes como peroxidases e superóxido

desmutases (SODs), que protegem o parasito de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio (Piacenza *et al.*, 2008). Na realidade, esse ambiente ácido é necessário ao *T. cruzi*, pois funciona como um sinal de ativação de mecanismos que levam ao seu escape para o citoplasma e sua diferenciação em formas amastigotas. A acidez promove a ativação de proteínas pré-formadas dos tripomastigotas, como a proteína Tc-Tox, que por sua vez promovem a desintegração da membrana do fagolisossomo (Andrews *et al.*, 1990; Fernandes e Andrews, 2012). As enzimas transialidases liberadas pelo parasito transferem o ácido siálico das proteínas LAMP para as mucinas na superfície do *T. cruzi*, desestabilizando a membrana do fagolisossomo (Hall *et al.*, 1992; Albertti *et al.*, 2010).

Ao infectar células fagocíticas, como os macrófagos, o *T. cruzi* encontra um ambiente extremamente oxidativo dentro do fagolisossomo, devido ao *burst* respiratório do macrófago e conseqüente produção de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio. Nesse contexto, as enzimas anti-oxidantes SOD e peroxidases são de extrema importância para a sobrevivência do parasito (Piacenza *et al.*, 2009; Piacenza *et al.*, 2013). Além disso, a permanência do parasito dentro do fagolisossomo é um evento transiente, que dura cerca de 24 h antes do seu escape para o citoplasma, onde permanece como amastigota a maior parte do tempo do seu ciclo intracelular. Especificamente nos macrófagos, o estresse oxidativo está envolvido com um outro aspecto favorável para o parasito, facilitando o acesso de ferro às amastigotas e favorecendo sua proliferação (Paiva *et al.*, 2012).

Enquanto permanece na forma intracelular o *T. cruzi* fica protegido da ação de anticorpos e do sistema complemento. Após a sua replicação, liberação no meio extracelular e disseminação pelo organismo, as proteínas do sistema complemento atuam sobre o *T. cruzi* na tentativa de promover sua lise. No entanto, o parasito possui uma série de moléculas que atuam bloqueando diferentes etapas da ativação do sistema complemento (Cestari *et al.*, 2013; Lidani *et al.*, 2017).

A molécula calreticulina, presente na superfície do *T. cruzi*, interfere na via clássica e na via das lectinas do sistema complemento ao se ligar a moléculas de reconhecimento padrão do hospedeiro, como C1q, lectinas ligadoras de manose (MBL) e ficolinas, impedindo a conversão de C4 em C4a e C4b (Ferreira *et al.*, 2004; Ramirez *et al.*, 2011; Sosoniuk *et al.*, 2014). Outra molécula encontrada tanto na superfície do *T. cruzi* como na forma solúvel, a proteína reguladora do complemento (CRP), foi descrita como desestabilizadora da C3 convertase, inibindo assim as vias clássica, alternativa e das lectinas do sistema complemento (Norris *et al.*, 1991; Norris,

1998). Outra proteína de membrana do *T. cruzi*, denominada CRIT (*Complement C2 receptor inhibition trispanning*) também impede a clivagem de C2 em C2a e a consequente ativação das vias clássicas e das lectinas (Cestari Idos *et al.*, 2008), enquanto a gp58/68 inibe a formação da C3 convertase por impedir a ligação do fator B ao C3b (Fischer *et al.*, 1988), impedindo a ativação das três vias do sistema complemento. Por fim, até mesmo vesículas liberadas por células infectadas do hospedeiro inibem o complexo C3 convertase (Cestari *et al.*, 2012).

A presença de uma ampla gama de regiões antigênicas no *T. cruzi* induzem, durante o início da resposta imune adaptativa, ainda durante a fase aguda da infecção, uma variada ativação policlonal de células B e de células T-CD8<sup>+</sup> (citotóxicas). No entanto, a maioria dos anticorpos gerados por esses vários clones de linfócitos B não são capazes de neutralizar a infecção, pois são direcionados a epítopos repetitivos do *T. cruzi*. Também os linfócitos T-CD8<sup>+</sup> gerados apresentam pouca eficiência na eliminação das células infectadas. Este mecanismo de escape do *T. cruzi* é denominado “cortina de fumaça” e contribuí para o atraso no desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa mais eficiente (Pitcovsky *et al.*, 2002; Bermejo *et al.*, 2011; Tarleton, 2015).

#### 1.4 CLASSIFICAÇÃO E ORIGEM DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES

Células eucariontes secretam vesículas extracelulares (EV, do inglês *extracellular vesicles*) que atuam na comunicação entre células, sem necessidade de contato físico entre elas. A comunicação através das EV ocorre tanto em situações fisiológicas como na relação entre patógeno-hospedeiro. Por esse motivo, cada vez mais as EVs têm sido reconhecidas como importantes reguladoras da função celular e da patogênese de doenças (revisado por Deolindo *et al.*, 2013; Marcilla *et al.*, 2014; Schorey e Harding, 2016).

Devido ao crescente interesse nos estudos envolvendo EVs, veio a necessidade de padronizar a nomenclatura utilizada. Em abril de 2012, a Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (*International Society for Extracellular Vesicles* – ISEV) estabeleceu três grupos onde EVs podem ser classificadas, de acordo com sua biogênese, tamanho e densidades: corpos apoptóticos, microvesículas e exossomos (Araldi *et al.*, 2012). Portanto, o termo vesículas extracelulares consiste numa denominação mais abrangente para uma família

heterogênea de vesículas delimitadas por membrana que podem se originar a partir de endossomos ou da membrana plasmática (Abels e Breakefield, 2016).

Os exossomos compreendem as menores EVs, com 50 a 150 nm de diâmetro e se formam a partir do brotamento interno da membrana do endossomo. Os brotamentos dão origem a vesículas intraluminais (ILVs) que se soltam para dentro do lúmen do endossomo, formando assim os corpos multivesiculares (MVBs). Por essa razão, os exossomos possuem no seu interior conteúdos citoplasmáticos e são revestidos pela bicamada fosfolipídica do endossomo. Após a sua formação, os MVBs podem seguir para vias secretoras ou para via lisossomal. Na via secretora, os MVBs se fundem com a membrana plasmática, resultando na liberação das ILVs, que passam a serem denominadas exossomos. Na via lisossomal os MVBs se fundem aos lisossomos, liberando as ILVs para degradação no lúmen lisossomal (Robbins e Morelli, 2014; Abels e Breakefield, 2016).

A biogênese dos exossomos parece não ocorrer ao acaso. Um mecanismo proposto de regulação na formação dos exossomos é via proteínas do Complexo de Triagem Endossomal Necessário para Transporte (*endosomal sorting complex required for transport* - ESCRT). Estão presentes na membrana do endossomo proteínas transmembranas oriundas da membrana plasmática ou vindas do complexo de Golgi. A ubiquitinação dos domínios citosólicos das proteínas transmembranas presentes no endossomo funciona como um sinal que direciona essas proteínas para os ILVs, através da maquinaria ESCRT, que promove um corte separando a ILV, contendo a proteína ubiquitinada, da membrana do endossomo (Raiborg e Stenmark, 2009; Hurley e Hanson, 2010). No entanto, mesmo na ausência de proteínas chave de ESCRT, os MVBs ainda são gerados, indicando que outras vias também participam da biogênese de exossomos. Além disso, proteínas não ubiquitinadas também são direcionadas para ILVs em formação, como moléculas do MHC de classe II (Stuffers *et al.*, 2009). Por fim, para que ocorra o transporte dos MVBs para a periferia da célula e consequente liberação das ILVs no meio extracelular é necessário o envolvimento coordenado do citoesqueleto, motores moleculares, e maquinaria de fusão do endossomo, num processo controlado pela família Rab de pequenas GTPases (Ostrowski *et al.*, 2010; Robbins e Morelli, 2014).

Os exossomos formados podem possuir conteúdo variado, como proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos. A variação no conteúdo dos exossomos depende da célula de origem, estado de ativação celular – homeostasia ou estado patológico – e até mesmo o local de liberação (Sreekumar *et al.*, 2010; Deolindo *et al.*,

2013). Também proteínas relacionadas às vias de formação e transporte de exossomos são comumente encontradas (Andreu e Yanez-Mo, 2014; Zhang e Grizzle, 2014). Em virtude dessas características, a composição dos exossomos pode servir como marcador para doenças como câncer e doenças inflamatórias (Raposo e Stoorvogel, 2013; Schorey e Harding, 2016).

As microvesículas (MVs), por sua vez, compreendem EVs maiores, com tamanho entre 50 nm a 1 µm. As MVs são formadas a partir de brotamentos da membrana plasmática num processo dependente de Ca<sup>2+</sup>. Comumente a formação de MVs está associada a um estímulo que ocasiona aumento do Ca<sup>2+</sup> intracelular por influxo extracelular ou mobilização de cálcio de fontes intracelulares. A maior concentração de Ca<sup>2+</sup> intracelular promove a clivagem do citoesqueleto por ação de calpaínas. Durante esse processo ocorre ativação da proteína *scramblase*, promovendo a mudança de fosfolipídios com carga negativa do folheto interno para o folheto externo da membrana plasmática, resultando em formação de MVs com exposição de fosfatidilserina (Fox *et al.*, 1990; Deolindo *et al.*, 2013; Turturici *et al.*, 2014). As MVs podem conter diferentes proporções de fosfolipídeos e lipídeos ativos, dependendo do estímulo e célula de origem, assim como RNAs, enzimas, proteínas do citoplasma e até mesmo citocinas e receptores da célula de origem (Inal *et al.*, 2013; Abels e Breakefield, 2016).

Por fim, os corpos apoptóticos são as maiores EV, 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 (Akers *et al.*, 2013).

As EVs podem interagir com as células alvo de diversas formas. A interação pode ocorrer de forma direta, resultando na fusão da membrana da EV com a membrana celular e consequente liberação do conteúdo da vesícula na célula receptora. Outro possível mecanismo é via endocitose da EV pela célula com posterior liberação do seu conteúdo. Ou ainda essa interação pode envolver a ligação a receptores de membrana ou a transferência de receptores da EV para a célula (Morel *et al.*, 2004; Turturici *et al.*, 2014). A internalização de EVs 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 EVs 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 EVs no citoplasma celular (Mathivanan *et al.*, 2010). Além de interagir com células, foi descrito que as EVs podem exercer efeitos sobre a matriz extracelular através da



inclusão de metaloproteínases, como MMP-2 e MMP-9 (Candela *et al.*, 2010; Lozito e Tuan, 2012).

### 1.5 VESÍCULAS EXTRACELULARES DE *Trypanosoma cruzi*

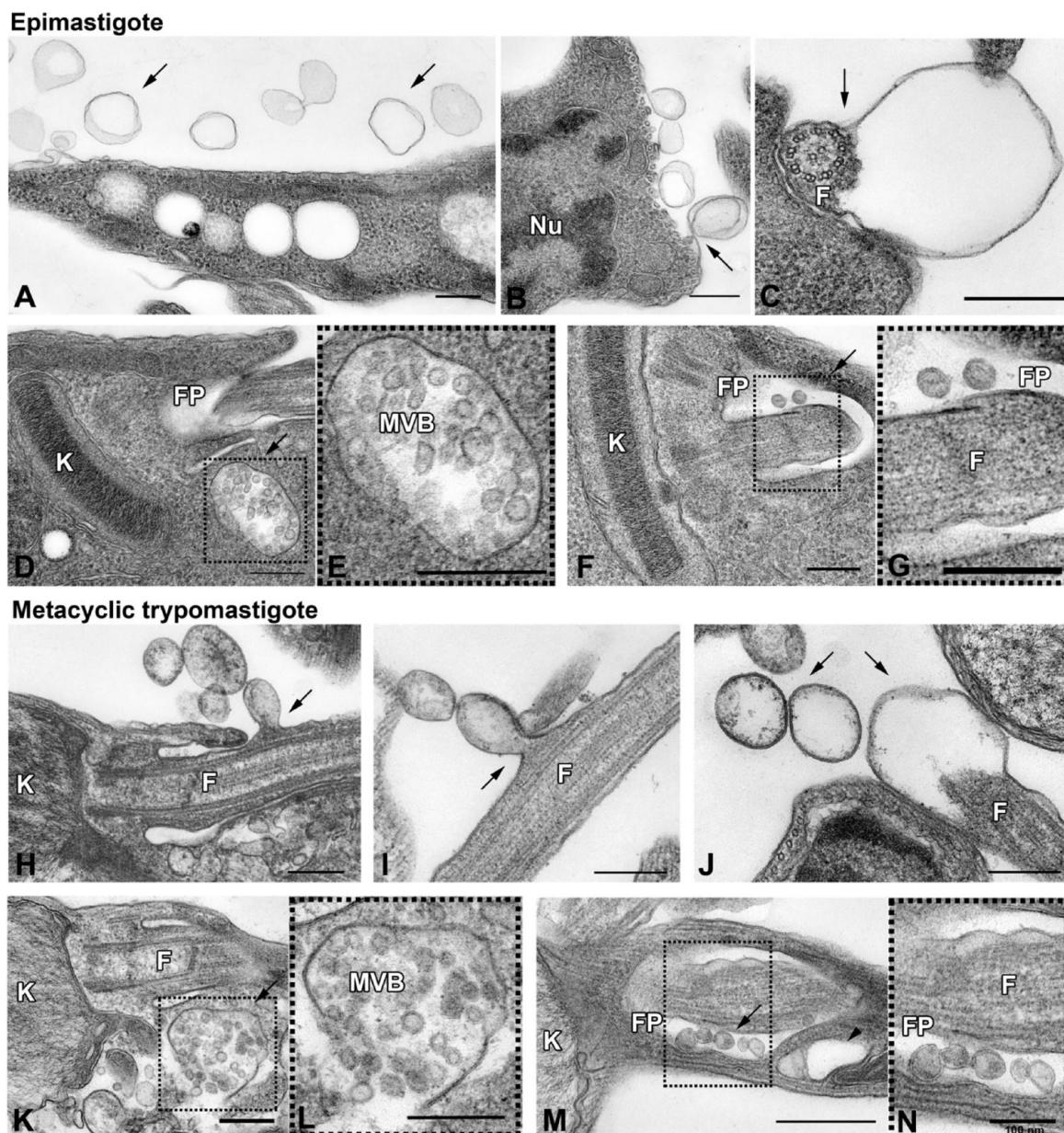
A literatura científica apresenta cada vez mais evidências da participação de EV em infecções parasitárias, atuando tanto na comunicação parasito-parasito como na comunicação parasito-célula do hospedeiro (Barteneva *et al.*, 2013; Marcilla *et al.*, 2014). Durante uma infecção parasitária, as EVs liberadas por diversos agentes infecciosos podem agir de diferentes formas, podendo desempenhar uma sinalização a favor do parasito ou, de forma contrária, podendo favorecer a resposta do hospedeiro à infecção. Ou seja, as EVs liberadas por um determinado parasito podem carregar moléculas do patógeno capazes de ativar mecanismos da resposta imunológica e induzir defesa e imunidade do hospedeiro. Por outro lado, as EVs derivadas de outro parasito, ou até mesmo de células do hospedeiro infectadas, podem desencadear mecanismos favoráveis ao patógeno, promovendo sua permanência e evasão do sistema imunológico (Cestari *et al.*, 2012; Schorey e Harding, 2016).

A liberação de EVs por *T. cruzi* foi demonstrada pela primeira vez no trabalho de Da Silveira *et al.* (1979). Os autores mostraram a secreção de EVs 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.*, 1990) sendo descrito como um fenômeno espontâneo dependentes de temperatura e tempo, e não influenciado pela presença de proteínas ou soro imune no meio de cultivo (Goncalves *et al.*, 1991).

Bayer-Santos *et al.* (2013) identificaram, através de técnicas de microscopia eletrônica de transmissão, dois mecanismos diferentes para a formação das EVs em *T. cruzi* cepa DM28c. De acordo com os autores, a partir de brotamentos da membrana plasmática ocorre a formação de vesículas grandes, enquanto vesículas menores se originam a partir da bolsa flagelar, tanto em formas epimastigotas como em tripomastigotas metacíclicos (figura 1.3). As EVs também podem se originar a partir dos reservossomos do *T. cruzi*, que possuem funções exocíticas como MVBs. Com isso, componentes presentes nos reservossomos do

parasito podem ser encontrados também nos exossomos (Yoshida, 2006; Bayer-Santos *et al.*, 2013).

**Figura 1.3: Origem de vesículas extracelulares de *Trypanosoma cruzi*.** Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas. O painel superior mostra 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). O painel inferior mostra tripomastigotas metacíclicas 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 próxima 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:** BAYER-SANTOS *et al.*, Proteomic Analysis of *Trypanosoma cruzi* Secretome: Characterization of Two Populations of Extracellular Vesicles and Soluble Proteins. *Journal of proteome research*. 12:883-897. 2013.

Mais recentemente, os estudos têm abrangido a relação entre o conteúdo das EVs secretadas por *T. cruzi* com a comunicação inter-celular. Nesse sentido, a

presença de pequenos RNAs nas EVs de *T. cruzi* pode representar um mecanismo relevante de modulação tanto do ciclo de vida do parasito como da célula hospedeira (Linhares-Lacerda *et al.*, 2015). Os pequenos RNAs presentes em EVs de *T. cruzi* variam de acordo com o estágio do ciclo que o parasito se encontra (Bayer-Santos *et al.*, 2014), sendo derivados tanto de RNAs transportadores como de RNAs ribossomais do *T. cruzi*. Adicionalmente, a exposição de células HeLa a EVs de *T. cruzi* provoca mudança no padrão de expressão gênica dessas células, principalmente de genes envolvidos com vias da resposta imunológica, citoesqueleto e matrix extracelular (Garcia-Silva e Cabrera-Cabrera, 2014; Garcia-Silva *et al.*, 2014). Fernandez-Calero *et al.* (2015) mostraram ainda que as EVs de epimastigotas de *T. cruzi* possuem pequenos RNAs específicos, com distribuição diferente da que é encontrada no parasito, evidenciando um mecanismo específico de processamento e secreção de pequenos RNAs nas EVs de *T. cruzi*.

Análises proteômicas do conteúdo das EVs de *T. cruzi* identificaram centenas de proteínas diferentes. Dentre elas, proteínas envolvidas na interação parasito-hospedeiro, sinalização, transporte, vias de óxido-redução e vias de metabolismo de carboidratos (Bayer-Santos *et al.*, 2013). De fato, as EVs secretadas por *T. cruzi* apresentam proteínas normalmente associadas a membrana do parasito como proteína flagelar ligadora de cálcio (FCaBP), glicoconjugados  $\alpha$ -galactosil, GP35/50 e glicoproteínas da superfamília das gp85/transialidades (Trocoli Torrecilhas *et al.*, 2009; Bayer-Santos *et al.*, 2013). Essas estruturas são importantes para o processo de adesão do parasito a célula hospedeira, e talvez tenham funções semelhantes na EVs (Yoshida, 2006). Também componentes com atividades de fosfatases ácidas e alcalinas, relacionados a adesão e infecção do parasito, foram encontrados em EVs de *T. cruzi* (Neves *et al.*, 2014). Além do estágio do ciclo de vida do parasito, a cepa do *T. cruzi* representa outro fator relevante para a composição das EVs. Nogueira *et al.* (2015) relataram a presença de diferentes proteínas em EVs obtidas das cepas Y, Colombiana, CL-14, e Yu Yu de *T. cruzi*, especialmente em relação a glicoconjugados  $\alpha$ -galactosil.

O estudo dos efeitos das EVs de *T. cruzi* em modelos murinos de infecção experimental ainda são escassos. O trabalho de Trocoli Torrecilhas *et al.* (2009) avaliou os efeitos da inoculação de EVs secretadas por tripomastigotas de *T. cruzi* cepa Y em camundongos BALB/c, seguido da infecção com o mesmo parasito. Como resultado, a inoculação prévia de EVs à infecção diminuiu a sobrevivência dos animais, aumentou o parasitismo cardíaco e modulou a produção de citocinas, sendo

encontrado maiores níveis de mRNAs de IL-4 e IL-10 no tecido cardíaco, indicando efeitos imunomoduladores das EVs de *T. cruzi in vivo* e consequente redução da resistência do hospedeiro a infecção.

Proteínas presentes nas EVs liberadas pelo *T. cruzi* são capazes de estimular a resposta imunológica de hospedeiros murinos, sem, no entanto, gerar uma resposta protetora. De Pablos *et al.* (2016) descreveram que regiões C-terminais das proteínas MASPs (proteínas de superfície associadas à mucina) presentes em subpopulações de EVs liberadas por *T. cruzi* 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 EVs de *T. cruzi* estão associadas com a evasão do parasito à resposta imunológica do hospedeiro.

Também EVs liberadas por células do hospedeiro infectadas por *T. cruzi* desempenham funções imunomoduladoras a favor do parasito. Cestari *et al.* (2012) demonstraram que tripomastigotas metacíclicos infectam células sanguíneas e rapidamente induzem a liberação de EVs por essas células. As EVs liberadas são capazes de se ligar a superfície do parasito e atuam estabilizando e inativando o complexo C3 convertase do sistema complemento. Além disso, monócitos e linfócitos infectados liberam EVs contendo TGF- $\beta$ , que sinaliza a favor do parasito aumentando a sua invasão celular. *In vivo*, a inoculação das EVs provenientes de células THP-1 (linhagem celular de monócito humano) infectadas em camundongos BALB/c resultou em aumento da parasitemia durante a fase aguda da infecção.

Outro trabalho do mesmo grupo (Ramirez *et al.*, 2017) mostrou que formas tripomastigotas metacíclicos, tripomastigotas obtidas de cultura de células e epimastigotas são capazes de induzir a liberação de EVs por células THP-1. Contudo, apenas as EVs liberadas por células THP-1 infectadas por tripomastigotas metacíclicos ou tripomastigotas obtidas de cultura de células têm a capacidade de aumentar a invasão celular de outras células THP-1 pelo *T. cruzi*. Ainda nesse trabalho os autores mostraram, com técnicas de microscopia, que as EVs liberadas por THP-1 infectadas podem se fundir com a membrana de outras células THP-1. Além disso, o soro de pacientes chagásicos (formas cardíacas e indeterminadas) reconheceram antígenos presentes nas EVs de THP-1 infectadas, sugerindo o uso dessas EVs como biomarcadores para diagnóstico no contexto da doença de Chagas. Ainda no mesmo ano, Wyllie e Ramirez (2017) mostraram que células THP-1 infectadas por *T. cruzi*

cepa G (Tc I) e cepa Y (Tc II) liberam vesículas que protegem o parasito da lise pelo sistema complemento e aumentam a sua infectividade em células de mamíferos de forma cepa-dependente. Ou seja, a vesícula liberada pela THP-1 infectada por determinada cepa não tem efeito protetor sobre outra cepa.

Numa outra abordagem experimental, Nogueira *et al.* (2015) avaliaram o efeito da inoculação de EVs das cepas Y, Colombiana, CL-14, e YuYu de *T. cruzi* em camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção. Em esplenócitos de animais cronicamente infectados, as EVs das cepas Colombiana e Y induziram maior produção dos mediadores pró-inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IFN- $\gamma$ ). Experimentos seguintes utilizando EVs das cepas Colombiana e YuYu mostraram que linfócitos TCD8<sup>+</sup> e TCD4<sup>+</sup> têm, além do aumento das citocinas pró-inflamatórias, maior produção de IL-10, uma citocina envolvida com a regulação da resposta imunológica do hospedeiro. Também os linfócitos B apresentaram perfil misto de citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-10) após o tratamento com EVs das cepas Colombiana e YuYu, enquanto as células dendríticas apresentaram maior produção de TNF- $\alpha$ .

Esses trabalhos corroboram a hipótese de que as EVs têm papel relevante na patogênese do *T. cruzi*, demonstrado pela diminuição da sobrevivência e maior parasitismo cardíaco. Embora alguns mecanismos desencadeados pelas vesículas a favor do parasito já tenham sido descritos (inativação do complemento, modulação na produção de citocinas, aumento da infecção de células por *T. cruzi*) é provável que mecanismos ainda desconhecidos estejam envolvidos. O estudo de outras vias relacionadas à patogênese das EVs de *T. cruzi* representa um avanço tanto no entendimento da biologia do parasito como da interação *T. cruzi*-célula hospedeira.

## 1.6 ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS E RESPOSTA IMUNOLÓGICA

Os ácidos graxos são os principais constituintes dos lipídios (óleos e gorduras), e entre suas principais funções destacam-se o acúmulo de energia e a formação das membranas celulares, sendo também precursores de substâncias importantes, tais como hormônios e mediadores lipídicos da inflamação (Turchini *et al.*, 2012). Portanto, os ácidos graxos podem influenciar diversos aspectos celulares, resultando em alteração no metabolismo, na produção de hormônios e nos padrões de mediadores inflamatórios produzidos. Através dessas ações os ácidos graxos afetam desde funções fisiológicas até a resistência a doenças (Calder, 2015a). Em virtude disso, a compreensão dos mecanismos envolvidos com ingestão de ácidos

graxos sobre doenças que acometem animais e humanos tem sido o alvo de diversos estudos (Lands, 2014).

As primeiras evidências da relação entre a ingestão de ácidos graxos poli-insaturados *n*-3 (PUFAs *n*-3, ou ômega-3) e inflamação foram observadas nos estudos epidemiológicos desenvolvidos por Kromann e Green, em 1980. Avaliando um período de 25 anos os pesquisadores mostraram que a população de esquimós do distrito de Upernavik, Groelândia, apresentavam baixa incidência de doenças auto-imunes e inflamatórias, como psoríase, asma e diabetes tipo 1, assim como a ausência de esclerose múltipla, quando comparada com a população da Dinamarca. A principal diferença destacada nesse estudo é a alimentação muito característica dessa população de esquimós, com alta ingestão de peixes ricos em PUFAs *n*-3 (Simopoulos, 2002).

A família de PUFAs *n*-3 é composta de ácidos graxos de cadeia longa, contendo de 18 a 22 carbonos. A designação de ômega tem relação com a posição da primeira dupla ligação, contando a partir do grupo metílico final da molécula de ácido graxo. Os ácidos graxos ômega-3 apresentam a primeira dupla ligação entre o terceiro e o quarto átomo de carbono (Ratnayake e Galli, 2009).

Os principais PUFAs *n*-3 são o ácido  $\alpha$ -linolênico (LA) (18:3 n3), o ácido eicosapentaenóico (EPA) (20:5 n3) e o ácido docosahexaenóico (DHA) (22:6 n3). Os PUFAs *n*-3 são considerados ácidos graxos essenciais, uma vez que não podem ser sintetizados pelo organismo. Por esta razão os PUFAs *n*-3 devem ser obtidos a partir de alimentos, podendo ser encontrados em peixes, como o salmão, atum, e outras vidas marinhas, como algas, krill, além de certas plantas (CHILDS et al., 2008). O reconhecimento das atividades anti-inflamatórias dos PUFAs *n*-3 deram início a estudos de suplementação da dieta em modelos animais de inflamação crônica e infecção, além de estudos delineados para elucidar os mecanismos de ação dos PUFAs ômega-3.

Ensaio experimentais têm mostrado que os PUFAs *n*-3 possuem poderosas atividades anti-inflamatórias e imunomoduladoras em uma gama de doenças, tais como auto-imunes (Maalouly et al., 2016), doença inflamatória do intestino (Hokari et al., 2013), artrite reumatoide (Woo et al., 2015) e infecções (Irons et al., 2003; Lovo-Martins et al., 2017). Também há testes clínicos em pacientes humanos associando o uso de suplementos ricos em PUFAs *n*-3 com a evolução de doenças inflamatórias (Rajaei et al., 2015) e infecções, como a sepse (Ferguson et al., 2014). Estudos em pacientes com artrite reumatoide são os que apresentam

melhores resultados, com vários testes mostrando redução dos sintomas, como inchaço, dor e rigidez matinal (Miles e Calder, 2012). Contudo, a *Agency for Healthcare Research and Quality Reports* dos Estados Unidos avaliou estudos em humanos que relacionam a suplementação com PUFA *n-3* e artrite reumatoide e concluiu que ainda não há evidências suficientes dos benefícios clínicos da suplementação com PUFA *n-3* nesses pacientes, sendo necessários mais testes clínicos (Fritsche, 2006). Já os estudos em pacientes com doença inflamatória do intestino (doença de Crohn e colite ulcerativa) e asma, apesar de promissores, ainda são inconclusivos (Calder, 2015a), sendo encontrados testes que reportam alguns benefícios (Belluzzi *et al.*, 1996) e outros não (Middleton *et al.*, 2002).

Enquanto que os resultados da suplementação com PUFA *n-3* em humanos são contraditórios, os testes em modelos animais apresentam-se mais expressivos e conclusivos. Numa análise bastante crítica feita por Fritsche (2006), importantes diferenças nos estudos com animais e humanos devem ser levadas em consideração, podendo ser essa a razão da discrepância observada nos resultados. Primeiramente, a heterogeneidade genética pode interferir nos efeitos dos PUFA *n-3*, e essa variação genética é muito maior numa população humana do que em animais de laboratórios. Adicionalmente, enquanto em estudos com animais a alimentação basal pode ser completamente controlada, em humanos esse controle acaba sendo muito pequeno ou até mesmo inexistente. Além disso, a maioria dos estudos em animais inicia a suplementação com PUFA *n-3* antes do desenvolvimento da doença (seja ela inflamatória ou infecciosa), enquanto que em humanos os testes são desenvolvidos em pacientes que já tem a doença estabelecida (Fritsche, 2006).

A inflamação é o mecanismo patológico por trás de muitas doenças crônicas, e por isso os efeitos imunomoduladores dos PUFA *n-3* são considerados potencialmente benéficos. No entanto, uma questão importante a ser levantada é o efeito dessas suplementações em doenças infecciosas, uma vez que a inflamação é necessária e importante na defesa do organismo (Anderson e Fritsche, 2002; Fenton *et al.*, 2013). Ainda são escassos os estudos relacionando a suplementação com PUFA *n-3* e doenças infecciosas, principalmente doenças parasitárias.

A relação entre a suplementação com PUFA *n-3* e tripanossomíases foi abordada pela primeira vez por Godfrey (1958). O trabalho reportou que a suplementação de camundongos com óleo de fígado de bacalhau rico em PUFA *n-3*, associado a vitaminas A e D, suprimiu a infecção por *Trypanosoma congolense* e

*Trypanosoma vivax*, mas não teve efeitos na infecção por *Trypanosoma brucei* e *T. cruzi*.

No modelo experimental de leishmaniose cutânea, a suplementação com óleo de peixe não teve efeito na resistência do animal, embora tenha sido associado ao desenvolvimento de maior lesão na pata em virtude da infecção por *Leishmania amazonenses* (Blok *et al.*, 2002). Num outro trabalho do mesmo grupo a suplementação com óleo de peixe diminuiu a incidência de malária cerebral em camundongo infectados por *Plasmodium berguei* (Blok *et al.*, 1992). Kumaratilake e colaboradores (1992) mostraram que PUFAs *n*-3 e *n*-6 apresentam atividades anti-malária *in vitro* para *Plasmodium falciparum* e *in vivo* para *Plasmodium berguei*. De acordo com Olive e colaboradores (1999) a suplementação com óleo de peixe não interferiu com a resposta inflamatória intestinal causada pela infecção por *Trichinella spiralis*. Contudo, Garcia e colaboradores (2003) mostraram que a suplementação de animais com óleo de peixe e infecção por *Trichinella spiralis* resulta em quantidades menores de vermes adultos em relação aos que receberam dieta normal, além de maior produção de IL-4 e IFN- $\gamma$  por células do baço.

Em estudos com bactérias, foi mostrado que a suplementação com óleo de peixe reduz a mortalidade de animais expostos à *Klebsiella pneumoniae* (Blok *et al.*, 1992). Dados posteriores de Thors e colaboradores (2004) também mostraram que a suplementação de camundongos com óleo de peixe aumenta a sobrevivência dos animais infectados por *Klebsiella pneumoniae* no pulmão, mas não apresenta efeito sobre a resistência a infecção por *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 3. Em modelos experimentais de infecção por *Listeria monocytogenes*, a suplementação com óleo de peixe foi associada com redução da resistência à infecção (Irons *et al.*, 2003). Por outro lado, a suplementação com fontes de DHA/EPA resultou em maior sobrevivência em camundongos infectados por *Pseudomonas aeruginosa* no pulmão, associada com eliminação mais eficiente da bactéria pelo hospedeiro e menor lesão pulmonar (Caron *et al.*, 2015).

São conhecidos alguns mecanismos da modulação da resposta imunológica pelos PUFAs *n*-3, como a alteração da composição e função das membranas de células do sistema imunológico, modificação no padrão de eicosanóides produzidos, mudanças no perfil de citocinas, regulação da expressão gênica e da proliferação de linfócitos T (Calder, 2015b).

A suplementação com óleo de peixe aumenta a proporção dos PUFAs *n*-3 EPA e DHA nos fosfolípidos das membranas de células inflamatórias, com



consequente redução na quantidade do PUFA *n*-6 ácido araquidônico (Calder *et al.*, 1994). Tanto em experimentos com animais como em humanos, a incorporação de PUFAs *n*-3 na membrana das células ocorre de forma dependente de tempo (Yaqoob *et al.*, 2000; Faber *et al.*, 2011) e de dose (Rees *et al.*, 2006). Estas alterações na composição dos ácidos graxos da membrana modificam, posteriormente, a produção de eicosanóides e a formação de *rafts* lipídicos.

Os eicosanóides são mediadores lipídicos da inflamação que incluem prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX), leucotrienos (LT) e lipoxinas (LX). O substrato inicial para a síntese dos eicosanóides são os lipídios presentes nos fosfolipídios de membrana de células envolvidas com processos inflamatórios. Por ser o ácido graxo mais prevalente na membrana das células inflamatórias, o ácido araquidônico é, usualmente, o principal substrato para a síntese de eicosanóides, dando origem a prostaglandinas e tromboxanos da série 2 e leucotrienos e lipoxinas da série 4 (Calder, 2015b).

Quando inseridos na membrana plasmática, os PUFAs *n*-3 inibem competitivamente a formação de eicosanóides pelas enzimas ciclo-oxigenase (COX) e lipo-oxigenase (LOX) a partir do ácido araquidônico, sendo produzidos, a partir dos ácidos graxos EPA e DHA, prostaglandinas e tromboxanos da série 3 e leucotrienos e lipoxinas da série 5. Estes eicosanóides produzidos a partir do EPA e DHA apresentam menor atividade inflamatória (Chapkin *et al.*, 1991; Trebble *et al.*, 2003). Parte desse efeito se deve a diminuição do ácido araquidônico disponível, mas também se deve a uma ação direta do EPA diminuindo a atividade e expressão da enzima COX-2, responsável pela síntese de prostaglandinas após um estímulo inflamatório (Bagga *et al.*, 2003).

Os PUFAs *n*-3 da membrana celular dão origem também as pró-resolvinas, que são mediadores lipídicos que atuam na resolução da inflamação (Serhan, 2014). São geradas resolvinas da série E a partir do EPA, resolvinas da série D a partir do DHA e protectinas e maresinas a partir do DHA. A síntese dessas pró-resolvinas envolve também a via das COX e LOX (Hong *et al.*, 2003; Mas *et al.*, 2012).

Uma vez que a produção de citocinas é regulada por eicosanóides derivados do ácido araquidônico, e os PUFAs *n*-3 afetam a produção desses eicosanóides, espera-se que os PUFAs *n*-3 afetem a produção de citocinas (Calder, 2012).

O NF- $\kappa$ B é um importante fator de transcrição nuclear envolvido na regulação positiva de genes de citocinas inflamatórias, moléculas de adesão e ciclo-

oxigenase (Wan e Lenardo, 2010). Foi demonstrado que os PUFAs n-3 diminuem a atividade desse fator de transcrição nuclear, tanto por inibição da fosforilação da subunidade I $\kappa$ B (Novak *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2004) ou através da alteração na formação de *rafts* lipídicos, impedindo que proteínas sinalizadoras fiquem próximas ao receptor TLR-4, não ocorrendo a sua sinalização e consequente ativação do NF- $\kappa$ B (Wong *et al.*, 2009). Uma outra forma que os PUFAs *n*-3 influenciam a ativação do NF- $\kappa$ B envolve o bloqueio físico que o fator de transcrição de receptores ativado por proliferadores de peroxissoma-gama (PPAR- $\gamma$ ) exerce sobre o NF- $\kappa$ B (Vanden Berghe *et al.*, 2003). Ao contrário do NF- $\kappa$ B, o fator de transcrição PPAR- $\gamma$  está relacionado com respostas anti-inflamatórias nas células (Szanto e Nagy, 2008).

Estudos em culturas de células mostraram que a suplementação com PUFAs n-3 suprime a capacidade de monócitos sintetizarem IL-1 e TNF- $\alpha$ ; (Zhao *et al.*, 2004), como também a produção de IL-6 e IL-8 por células do endotélio venoso (De Caterina *et al.*, 1994). Considerando que a IL-1 e o TNF- $\alpha$  são importantes mediadores da inflamação, a redução nessas citocinas contribui para melhorar sintomas inflamatórios de pacientes que fazem uso de suplementos com PUFAs n-3. O consumo de PUFAs n-3 também está associado com uma significativa diminuição na produção *in vivo* de IL-12 e IFN- $\gamma$  (Fritsche *et al.*, 1999; Puertollano *et al.*, 2005). Zhang e Fritsche (2004) mostraram que macrófagos tratados com DHA diminuem a produção de IL-12 de maneira independente do fator de transcrição PPAR- $\gamma$ .

O TNF- $\alpha$  é uma citocina que aparece rapidamente após infecções ou lesões, tendo um papel fundamental no combate a patógenos invasores. Contudo, a produção excessiva de TNF- $\alpha$  está relacionada com mortalidade e morbidade na sepse, (Kaech *et al.*, 2006), meningite (Armah *et al.*, 2005) e malária (Perlmann e Troye-Blomberg, 2000). Embora grande parte dos estudos envolvendo a modulação do TNF- $\alpha$  pelo tratamento com PUFAs *n*-3 indiquem um efeito supressivo do tratamento sobre essa citocina, é importante considerar que a sensibilidade aos efeitos supressivos dos PUFAs *n*-3 na produção de TNF- $\alpha$  está ligada ao nível inerente de produção de citocinas pelas células antes da suplementação e aos polimorfismos encontrados no gene codificador do TNF- $\alpha$  (Grimble *et al.*, 2002).

Dessa forma, alguns trabalhos relatam aumento de citocinas diante do tratamento com PUFAs *n*-3. Blok *et al.* (2002) relataram aumento na produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos estimulados *in vitro* com LPS. Takeda *et al.* (1995) mostraram que a suplementação com óleo de peixe em camundongos infectados por *T. cruzi* e

consequentemente estimulados com LPS resulta num aumento nos níveis séricos de TNF- $\alpha$ . O estudo Blok *et al.* (1992) mostrou que a suplementação com óleo de peixe na infecção experimental por *Klebsiella pneumoniae* e na infecção cerebral por *Plasmodium berghei* leva ao aumento na produção *ex vivo* de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\alpha$  por macrófagos estimulados com LPS. Além desses, Puertollano *et al.* (2005) mostraram que o tratamento *in vivo* com óleo de peixe aumentou os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  em camundongos infectados por *Listeria monocytogenes* nas primeiras 24h de infecção, sendo menor nos tempos posteriores.

Como já descrito, o NO constitui um importante mediador citotóxico de células imunes efectoras ativadas, capaz de destruir patógenos e células tumorais. Macrófagos tratados com DHA e estimulados com LPS apresentaram redução na produção de NO, assim como menor expressão da enzima iNOS, provavelmente por interferência nas vias de sinalização intracelulares associadas com a regulação da iNOS (Ambrozova *et al.*, 2010). Também Khair-El-Din *et al.* (1996) já demonstraram que o DHA diminui a produção de NO por macrófagos estimulados *in vitro* com IFN- $\gamma$  e LPS. De Lima *et al.* (2006) relataram que baixas doses de PUFAs n-6 e n-3 (entre eles o DHA e o EPA) estimulam a produção de NO em macrófagos estimulados com LPS, enquanto que altas doses dos PUFAs diminuem a síntese do NO nessas células.

A relação entre a suplementação oral com PUFAs n-3 e a infecção por *T. cruzi*, abordando produção de citocinas, foi mostrada pela primeira vez por Takeda *et al.* (1995). Nesse estudo os autores mostraram que a administração oral de óleo de peixe induz altos níveis séricos de TNF- $\alpha$  em camundongos infectados por *T. cruzi*. Da mesma forma, os resultados publicados pelo nosso grupo em relação ao desenvolvimento da infecção aguda por *T. cruzi* em camundongos suplementados com óleo de peixe também mostraram aumento da produção de TNF- $\alpha$  por células esplênicas (Lovo-Martins *et al.*, 2017).

Assim sendo, a avaliação dos efeitos dos PUFAS n-3 sobre resposta inflamatória e a interação com vesículas extracelulares secretadas por *T. cruzi* podem indicar caminhos para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na relação parasito-hospedeiro, assim como abrir novas perspectivas terapêuticas para a doença de Chagas.

## 2 JUSTIFICATIVA

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. Dentre elas, a Doença de Chagas é considerada pela Organização Mundial da Saúde como uma doença tropical negligenciada (WHO, 2012) constituindo um problema significativo de saúde pública. Por isso, pesquisas que contribuam no entendimento da patogênese da doença assim como de possíveis compostos terapêuticos são importantes no cenário atual.

Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs *n*-3), presentes principalmente no óleo de peixe, estão associados com a modulação da inflamação e da resposta imunológica (Revisado por Calder 2018). Apesar dos benefícios cardiovasculares já estarem bem descritos, os efeitos dessa imunomodulação no curso de doenças infecciosas ainda são pouco conhecidos (Fritsche, 2007).

Uma vez que pesquisas desenvolvidas recentemente em nosso laboratório mostraram que a suplementação oral de camundongos com óleo de peixe rico em PUFAS *n*-3 atenua a infecção murina por *T. cruzi*, o estudo dos mecanismos envolvidos nessa imunomodulação torna-se de grande importância, podendo, através do desenvolvimento das pesquisas nessa área, futuramente considerar-se a suplementação com PUFAs *n*-3 como terapia para tratamento da Doença de Chagas (Lovo-Martins *et al.*, 2017).

Com a descoberta de que *T. cruzi* libera vesículas contendo várias moléculas que interferem na resposta imunológica, modulando a infecção a favor do parasito, e assim exercendo papel importante na patogênese da doença de Chagas (Goncalves *et al.*, 1991; Trocoli Torrecilhas *et al.*, 2009), novos estudos são essenciais para determinar a função destas vesículas em diferentes situações biológicas, como por exemplo, sob os efeitos dos PUFAs *n*-3. O estudo aqui apresentado contribui para uma maior compreensão dos mecanismos envolvidos na patogenicidade induzida por vesículas extracelulares de *T. cruzi*, e ao mesmo tempo ratifica o efeito imunomodulador dos PUFAs na infecção por *T. cruzi*.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos imunopatológicos de vesículas extracelulares de *Trypanosoma cruzi*, assim como a sua associação à ação imunomoduladora dos ácidos graxos poli-insaturados na patogênese da doença de Chagas experimental.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Obter e purificar vesículas extracelulares de *T. cruzi* Y (EVs Y);
- b) Avaliar o curso da infecção por *T. cruzi* determinando a curva de parasitemia e o parasitismo cardíaco nos animais infectados, submetidos ao tratamento com óleo de milho ou óleo de peixe, associados à inoculação de EVs Y;
- c) Caracterizar a resposta imunológica (produção de citocinas e de óxido nítrico) de células esplênicas obtidas de animais infectados ou não, submetidos ao tratamento com óleo de milho ou óleo de peixe, associados à inoculação de EVs Y;
- d) Avaliar os efeitos das EVs Y e de ácidos graxos sobre a capacidade de invasão do *T. cruzi* em macrófagos diferenciados a partir das células da medula óssea de camundongos C57BL/6, determinando a produção de PGE<sub>2</sub>, óxido nítrico, citocinas e formação de corpos lipídicos.

#### 4 CAPÍTULO I: Artigo publicado na revista *Frontiers in immunology*

##### **“Extracellular vesicles shed by *Trypanosoma cruzi* potentiate infection and elicit lipid body formation and PGE<sub>2</sub> production in murine macrophages”**

(Vesículas extracelulares liberadas por *Trypanosoma cruzi* potencializam a infecção e elicitam a formação de corpos lipídicos e produção de PGE<sub>2</sub> em macrófagos murinos)

**Autores:** Maria Isabel Lovo-Martins, Aparecida Donizette Malvezi, Nágela Ghabdan Zanluqui, Bruno Fernando Cruz Lucchetti, Vera Lúcia Hideko Tatakihara, Patricia Alves Mörking, Admilton Gonçalves de Oliveira, Samuel Goldenberg, Pryscilla Fanini Wowk and Phileno Pinge-Filho.

Neste capítulo, parte dos resultados da tese foram compilados em um primeiro publicado na revista *Frontiers in Immunology* (fator de impacto 6.429, Qualis: A1, área CB-1 em abril de 2018). Esse primeiro artigo descreve os efeitos da inoculação de vesículas extracelulares liberadas por formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* no desenvolvimento e imunopatologia da infecção experimental por *T. cruzi* em camundongos C57BL/6. Avaliamos principalmente a resposta imunológica dos animais dos diferentes grupos de tratamentos, focando na análise do perfil de citocinas e óxido nítrico produzidos no plasma, na responsividade das células esplênicas e também analisando células e lavado do peritônio, local da inoculação tanto das vesículas de *T. cruzi* como do próprio parasito. Adicionalmente, descrevemos os efeitos das vesículas extracelulares de *T. cruzi* em macrófagos, células importantes da imunidade inata que participam ativamente da resposta imunológica durante a infecção por *T. cruzi*, mas que podem ter seus mecanismos tripanocidas subvertidos pelo parasito, permitindo sua infecção e replicação. Os experimentos *in vitro* trouxeram novos conhecimentos acerca dos efeitos diretos das vesículas extracelulares de *T. cruzi* sobre macrófagos, onde mostramos que as vesículas extracelulares de *T. cruzi* elicitam a formação de corpos lipídicos e promovem a produção de prostaglandina E<sub>2</sub>, mesmo na ausência do parasito.

## 4.1 EXTRACELLULAR VESICLES SHED BY *Trypanosoma cruzi* POTENTIATE INFECTION AND ELICIT LIPID BODY FORMATION AND PGE<sub>2</sub> PRODUCTION IN MURINE MACROPHAGES



# Extracellular Vesicles Shed By *Trypanosoma cruzi* Potentiate Infection and Elicit Lipid Body Formation and PGE<sub>2</sub> Production in Murine Macrophages

### OPEN ACCESS

#### Edited by:

Debora Decote-Ricardo,  
Universidade Federal Rural  
do Rio de Janeiro, Brazil

#### Reviewed by:

Hugo Caire Castro-Faria-Neto,  
Fundação Oswaldo Cruz  
(Fiocruz), Brazil  
Danielle Oliveira Nascimento,  
Universidade Federal do Rio  
de Janeiro, Brazil  
Laura Noelia Cariddi,  
National University of Rio  
Cuarto, Argentina

#### \*Correspondence:

Priscilla Fanini Wowk  
priscilla.wowk@fiocruz.br;  
Phileno Pinge-Filho  
pingefilho@uel.br

#### Specialty section:

This article was submitted  
to Microbial Immunology,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

Received: 01 February 2018

Accepted: 11 April 2018

Published: 27 April 2018

#### Citation:

Lovo-Martins MI, Malvezi AD,  
Zanluqui NG, Lucchetti BFC,  
Tatakihara VLH, Mörking PA,  
Oliveira AG, Goldenberg S,  
Wowk PF and Pinge-Filho P (2018)  
Extracellular Vesicles Shed By  
*Trypanosoma cruzi* Potentiate  
Infection and Elicit Lipid Body  
Formation and PGE<sub>2</sub> Production  
in Murine Macrophages.  
Front. Immunol. 9:896.  
doi: 10.3389/fimmu.2018.00896

Maria Isabel Lovo-Martins<sup>1,2</sup>, Aparecida Donizette Malvezi<sup>2</sup>, Nágela Ghabdan Zanluqui<sup>1</sup>, Bruno Fernando Cruz Lucchetti<sup>2</sup>, Vera Lúcia Hideko Tatakihara<sup>2</sup>, Patricia Alves Mörking<sup>1</sup>, Admilton Gonçalves de Oliveira<sup>3</sup>, Samuel Goldenberg<sup>1</sup>, Priscilla Fanini Wowk<sup>1,4\*</sup> and Phileno Pinge-Filho<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto Carlos Chagas, Fiocruz - Paraná, Curitiba, Brazil, <sup>2</sup>Laboratório de Imunopatologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil, <sup>3</sup>Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálises, Central de Laboratórios de Pesquisa Multiusuários, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil, <sup>4</sup>Laboratório de Virologia Molecular, Instituto Carlos Chagas, Fiocruz - Paraná, Curitiba, Brazil

During the onset of *Trypanosoma cruzi* infection, an effective immune response is necessary to control parasite replication and ensure host survival. Macrophages have a central role in innate immunity, acting as an important trypanocidal cell and triggering the adaptive immune response through antigen presentation and cytokine production. However, *T. cruzi* displays immune evasion mechanisms that allow infection and replication in macrophages, favoring its chronic persistence. One potential mechanism is the release of *T. cruzi* strain Y extracellular vesicle (EV Y), which participate in intracellular communication by carrying functional molecules that signal host cells and can modulate the immune response. The present work aimed to evaluate immune modulation by EV Y in C57BL/6 mice, a prototype resistant to infection by *T. cruzi* strain Y, and the effects of direct EV Y stimulation of macrophages *in vitro*. EV Y inoculation in mice prior to *T. cruzi* infection resulted in increased parasitemia, elevated cardiac parasitism, decreased plasma nitric oxide (NO), reduced NO production by spleen cells, and modulation of cytokine production, with a reduction in TNF- $\alpha$  in plasma and decreased production of TNF- $\alpha$  and IL-6 by spleen cells from infected animals. *In vitro* assays using bone marrow-derived macrophages showed that stimulation with EV Y prior to infection by *T. cruzi* increased the parasite internalization rate and release of infective trypomastigotes by these cells. In this same scenario, EV Y induced lipid body formation and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) production by macrophages even in the absence of *T. cruzi*. In infected macrophages, EV Y decreased production of PGE<sub>2</sub> and cytokines TNF- $\alpha$  and IL-6 24 h after infection. These results suggest that EV Y modulates the host response in favor of the parasite and indicates a role for lipid bodies and PGE<sub>2</sub> in immune modulation exerted by EVs.

**Keywords:** extracellular vesicles, lipid bodies, macrophages, prostaglandin E<sub>2</sub>, *Trypanosoma cruzi*

## INTRODUCTION

The protozoan *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease, was discovered by Carlos Chagas more than 100 years ago when its life cycle, vector, and pathogenesis in humans were described (1). However, the elucidation of the mechanisms involved in the parasite–host interaction and modulation of the immune response remain incompletely understood. According to the World Health Organization (2017), seven to eight million people are infected with *T. cruzi* worldwide, and over than 10,000 deaths are recorded annually, mostly in Latin America, an endemic area for Chagas disease (2). Recently, new cases have been reported in North America, Asia, and Europe, mainly due to the migration of infected individuals from endemic areas and through non-vectorial transmissions, such as blood transfusion, organ transplants, and congenital transmissions (3).

In vector-borne transmissions, metacyclic trypomastigotes are released in the triatomine excreta when insects feed on mammalian blood. These metacyclic trypomastigotes invade host cells where they transform into replicative amastigotes. After intense replication, amastigotes differentiate into trypomastigotes, an event that culminates with the disruption of the infected cell membrane and release of a substantial number of blood trypomastigote forms that spread the pathogen to other body sites, such as heart tissues (4, 5). During early infection, the innate immune system initiates a host defense that plays an important role in controlling parasite replication and spread in host tissue, with the involvement of cytokines IFN- $\gamma$  (6), TNF- $\alpha$  (7), and IL-12 (8) and immune cells such as macrophages, natural killers, and dendritic cells (9, 10). Later in the infection, adaptive immunity develops, potentiating innate immunity. A strong and persistent polarized T helper 1 response is established against intracellular parasites (11), and an anti-*T. cruzi* CD8 immune response is focused on parasitic immunodominant epitopes. These T-cell responses are important for controlling parasitemia, tissue parasitism, and polyclonal B-cell activation with antibody production (12). However, due to *T. cruzi* immune evasion mechanisms, this intense immune response fails to clear parasitic infection, leading to its persistence and development of the chronic phase of Chagas disease (13).

An important immune evasion mechanism in infectious diseases is the cell–cell modulatory action promoted by the release of heterogeneous extracellular vesicles (EVs). The following main classes of EVs are categorized based on their intracellular origin: the exosomes (50–150 nm diameter) formed inside multivesicular bodies and released upon fusion of these endosomal compartments with the plasma membrane and plasma membrane-derived EVs (50–1000 nm diameter) that are formed by direct budding and constriction from the plasma membrane. These vesicles can transport proteins from the membrane of the original cell, as well as intracellular proteins and nucleic acids, including small RNAs, which can modulate the target cell (14). Hence, EVs have the potential to be used for immunotherapy, immunization, and diagnosis. In fact, especially in *T. cruzi*, the following different mechanisms for vesicle release have been described: larger vesicles that bud from the plasma membrane and smaller vesicles that bud within the flagellar pocket are released through exocytosis of multivesicular bodies (15, 16).

Recently, the role of EVs that are secreted by different parasites during infection and disease progression have been the focus of several investigations. In some cases, EVs displayed a protective role (17–22). However, in other cases, injection of EVs resulted in downregulation of the immune response followed by an increase in parasitemia (23). Furthermore, when EVs from *Trypanosoma brucei* were engulfed by mammalian erythrocytes, cell clearance led to anemia (24).

Although it has been known since 1991 that shedding *T. cruzi* EVs contain several molecules that interfere with the immune response (25), it was only in 2009 that Trocoli-Torrecilhas et al. showed that inoculation of Balb/c mice, a classical Chagas disease susceptibility model, with EVs from *T. cruzi* strain Y 7 days before infection led to early mortality and severe heart damage (26). *T. cruzi* EVs carry proteins related to metabolism, signaling, survival, and parasite virulence (15, 27). Moreover, small RNA and proteins involved in the small RNA pathway were detected inside EVs (28). Compared with the parasite intercellular compartment, this small RNA has a distinctive profile (29) and varies between parasite stages used to obtain EVs (30). Indeed, *T. cruzi* EVs promote gene expression changes in host cells, mainly modifying host cell cytoskeleton, extracellular matrix, and immune responses pathways, which are essential events in the *T. cruzi*-host cell interplay (31). Moreover, interaction between *T. cruzi* EVs and lineage cells *in vitro* suggests that the release of EVs from *T. cruzi*-infected host cells is important for the modulation of host responses against the parasite (32, 33). These phenomena are strain specific, meaning that EVs shed by host cells infected by one strain do not have effects on the host response to another strain (34).

In this work, we aimed to investigate the role of EVs from *T. cruzi* strain Y in the innate immune compartment, peritoneal macrophages, and spleen cells from C57BL/6 mice during *T. cruzi* acute infection through the quantification of nitric oxide (NO), cytokines, and macrophage immunophenotyping. In addition, we developed *in vitro* experiments using macrophages to assess the influence of EVs released by *T. cruzi* in the interaction between *T. cruzi* and host cells. Understanding the mechanisms by which EVs from the parasite act on host cells could eventually lead to the design of new strategies to control Chagas disease.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

C57BL/6 mice (male, aged 6–8 weeks) were obtained from the Instituto Carlos Chagas, Curitiba/Fiocruz-PR, Brazil, and maintained under standard conditions in the animal house of the Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina. A commercial rodent diet (Nuvilab-CR1, Quimtia-Nuvital, Colombo, Brazil) and sterilized water were available *ad libitum*.

This study was carried out in accordance with the recommendations of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Brazilian National Council of Animal Experimentation. The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments at Londrina State University (CEEA,



process number 11/2015- 7045.2015.06). The use of Swiss mice for the maintenance of the parasite strain was also approved for the Committee on the Ethics of Animal Experiments at Londrina State University (CEEA, process number 28.841.2016.41).

## Parasite and Cells

*Trypanosoma cruzi* strain Y, belonging to the *T. cruzi* I (TcI) lineages (35), was maintained by weekly intraperitoneal inoculations of blood trypomastigote forms into Swiss mice. Vero E6 cells (ATCC#1008) were maintained in Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES, 100 UI/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (all reagents from Gibco, Grand Island, NY, USA) at 37°C and under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

Additionally, blood trypomastigotes obtained from infected Swiss mice 10 days post-infection (dpi) were used for *in vitro* infection of Vero E6 cell monolayers. Trypomastigote forms derived from the cell-culture supernatant were used for parasite expansion in Vero E6 and infection of bone marrow-derived macrophages (BMDMs) and mice. Trypomastigote cultures were also used for EV purification and for *T. cruzi*-antigen (TcAg) preparation.

## T. *cruzi* EVs (EV Y)

Extracellular vesicles purified by tissue culture-derived trypomastigotes from *T. cruzi* strain Y were obtained as briefly described. Trypomastigotes collected from the supernatants of infected Vero E6 cells were washed three times in RPMI medium (2,600 × g, 10 min) and were incubated for 2 h at 37°C in RPMI (1 × 10<sup>8</sup>/mL) without FBS for spontaneous EV release. Trypomastigotes were removed by centrifugation (2,600 × g 10 min), and EV-containing supernatants were filtered through a 0.45-µm sterile membrane. EV purification was performed with total exosome isolation from cell-culture media reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) according to the manufacturer's instructions. The EV Y pellet was suspended in phosphate-buffered saline (PBS).

The size, distribution, and concentration of EV Y were measured in a NanoSight LM10 instrument (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK). The data obtained were analyzed using Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) software (version 3.1) with default settings, according to the manufacturer's protocol. EV preparation was sampled twice to generate two independent dilutions and reduce the number of particles in the field of view below 200 detected tracks per image. From each sample, five videos (30 s each) were analyzed. All samples were measured using the same detection threshold (Figure S1 in Supplementary Material) (36).

## Experimental Design of *In Vivo* Experiments

C57BL/6 male mice were injected intraperitoneally with EV Y obtained from 10<sup>6</sup> *T. cruzi* trypomastigotes. After 7 days, the animals were infected intraperitoneally with 5 × 10<sup>3</sup> trypomastigote forms. Mice that were inoculated with EV Y or PBS but not infected and non-EV Y-treated mice infected with *T. cruzi*

were used as controls. Parasitemia was monitored by counting the number of trypomastigotes in 5 µL of fresh blood collected from the tail vein as previously described (37). At day 12 post-infection (19 days after PBS or EV Y inoculation), the animals were anesthetized with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and sacrificed by cervical dislocation. The blood, heart, and spleen were collected. The blood was centrifuged at 1,300 × g for 10 min at room temperature, and the plasma was aliquoted and frozen for nitrite and cytokine measurement. The heart was fixed in 10% buffered formalin for histological analysis. Spleen cells were cultured with medium or total antigen of *T. cruzi* (TcAg) as previously described (38), and the supernatants were stored for the quantification of nitrite, cytokines, and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (Cayman, Ann Arbor, MI, USA). The 12th day after infection was chosen during this phase, NO production is elevated, the cells of the acquired immune response are already activated, and the host response begins to control parasitemia (39–41).

## Histological Analysis of the Heart

Heart halves were fixed in buffered formalin, dehydrated, and embedded in paraffin by a routine technique. Then, 5-µm-thick sections were stained with hematoxylin-eosin and analyzed by light microscopy. Cardiac parasitism was evaluated by counting the number of amastigote nests visualized at 1,000× magnification in six sections of the heart per animal, as previously described (42). The results are expressed as the mean of the number of amastigote nests per section. The data for each group are the mean ± SEM of five animals per group in two independent experiments.

## Peritoneal Lavage and Macrophages

To verify the *in vivo* effects of EV Y at the site of inoculation, we extracted peritoneal lavage and macrophages from mice in the four groups described below. Uninfected mouse samples were collected 7 days after PBS or EV Y (from 10<sup>6</sup> *T. cruzi* trypomastigotes) inoculation. Infected groups were inoculated with PBS or EV Y, and after 7 days, they were infected with 5 × 10<sup>3</sup> *T. cruzi*. The peritoneal lavage and macrophages were collected at 7 dpi. After anesthesia and cervical dislocation, 2 mL of cold PBS was injected into the mouse peritoneum, the peritoneum was massaged, and the fluid was collected. Peritoneal lavage fluid was centrifuged and frozen for nitrite quantification. Macrophage immunophenotyping was performed by flow cytometry.

## Peritoneal Macrophage Immunophenotyping

Cells were stained with a panel of immunophenotyping antibodies for 30 min at 4°C (anti-CD11b-FITC, anti-CD45-PE, anti-CD86-PECy5, anti-MHC-I-PE, anti-MHC-II-PECy5, and anti-F4/80-PE, all antibodies from BioLegend, Inc. CA, USA). Data were collected using an Accuri C5 flow cytometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) and analyzed by FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA). Compensation and isotype controls were also included. Gating strategies in SSC-A/SSC-H were used to exclude the doublets, and gating in forward and side scattering (FSC/SSC) allows the separation of macrophages from other

small cells. Only CD11b<sup>+</sup> cells (macrophages) were analyzed for the frequencies of other surface markers.

### Nitrite Quantification

The concentration of nitrite in spleen and macrophage cell-culture supernatants was directly determined by the Griess assay (43), which estimates total NO concentrations via nitrite analysis. Plasma and peritoneal lavage nitrite levels were evaluated by the cadmium Griess assay, as previously described (44).

### Cytokine Measurement by Flow Cytometry

Cytokine concentrations in plasma and spleen-cell culture supernatants were quantified by a Cytometric Bead Array (CBA)–Mouse Inflammation Kit, according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12p70, IFN- $\gamma$ , MCP-1, and IL-10 flow cytometry measurements were performed on an Accuri C5 flow cytometer, and a total of 1,800 events were acquired for each sample. FCAP Array software was used for data analysis.

### Culture of Bone Marrow-Derived Macrophages

The differentiation of BMDMs from C57BL/6 mice was performed as previously described (45) using L929-cell-conditioned medium as a source of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (46). Fresh bone marrow cells were collected from two femurs and tibias in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco, Grand Island, NY, USA) and depleted of erythrocytes with ammonium chloride. Cells were seeded in six-well tissue culture plates (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) at  $2\text{--}3 \times 10^5$  cells/mL and incubated at 37°C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere in DMEM supplemented with 25% FBS and 30% L929 cell-conditioned medium. Four days after the cells were seeded, 3 mL of fresh supplemented DMEM was added per well, and the cells were incubated for an additional 3 days. To harvest BMDMs, we discarded the supernatants and detached adherent cells. The cells were resuspended in supplemented DMEM that was used in all *in vitro* assays (10% FBS, 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES, 100 UI/mL penicillin, and 100  $\mu$ g/mL streptomycin). The BMDM concentration was determined, and the cells were seeded in tissue culture plates for 4–12 h to ensure complete adherence.

### Experimental Design With Bone Marrow-Derived Macrophages

BMDM were seeded at a density of  $2 \times 10^5$  cells/well in 24-well plates with circular coverslips for a trypomastigote internalization assay and lipid body assay (47); in 48-well plates for a trypomastigote release assay; and in 96-wells plates for NO, PGE<sub>2</sub>, and cytokine quantification in the supernatants. After cells were adhered to the plates, they were incubated for 24 h at 37°C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere with EV Y obtained from  $10^7$  *T. cruzi* trypomastigotes for parasite internalization, lipid body, and release assays. Next, the cultures were washed with PBS at 37°C to remove available EV Y, and trypomastigote forms from the *T. cruzi* Y strain were added to allow parasite–macrophage interaction as follows:  $1 \times 10^6$  parasites/well during 14 h of infection

for the internalization and supernatant assays,  $1 \times 10^6$  parasites/well for 24 h for the lipid body assay, and  $2 \times 10^4$  parasites/well during 14 h of infection for the release assay. Non-internalized trypomastigotes were removed by three washes with PBS at 37°C. For the NO assay in supernatants, lipopolysaccharide (LPS from *Escherichia coli* 026:B6) was used as a positive control (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA).

To investigate *T. cruzi* internalization, after 14 h of infection, we fixed macrophages with 100% methanol and stained them with Giemsa (Merck, Kenilworth, NJ, EUA). The coverslips were then removed from the plate and mounted on glass slides with Permount mounting medium (Fischer Chemical, Pittsburgh, PA, USA). Quantification of the number of amastigotes per macrophage was carried out using light microscopy where a total of 1,500–2,500 cells were randomly counted in each group. The internalization index was calculated by multiplying the percentage of infected cells by the mean number of parasites per infected cell (47, 48). The internalization of the control group, without EV Y, was considered 100%, and all internalization indices were normalized.

To determine the number of macrophage-released parasites, we collected the supernatants from 48-well plates daily and individually and subjected them to centrifugation ( $2,600 \times g$ , 5 min, RT). Trypomastigotes were counted in a Neubauer chamber. The results are expressed as total number of *T. cruzi* by sample (41, 49).

### Osmium Tetroxide Staining for Lipid Bodies

To evaluate if EV Y induces the formation of lipid bodies in macrophages, we stained infected and uninfected cells with osmium tetroxide as previously described (50), with some modifications. Macrophages were fixed with formaldehyde solution (formalin) 3.7%. Cells were then washed with distilled water and stained with osmium tetroxide 1% in 0.1 M cacodylate buffer solution for 30 min. Then, the cells were washed three times with distilled water and incubated with thiocarbonylhydrazide 0.25% for 3 min, a step that promotes reduction of osmium and highly enhances lipid labeling. The thiocarbonylhydrazide was removed, and osmium tetroxide 1% in 0.1 M cacodylate buffer was reintroduced for 5 min. Finally, the cells were washed three times with distilled water and mounted on glass slides with Permount mounting medium. The cells were analyzed by light microscopy, and the number of lipid bodies per macrophage was counted in at least 1,000 macrophages in each group. In this staining process, osmium tetroxide binds to unsaturated lipids and is reduced to elemental osmium, an easily visible and permanent black marker.

### PGE<sub>2</sub> Quantification

Prostaglandin E<sub>2</sub> quantification in spleen and macrophage cell-culture supernatants was performed by a Prostaglandin E<sub>2</sub> Express ELISA Kit from Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA). The test was performed according the instructions of the manufacturer, and the samples from infected mice or infected cells were diluted before analysis. The sensitivity of this assay was 15.6–2,000 pg/mL.

## Statistical Analysis

For column analysis, we used Student's *t*-test to compare two groups and one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's post-test for more than three groups. To analyze grouped data, we used two-way ANOVA with Tukey's or Sidak's post-test. The values are presented as the mean  $\pm$  SEM. The results were considered significant when  $P < 0.05$ . For statistical analysis, we used the program Prism (version 6.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

## RESULTS

### NTA of EVs Isolated From *T. cruzi* Strain Y

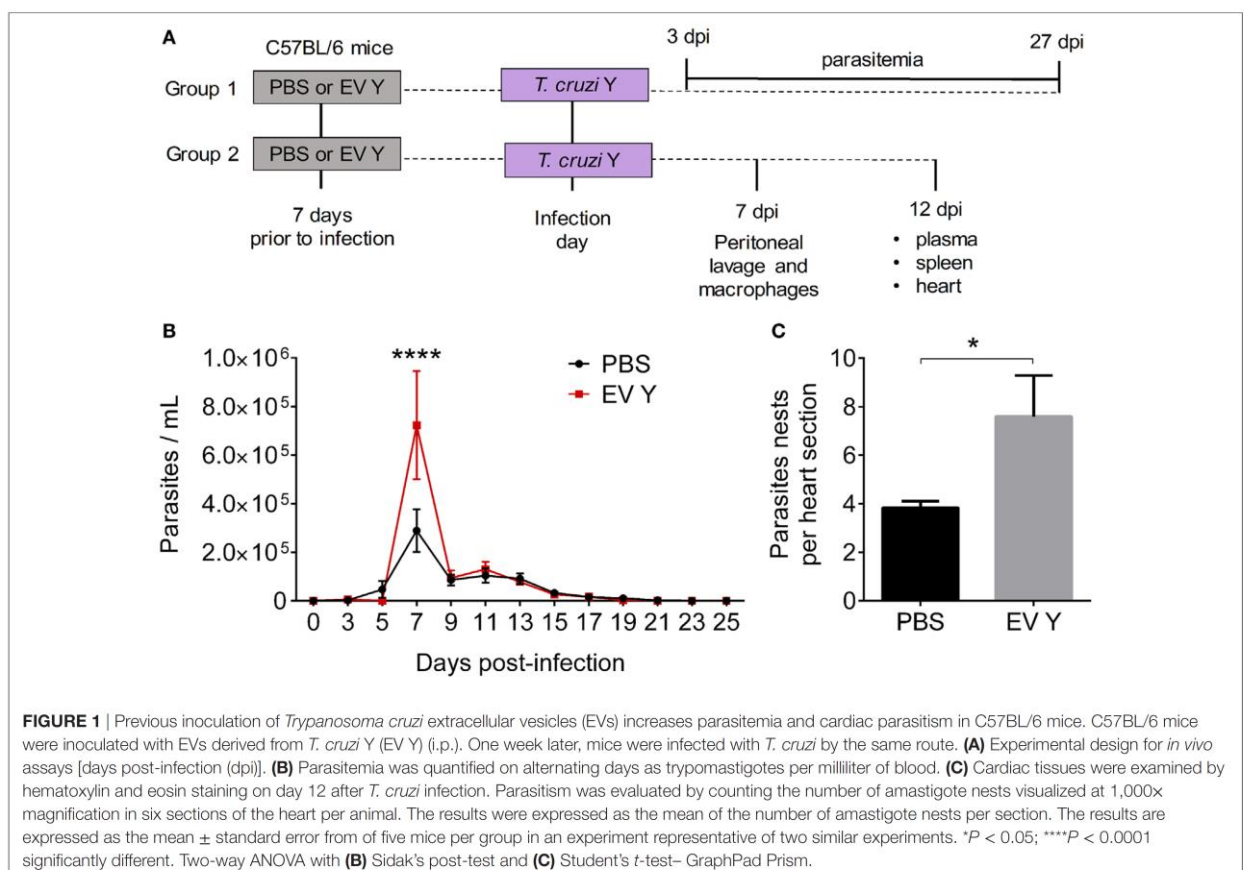
Extracellular vesicles spontaneously shed by tissue culture-derived trypomastigote forms from strain Y were analyzed by NTA and exhibited a profile compatible with that of previously described EVs of *T. cruzi* (15, 27, 51). In a representative analysis, EV Y had a mean diameter size of 136.33 nm with a SD of 86.3 nm and a mode of 94 (Figure S1 in Supplementary Material). Considering the range of EV Y sizes obtained, these suspensions are likely a mix of exosomes and plasma membrane-derived EVs. In this work, we will refer to those heterogeneous samples as EVs.

### *T. cruzi* EVs Increase Parasitemia and Cardiac Parasitism in C57BL/6 Mice

Inoculation with PBS or EV Y prior to infection (Figure 1A) did not alter the parasitic load in blood in the beginning of the infection, specifically on 3 and 5 dpi. However, at 7 dpi, EV Y-inoculated mice showed 2.5 times more parasites in blood than did control PBS mice (Figure 1B,  $P < 0.0001$ ). From 9 dpi, parasitemia constantly decreased, and by 17 dpi, the parasites in the blood appeared to be controlled in both PBS and EV Y-inoculated mice. Cardiac parasitism was also evaluated in PBS or EV Y-inoculated mice at 12 dpi. There were as many as two times more amastigote nests in the hearts of mice that had received EV Y prior to infection than in those of mice that had received only PBS prior to infection (Figure 1C,  $P < 0.05$ ).

### Inoculation of *T. cruzi* EVs Prior to Infection Decreases the Levels of Plasma NO and TNF- $\alpha$ and Production of NO and Cytokines by Spleen Cells From Infected Mice

Compared with control PBS inoculation in uninfected mice, EV Y inoculation in uninfected mice did not change NO in plasma



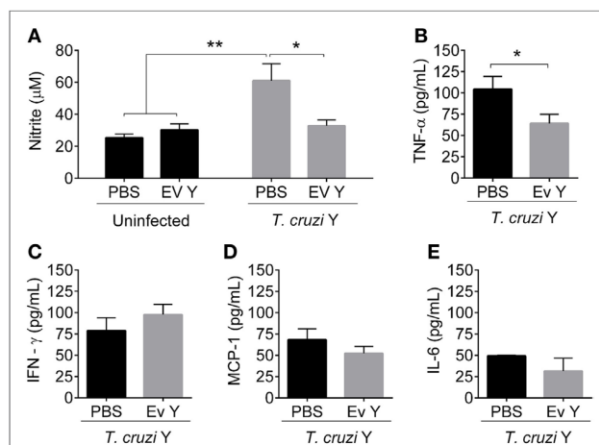
(Figure 2A). As expected, compared with PBS in the absence of infection or EV Y inoculation, infection triggered a two-fold increase in circulating NO at 12 dpi (Figure 2A,  $P < 0.01$ ). Although inoculation with EV Y had no effects on uninfected mice, inoculation with EV Y prior to infection downregulated the secretion of NO in mice infected at 12 dpi to half the NO levels in control mice (Figure 2A,  $P < 0.05$ ).

Cytokine plasma levels (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MCP-1, IL-12p70, IL-10, and IL-6) in uninfected mice inoculated with PBS or EV Y were lower than the limit of detection of the assay. In infected mice, the levels of IL-12p70 and IL-10 were also below the detection threshold. However, despite the low levels of cytokines in the plasma of uninfected mice, *T. cruzi* infection resulted in the induction of high levels of cytokines TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MCP-1, and IL-6 in plasma (Figures 2B–E). In addition, previous inoculation with EV Y in mice reduced the TNF- $\alpha$  level in plasma by ~50% compared with the level in PBS-inoculated infected mice (Figure 2B,  $P < 0.05$ ). However, EV Y inoculation prior to infection did not alter the levels of IFN- $\gamma$ , MCP-1, or IL-6 in the plasma of infected mice at 12 dpi compared with those in the plasma of PBS-inoculated infected mice (Figures 2C–E).

To assess the responsiveness of the immune cells from mice in the different experimental groups, we harvested spleen cells 12 days after *T. cruzi* inoculation (19 days after EV Y or PBS inoculation). Spleen cells from uninfected mice subjected to PBS or EV Y inoculation produced low and similar levels of NO when stimulated with TcAg (Figure 3A). Uninfected mouse spleen cells stimulated with TcAg resulted in increased levels of cytokines

TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MCP-1, IL-10, and IL-6 (Figures 3B–F). Spleen cells from uninfected mice inoculated with EV Y that were stimulated *in vitro* with TcAg showed at least two times lower levels of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, and IL-6 than did spleen cells from uninfected PBS-inoculated mice that were stimulated *in vitro* with TcAg (Figures 3B,C,E,F;  $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ , and  $P < 0.01$ , respectively).

As expected, compared with spleen cells from uninfected mice, spleen cells from *T. cruzi*-infected mice spontaneously produced more NO and cytokines when cultured with medium and even more when stimulated *in vitro* with TcAg (Figure 3). The spontaneous and TcAg-stimulated NO production by spleen cells isolated from infected mice inoculated with EV Y before infection was significantly lower than that by spleen cells from PBS-inoculated mice (Figure 3G,  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ ). In the same way, compared with spleen cells from PBS-inoculated mice that were stimulated *in vitro* with TcAg, spleen cells isolated from infected mice inoculated with EV Y before infection produced approximately half the levels of pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-6 when stimulated *in vitro* with TcAg (Figures 3H,L,  $P < 0.01$  and  $P < 0.0001$ , respectively). However, EV Y inoculation *in vivo* was not always associated with a decrease in *ex vivo* production of cytokines. Even in the TcAg-stimulated spleen cells, inoculation with EV Y prior to infection did not alter the production of the pro-inflammatory cytokines IFN- $\gamma$  (Figure 3I) and MCP-1 (Figures 3D,J). Notably, EV Y inoculation did not alter the production of the regulatory cytokine IL-10 (Figure 3K).

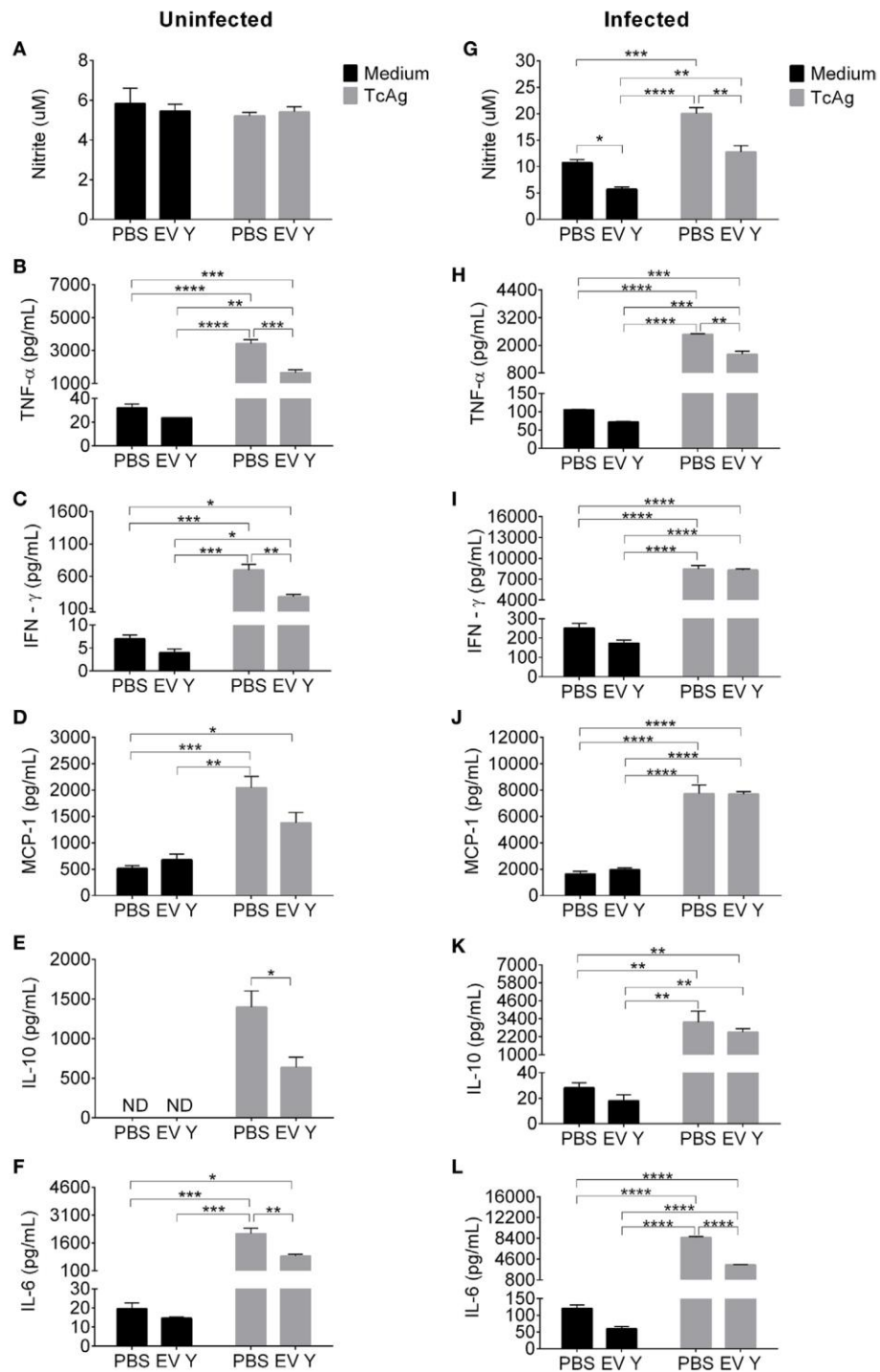


**FIGURE 2** | Inoculation of *Trypanosoma cruzi* extracellular vesicles (EVs) prior to infection decreases the plasmatic levels of nitric oxide and TNF- $\alpha$  in infected mice. C57BL/6 mice were inoculated with EVs derived from *T. cruzi* Y (EV Y) or phosphate-buffered saline (PBS, i.p.). One week later, the mice were infected with *T. cruzi* by the same route. Uninfected and PBS-inoculated mice were used as controls. Plasma was collected on day 12 after *T. cruzi* infection. (A) Nitrite in infected and uninfected mice was quantified by the cadmium Griess assay. Cytokines (B) TNF- $\alpha$ , (C) IFN- $\gamma$ , (D) MCP-1, and (E) IL-6 were quantified by the Cytometric Bead Array. The results are expressed as the mean  $\pm$  standard error from 5 to 9 mice per group in an experiment representative of two similar experiments. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$  significantly different. Two-way ANOVA with (A) Sidak's post-test and (B–E) Student's *t*-test—GraphPad Prism.

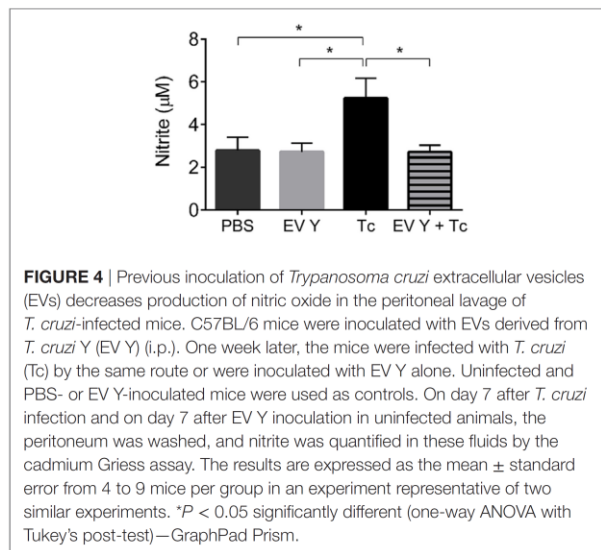
### Previous Inoculation of *T. cruzi* Extracellular Vesicles Decreases Production of Nitrite in the Peritoneal Lavage and Alters the Expression of Surface Activation Molecules in Macrophages Harvested From *T. cruzi*-Infected Mouse Peritoneum

The inoculation of PBS or EV Y *in vivo* and infection with *T. cruzi* were always performed by the intraperitoneal route. Hence, we decided to analyze the peritoneal environment through the quantification of NO in the peritoneal lavage and through phenotypical analyses of the macrophages present in the peritoneum of uninfected mice at 7 days after PBS or EV Y inoculation and in that of infected mice at 7 dpi (14 days after EV Y or PBS inoculation). In the uninfected groups, the NO levels were the same between PBS- or EV Y-inoculated mice (Figure 4). Compared with uninfected mice, PBS-inoculated mice showed a two-fold increase in NO production in the peritoneal lavage after *T. cruzi* infection. These increased levels of NO were not observed in mice that had received EV Y prior to infection (Figure 4).

The flow cytometry analysis of peritoneal macrophages is represented in Figure 5A. For this analysis, doublets were excluded, and peritoneal macrophages were identified according to size and complexity. From this gate, only CD11b<sup>+</sup> cells were analyzed. Although most cells in the selected gate showed surface expression of the markers CD11b<sup>+</sup> and CD45<sup>+</sup>, confirming the



**FIGURE 3** | Inoculation of *Trypanosoma cruzi* extracellular vesicles (EVs) prior to infection decreases production of nitric oxide and cytokines by spleen cells from infected mice. C57BL/6 mice were inoculated with EVs derived from *T. cruzi* Y (EV Y) (i.p.). One week later, the mice were infected with *T. cruzi* (Y strain) by the same route. Infected, uninfected, and PBS-inoculated mice were used as controls. Spleens were harvested 12 days after *T. cruzi* infection (19 days after EV Y or PBS inoculation). The cells were cultured with medium or *T. cruzi* antigen (TcAg) for 48 h. **(A,G)** Nitrite in the supernatants of cultured spleen cells from uninfected mice (left column) and cultured spleen cells from infected mice (right column) were quantified by the Griess assay. Cytokines **(B,H)** TNF- $\alpha$ , **(C,I)** IFN- $\gamma$ , **(D,J)** MCP-1, **(E,K)** IL-10, and **(F,L)** IL-6 in the supernatants of cultured spleen cells from uninfected and infected mice, respectively, were quantified by the Cytometric Bead Array. The results are expressed as the mean  $\pm$  standard error from four mice per group in an experiment representative of two similar experiments. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$  significantly different (two-way ANOVA with Tukey's post-test)—GraphPad Prism.



selection of the macrophage population (Figure 5B), the median fluorescence intensity (MIF) of CD11b after infection decreased by 50% in the PBS- and EV-inoculated groups (Figure 5C,  $P < 0.01$ ). The percentage of cells expressing the co-stimulatory receptor CD86 was not significantly different between the groups (Figure 5D), but the cells from PBS-inoculated and infected mice showed more CD86 in macrophages than did cells from uninfected mice. Surprisingly, compared with the macrophages from uninfected groups, the macrophages from the group that had received EV Y before infection did not show increased CD86 (Figure 5E).

As expected, all cells exhibited the major histocompatibility complex class I (MHC-I) protein (Figure 5F), and infection increased MHC-I in macrophages by approximately sevenfold (Figure 5G,  $P < 0.0001$ ).

The percentage of macrophages positive for MHC-II molecules was similar between the uninfected groups (PBS- and EV Y-inoculated). The infection triggered an increase in macrophages presenting MHC-II in mice inoculated with PBS before infection ( $P < 0.0001$ ). Despite the increase in MHC-II in macrophages from EV Y-inoculated infected mice, this increase was 34% lower than that observed in macrophages from the PBS-inoculated and infected mice (Figure 5H,  $P < 0.05$ ). When the levels of MHC-II were analyzed by MIF, macrophages from mice inoculated with EV Y and from mice that were uninfected showed higher MHC-II expression than did all the other mice, even infected mice (Figure 5I).

Concerning the analysis of F4/80 protein, the percentage of macrophages that tested positive for this protein was reduced by 50% in the PBS-inoculated and infected group. The infection did not induce a reduction in F4-80 expression in mice that had received EV Y before the infection (Figure 5J,  $P < 0.05$ ). The uninfected group showed higher F4/80 expression levels than did the following three groups: EV Y-inoculated and uninfected, PBS-inoculated and infected, and EV Y-inoculated and infected groups (Figure 5K,  $P < 0.001$ ).

## Macrophage Stimulation With *T. cruzi* EV Y Increases *T. cruzi* Infection and Trypomastigote Release From Infected Cells but Decreases Nitrite Production

In the *in vitro* assays, BMDMs were incubated with EV Y for 24 h, and after removal of EV Y, the cells were infected with trypomastigotes (Figure 6A). This previous contact of the macrophages with EV Y promoted a significant increase (82%) in the number of internalized amastigotes, as assessed by the internalization index (Figure 6B,  $P < 0.01$ ). The mean number of amastigotes in 250 macrophages showed that macrophages previously stimulated with EV Y were more infected and presented a higher number of internalized amastigotes (Figures 6C,D).

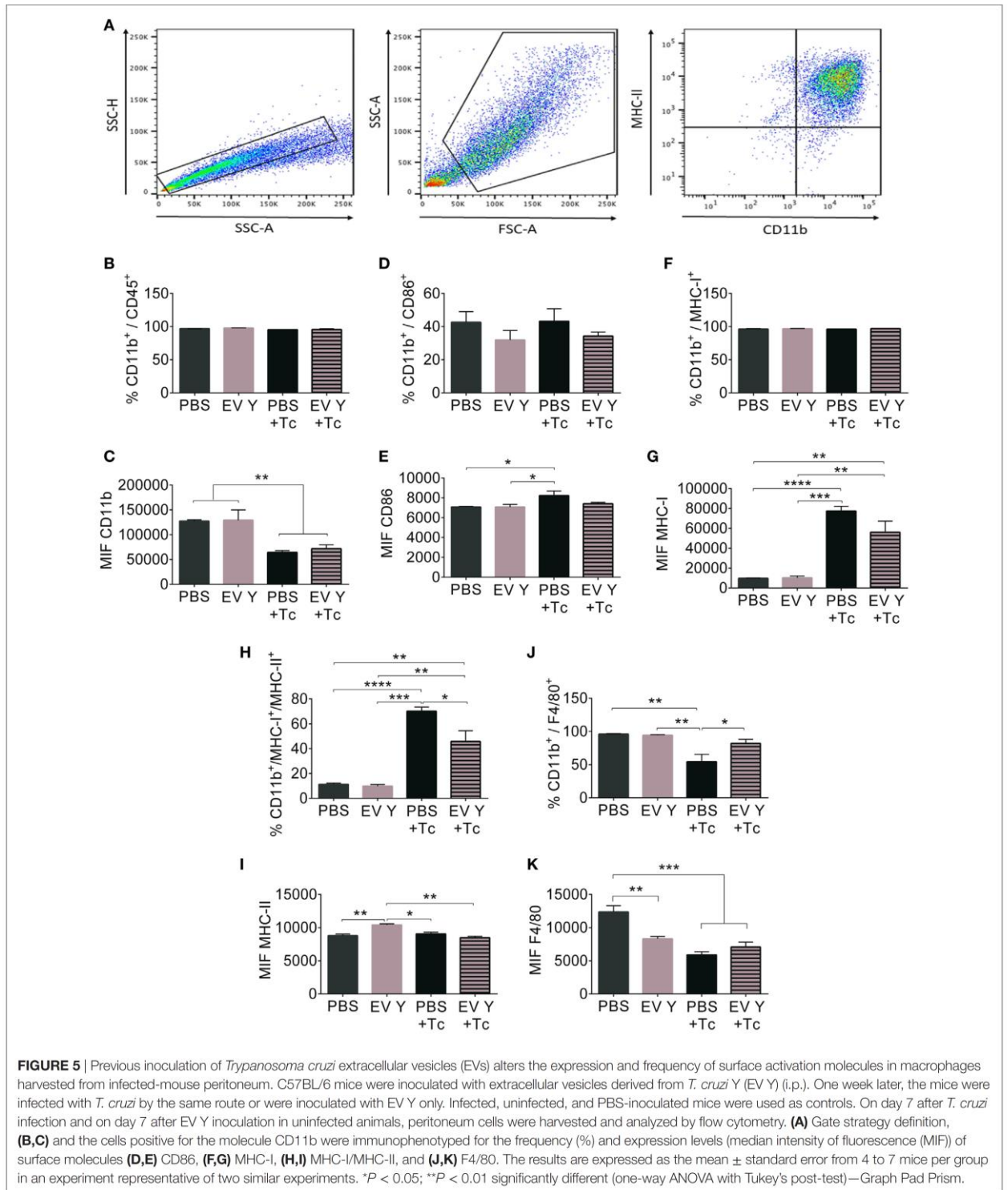
To verify the infection efficiency rate, we measured the release of trypomastigotes daily in the supernatant of infected macrophage cultures. The macrophages that had contact with EV Y before infection released three times more trypomastigotes than did the macrophages cultured only with medium, especially on the eighth day after the infection (Figure 6E,  $P < 0.0001$ ).

To evaluate the modulation of NO production by EV Y *in vitro*, as BMDM were not activated by *in vivo* events such as chemotaxis gradients or cytokines, we stimulated BMDMs with LPS. LPS is a classical activator of macrophages by TLR4 stimulation; in response to LPS, macrophages produce NO, among other things (positive control) (45). Macrophages were incubated with EV Y for 24 h, and after removal of EV Y, cells were stimulated with LPS for another 24 h. Incubation with EV Y alone did not induce NO production by macrophages. By contrast, LPS induced high levels of NO release by macrophages ( $P < 0.0001$ ). However, compared with macrophages stimulated with LPS alone, macrophages incubated with EV Y and then stimulated with LPS produced half of the level of NO (Figure 6F,  $P < 0.001$ ).

## EV Y Stimulation Induces Macrophage Lipid Body Formation and PGE<sub>2</sub> Production and Reduces Pro-Inflammatory Cytokine Production

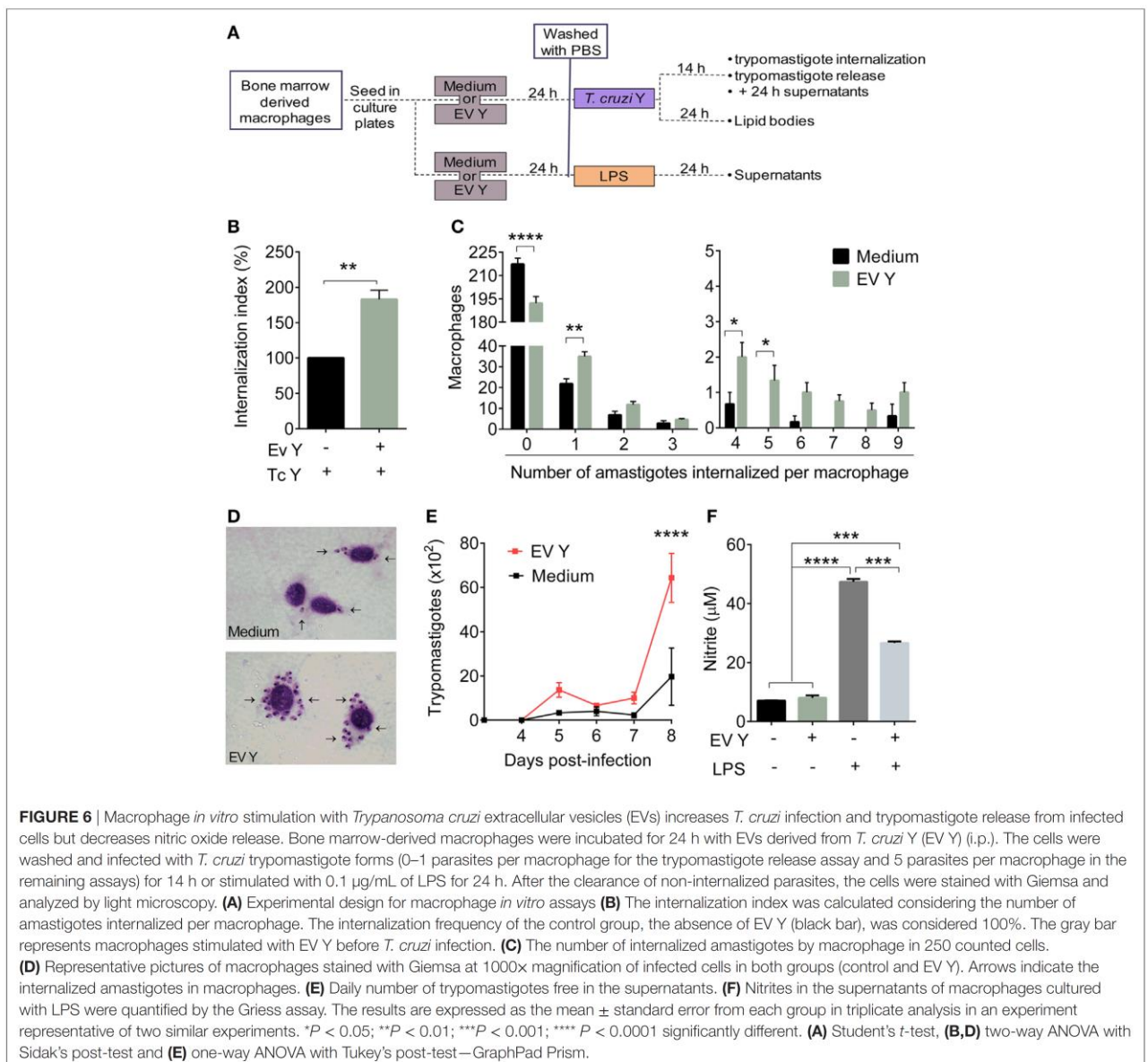
To verify the influence of EV Y in lipid body formation in macrophages, we incubated BMDMs with EV Y for 24 h, and after removal of EV Y, the cells were infected with trypomastigotes for another 24 h. Non-stimulated or EV Y-stimulated cells were analyzed. Osmium tetroxide staining was used to detect lipid bodies, which resemble black marks in the cytoplasm (Figure 7B). The infection increased the formation of lipid bodies in macrophages by fourfold, and previous incubation with EV Y did not alter these lipid body levels. Interestingly, incubation of macrophages with EV Y alone was sufficient to induce lipid bodies in macrophages (Figure 7A,  $P < 0.01$ ).

Additionally, we assessed PGE<sub>2</sub> production by macrophages exposed to EV Y. In addition to lipid body formation, EV Y-stimulated macrophages showed higher PGE<sub>2</sub> production than did non-stimulated macrophages (Figure 7C,  $P < 0.01$ ). Previous contact with EV Y markedly reduced PGE<sub>2</sub> production in uninfected cells compared with that in infected cells



cultured with medium ( $P < 0.001$ ). EV Y also decreased TNF- $\alpha$  ( $P < 0.01$ ) and IL-6 ( $P < 0.001$ ) production in infected macrophages (Figure 7C).

To assess the *in vivo* effect of EV Y on PGE<sub>2</sub> production, we harvested spleen cells from mice in the different experimental groups 12 days after *T. cruzi* inoculation (19 days after EV Y or



PBS inoculation) and cultured them *in vitro* with medium or stimulated them with TcAg for 8 h. Spleen cells from uninfected and infected mice stimulated with TcAg produced more  $\text{PGE}_2$  than did non-stimulated cells (Figures 7D,E,  $P < 0.05$ ). In contrast to macrophages exposed to EV Y *in vitro*, macrophages and spleen cells inoculated with EV Y *in vivo* did not exhibit altered  $\text{PGE}_2$  production in these animals at this time point in either uninfected or infected mice (Figures 7D,E).

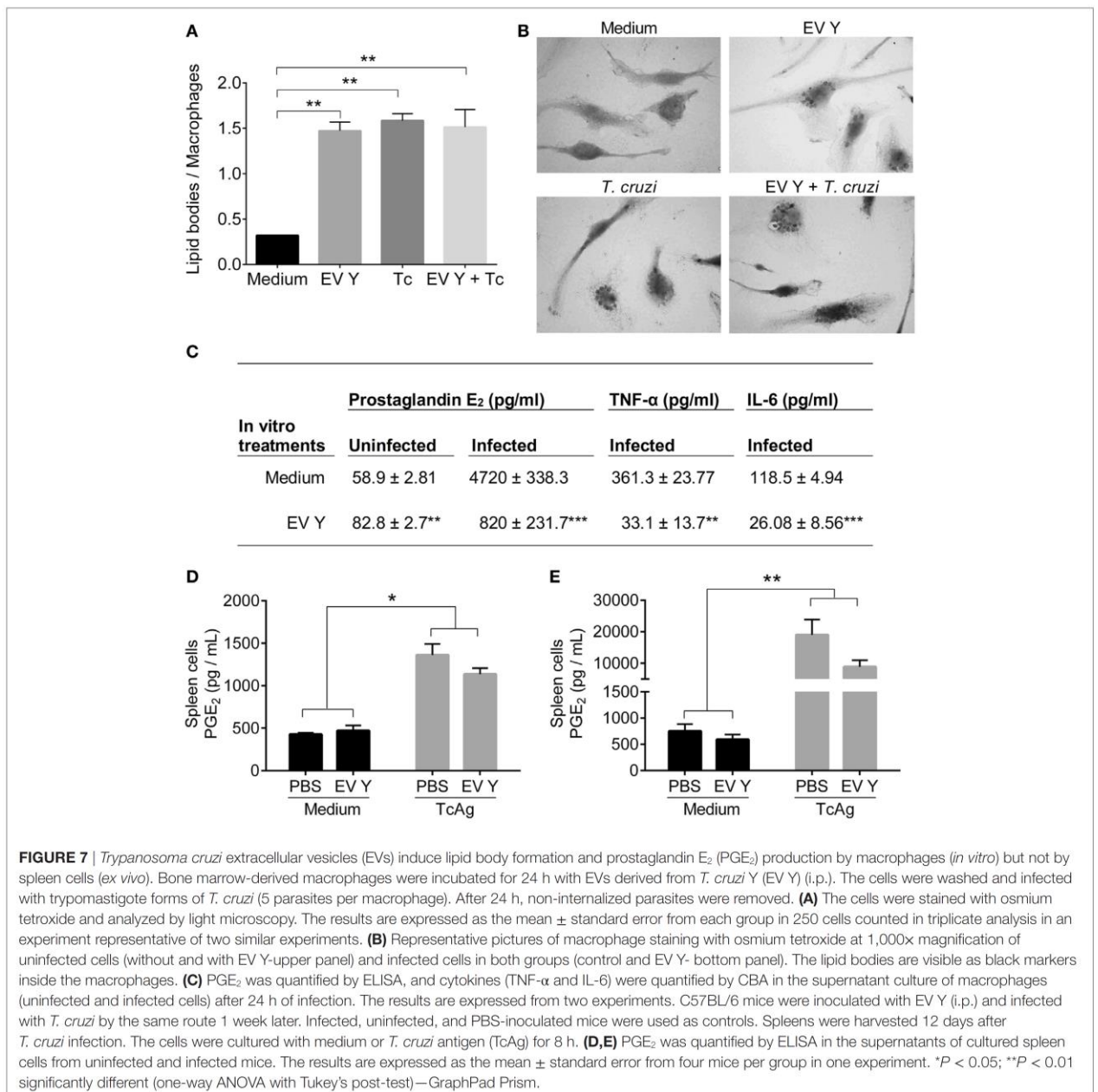
## DISCUSSION

The pathogenesis of Chagas disease is complex and involves many interactive pathways between hosts and parasites (52). In this context, only in the last decade has the role of EVs released

by *T. cruzi* been recognized; however, the mechanisms by which EV Y exert their pathological effects are incompletely understood (53). Elucidating the underlying mechanism of the pathogenic effects of EVs shed by *T. cruzi* is pertinent to better understand the parasite–host relationship.

In 2009, a study reported that inoculation with EVs shed by *T. cruzi* prior to infection in susceptible BALB/c mice increased cardiac parasitism and accelerated mortality rates, without a significant increase in blood parasitemia (26). Herein, we explored the role of EV Y in experimental acute murine infection using resistant C57BL/6 mice and the Y strain of *T. cruzi*. Animal inoculation with EV Y before infection with trypomastigote forms led to a transient but substantial increase in the blood parasitic load at the beginning of the infection (7 dpi). A few days later,





at 12 dpi, when the blood parasitic load was similar between the control and the EV Y-inoculated groups, amastigote parasitism in cardiac tissue was higher in mice that had received EV Y prior to infection. However, inoculation with EV Y before infection did not lead to mortality among the animals.

The role of EV Y in intercellular communication between host cells and *T. cruzi* has been considered in recent years (54). Bayer-Santos et al. showed that EVs released by *T. cruzi* are endocytosed by cells and reach the cytoplasm where they can eventually release their content (15). In another study, Neves et al. demonstrated that EVs shed by *T. cruzi* Y strain act in macrophages by increasing the

adherence of the parasite, while EVs released by *T. cruzi* CL-Brener strain enhance macrophage infection by this strain through acid phosphatase activities (55). Garcia-Silva et al. showed that EV cargo promotes the life-cycle transition of epimastigotes into trypomastigotes and can be transferred between parasites and susceptible mammalian cells, increasing their infection susceptibility (28). The effects of EVs shed by parasites in infections are not exclusive to *T. cruzi*. In fact, in murine infections with *Leishmania major* and *Leishmania donovani*, preinoculation with EVs from these parasites resulted in increased edema and parasitism in the hind legs of mice (23). *In vitro*, the communication

between parasites and macrophages through parasite EVs was also described in *Leishmania* by Silverman et al., who showed that parasite EVs induced production of IL-8 but not TNF- $\alpha$  by macrophages, which led to immunosuppression in the host and prepared cells for *Leishmania* infection (56).

During the acute phase of infection, the recognition of *T. cruzi* by Toll-like receptors on macrophages (57) triggers production of TNF- $\alpha$  and IL-12, which in turn activates other cells, such as natural killers and lymphocytes, to produce IFN- $\gamma$  (58). Hence, IFN- $\gamma$  activates macrophages and controls intracellular parasite growth through the production of NO by the enzyme inducible nitric oxide synthase (iNOS) and reactive oxygen molecules (6, 59, 60). NO has a trypanocidal effect (39) as it reacts with superoxide ( $O_2^-$ ) to produce the very toxic molecule peroxynitrite ( $ONOO^-$ ), which leads to oxidation of thiol groups and nitrosylation of parasitic amino acids and proteins (61, 62). NO also modulates the effector immune response by regulating/enhancing inflammation during *T. cruzi* infection (60).

Although infection with *T. cruzi* triggered NO production assessed in plasma, mice that were inoculated with EV Y prior to *T. cruzi* challenge did not show a corresponding increase in the plasmatic levels of the trypanocidal molecule NO. In the peritoneum, the location of EV Y and *T. cruzi* inoculation, the levels of NO in mice that had received EV Y prior to infection were also lower than those in control mice and were similar to the levels in uninfected mice. The same phenomenon occurred *in vitro* when spleen cells from mice that had received EV Y *in vivo* before infection were stimulated with TcAg. Taken together, these data show that intraperitoneal inoculation with EV Y was able to alter the responsiveness of immune cells both locally and systemically. Inoculation of EV Y without subsequent infection did not stimulate NO production in plasma, peritoneal lavage or spleen-cell supernatants. These results suggest that EV Y stimulation had no direct trypanocidal activity in host macrophages, but it modulates these cells, creating a favorable environment for the parasite with lower NO production, which probably contributes to the higher parasitemia observed in mice treated with EV Y before infection.

The lower production of NO in infected mice induced by previous contact with EV Y partially corroborates the results of Torrecilhas et al. (26). They described the low activity of iNOS in the heart tissue of infected BALB/c mice primed with *T. cruzi* vesicles, but there was no significant difference in NO levels in the supernatants of spleen-cell cultures between vesicle-treated and control animals. In a chronic study developed by Nogueira et al., spleen cells from infected mice at 180 dpi were cultured *in vitro* with vesicles from different *T. cruzi* strains and responded with increased production of NO (51). However, a major difference between these studies should be mentioned and has to be taken into consideration; in the acute infection model shown here and by Torrecilhas et al., EV Y was administered *in vivo* before infection (26), whereas in the chronic model, the vesicles were added *in vitro* to the spleen cells of chronically infected animals (51).

Although inoculation was always performed in the peritoneal cavity, our study provided further evidence for the systemic effect of EV Y in infected mice; modulation of the innate immune response was demonstrated by the low plasmatic levels of TNF- $\alpha$

and by low production of TNF- $\alpha$  and IL-6 by spleen cells stimulated *in vitro* with TcAg. During the first weeks of infection, the pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-6 are required for activation of inflammatory cells and for a subsequent efficient Th1 immune response against the parasite (7, 40, 63). Low production of these cytokines induced by previous contact with EV Y probably favored the infection. Additionally, inoculation with EV Y did not change production of the regulatory cytokine IL-10 by spleen cells from infected mice stimulated *in vitro* with TcAg. The high concentration of IL-10 during the acute phase is associated with failed control of infection (64), and as shown here, EV Y altered the balance between the pro-inflammatory/regulatory cytokines toward an immunoregulatory profile. Consistent with these results, Torrecilhas et al. showed increased expression of IL-10 and IL-4 mRNA in heart tissue from BALB/c mice treated with *T. cruzi* vesicles before infection and showed low production of TNF- $\alpha$  by macrophages stimulated *in vitro* with *T. cruzi* vesicles (26).

EV Y inoculation without infection did not stimulate the production of NO, but spleen cells from uninfected mice inoculated with EV Y and stimulated *in vitro* with TcAg produced lower levels of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, and IL-6 than did spleen cells from control mice. Although these cells never had contact with the parasite, they responded to the TcAg stimulus by producing cytokines, albeit at a lower level than the infected animals. Even in these non-primed cells, EV Y exercised immunomodulatory effects by decreasing the production of cytokines after stimulus.

The phenotypic analysis of peritoneal macrophages showed a high percentage of cells positive for CD11b and CD45, confirming that the peritoneal population analyzed was composed of macrophages. CD11b belongs to the integrin  $\beta 2$  family and plays an important role in the migration of macrophages (65), while CD45, a protein tyrosine phosphatase expressed on all cells of hematopoietic origin, is associated with the adhesion process (66). The reduction in the amount of these superficial molecules observed in both the EV Y and control groups may be related to the internalization mechanisms of these molecules in activated macrophages (67).

Macrophages present antigens to lymphocytes through peptides associated with MHC-I (endogenous antigens) and MHC-II (exogenous antigens) molecules (68). Additionally, co-stimulatory molecules, such as CD86 (or B-7), are necessary for efficient activation of lymphocytes by macrophages (69). EV Y inoculation before infection did not alter the percentage and expression of MHC-I in peritoneal macrophages. However, compared with PBS inoculation before infection, EV Y inoculation before infection resulted in a lower percentage of macrophages that were positive for MHC-II. Extrapolating these data, the results indicate that previous contact with EV Y might interfere with the presentation of phagocytized antigens by macrophages to lymphocytes. Reinforcing this interpretation, peritoneal macrophages from mice that received EV Y before infection showed less CD86 than did macrophages from mice that received PBS before infection. Interestingly, although EV Y inoculation without infection did not change the percentage of MHC-II positive cells, the expression or the amount of MHC-II in these cells was slightly higher than that in all the other cells, as assessed by the MIF.

The F4/80 molecule, frequently used as a marker for mouse macrophages, has been characterized as a member of the epidermal growth factor (EGF)-transmembrane 7 (TM7) family, and there is evidence for its role in the induction of immunological tolerance (70). The induction of tolerance instead of an inflammatory environment could be beneficial to the parasite. The percentage of macrophages positive for F4/80 decreased in PBS-infected mice but not in mice that had received EV Y before infection. This downregulation of F4/80 in macrophages indicates how EV Y could be modulating the immune response toward a less inflammatory environment. Surprisingly, the amount of F4/80 was lower in macrophages inoculated with EV Y without infection than in macrophages inoculated with PBS without infection.

Considering the *in vivo* immunomodulatory effects exerted by EV Y described here, we investigated the specific role of EV Y using *in vitro* assays with BMDMs. Macrophages that had contact with EV Y before infection exhibited enhanced internalization of *T. cruzi* trypomastigotes. In the initial steps of infection, in addition to the adherence and invasion process, *T. cruzi* needs to evade the trypanocidal response of macrophages to replicate and continue its life cycle (13). In addition to a higher internalization rate, EV Y enhanced the release of parasites by macrophages. Moreover, corroborating our *in vivo* findings, the effect of EV Y in decreasing macrophage responsiveness was confirmed by the reduction in NO production in macrophage cultures activated with LPS, a classic TLR4 agonist and inducer of NO production (45).

In 2003, Melo et al. demonstrated for the first time that *T. cruzi* infection triggers the formation of lipid bodies in macrophages (71), and this event is directly related to PGE<sub>2</sub> synthesis by macrophages (71, 72). They also showed that the enzyme cyclooxygenase-2 (COX-2) is co-localized with lipid bodies in infected macrophages, further strengthening these structures as substrates that are necessary for PGE<sub>2</sub> synthesis (72). As expected, in our assays, infection with *T. cruzi* induced lipid body formation in macrophages. However, the contact of macrophages with EV Y without infection also induced lipid bodies in those cells but did not cause additional lipid body formation in infected macrophages. In fact, D'Avila et al. demonstrated that uninfected macrophages from the infected group also showed higher lipid body formation than did macrophages from the control group; the authors described this observation as bystander amplification (72). These results provide new insights to explain this phenomenon where EVs shed by *T. cruzi* induce lipid body formation in uninfected macrophages.

Additionally, EV Y alone induced production of PGE<sub>2</sub> by macrophages. PGE<sub>2</sub> production by activated macrophages occurs at the beginning of *T. cruzi* infection by the COX enzyme and plays a crucial role during the development of the infection (73–75). In macrophages, high concentrations of PGE<sub>2</sub> diminished the production of pro-inflammatory cytokines and reduced antigen presentation and production of free radicals in these cells (76, 77). In this way, PGE<sub>2</sub> is associated with the immunosuppression observed in infected mice with reduced lymphocyte proliferation and TNF- $\alpha$  production (73, 78). Moreover, uptake of apoptotic cells by macrophages during *T. cruzi* infection potentiates release of PGE<sub>2</sub> and TGF- $\beta$  by these cells, consequently decreasing production of NO, allowing intracellular parasite survival and

growth (79). Furthermore, pharmacological inhibition of COX-2 using aspirin in peritoneal macrophages of BALB/c mice diminished *T. cruzi* internalization with consequent increases in IL-1 $\beta$ , NO and lipoxin production (80). Hence, increased production of PGE<sub>2</sub> in macrophages that had contact with EV Y supports reduced production of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ ) and NO that occurred in plasma and spleen-cell supernatants (TNF- $\alpha$  and IL-6) from mice inoculated with EV Y before infection. However, the release of PGE<sub>2</sub> by infected macrophages after 24 h was significantly lower in cells that had contact with EV Y prior to infection than in cells without contact prior to infection. Although the EV Y induced lower levels of PGE<sub>2</sub> produced by infected macrophages, the pro-inflammatory status of these cells was already downregulated, as shown by the abrupt reduction in release of the cytokines TNF- $\alpha$  and IL-6. Therefore, the immune modulation exerted by PGE<sub>2</sub> that was induced by EV Y seems to be important specifically in the beginning of infection. In support of this hypothesis, *in vitro* production of PGE<sub>2</sub> by spleen cells harvested from mice at 12 dpi did not change between animals inoculated with PBS or EV Y prior to infection, while the pro-inflammatory cytokines were downregulated in the same cells from animals inoculated with EV Y. Moreover, Moraes et al. showed that during the first 48 h of *T. cruzi* infection in H9c2 cells, COX-2 expression and activity are modulated by the parasite, leading to the control of the pro-inflammatory environment in infected cells (81). Considering that EVs shed by *T. cruzi* alter the gene expression of host cells (28), we hypothesize that EV Y could be modulating the expression and activity of COX-2.

In conclusion, our results indicate that EV Y exerts effects on host cells before infection, making the environment more favorable to *T. cruzi* in the first moments of infection. We showed that EVs released by *T. cruzi* modulate the immune response *in vivo* and demonstrated that this modulation occurs *in vitro* by direct effects on macrophages. These effects induce formation of lipid bodies and production of PGE<sub>2</sub> and create a more favorable environment for parasite infection, with a reduction in inflammatory cytokines and the trypanocidal molecule NO. These results support the role of *T. cruzi* EVs in the complex pathogenesis of the acute phase of Chagas disease and provide new insights for a better understanding of the parasite–host relationship.

## ETHICS STATEMENT

This study was carried out in accordance with the recommendations of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Brazilian National Council of Animal Experimentation. The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments at Londrina State University (CEEA, process number 11/2015- 7045.2015.06). The use of Swiss mice for the maintenance of the parasite strain was also approved for the Committee on the Ethics of Animal Experiments at Londrina State University (CEEA, process number 28.841.2016.41).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

MM, SG, PW, and PF contributed to conception and design of the study. PM standardized and performed extracellular

microvesicles isolation. MM, AM, NZ, BL and VT performed animal and cell culture experiments. AO contributed to establishment of lipid body staining and analysis. MM, PW, and PF wrote the first draft of the manuscript. All authors contributed to manuscript revision. All authors read and approved the submitted version.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge their financial support and Dr. Patricia Torres Bozza Viola from the Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz -RJ for help with lipid body analysis. The authors also acknowledge Thiago Fernandes from Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálises, Central de Laboratórios de Pesquisa Multiusuários, Universidade Estadual de Londrina for help with osmium tetroxide staining.

## REFERENCES

- Chagas C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* (1909) 1:159–218. doi:10.1590/S0074-02761909000200008
- World Health Organization. *Chagas Disease (American Trypanosomiasis)*. (2017). Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> (updated March 2017; Accessed: March 31, 2018).
- Andrade DV, Gollob KJ, Dutra WO. Acute Chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. *PLoS Negl Trop Dis* (2014) 8(7):e3010. doi:10.1371/journal.pntd.0003010
- Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet* (2010) 375(9723):1388–402. doi:10.1016/S0140-6736(10)60061-X
- Bern C, Martin DL, Gilman RH. Acute and congenital Chagas disease. *Adv Parasitol* (2011) 75:19–47. doi:10.1016/B978-0-12-385863-4.00002-2
- Costa VM, Torres KC, Mendonça RZ, Gresser I, Gollob KJ, Abrahamson IA. Type I IFNs stimulate nitric oxide production and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* (2006) 177(5):3193–200. doi:10.4049/jimmunol.177.5.3193
- Wirth JJ, Kierszenbaum F. Recombinant tumor necrosis factor enhances macrophage destruction of *Trypanosoma cruzi* in the presence of bacterial endotoxin. *J Immunol* (1988) 141(1):286–8.
- Silva JS, Aliberti JC, Martins GA, Souza MA, Souto JT, Padua MA. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Braz J Med Biol Res* (1998) 31(1):111–5. doi:10.1590/S0100-879X1998000100014
- Zanluchi NG, Wovk PF, Pinge-Filho P. Macrophage polarization in Chagas disease. *J Clin Cell Immunol* (2015) 6:6. doi:10.4172/2155-9899.1000317
- Guilmot A, Bosse J, Carlier Y, Truysen C. Monocytes play an IL-12-dependent crucial role in driving cord blood NK cells to produce IFN- $\gamma$  in response to *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis* (2013) 7(6):e2291. doi:10.1371/journal.pntd.0002291
- Hoft DF, Schnapp AR, Eickhoff CS, Roodman ST. Involvement of CD4(+) Th1 cells in systemic immunity protective against primary and secondary challenges with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* (2000) 68(1):197–204. doi:10.1128/IAI68.1.197-204.2000
- Cardillo F, Postol E, Nihei J, Aroeira LS, Nomizo A, Mengel J. B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8+ T-cell responses in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology* (2007) 122(4):584–95. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02677.x
- Cardoso MS, Reis-Cunha JL, Bartholomeu DC. Evasion of the immune response by *Trypanosoma cruzi* during acute infection. *Front Immunol* (2015) 6:659. doi:10.3389/fimmu.2015.00659
- Colombo M, Raposo G, Thery C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* (2014) 30:255–89. doi:10.1146/annurev-cellbio-101512-122326

## FUNDING

This work was supported by grants from CNPq-Universal (457014/2014-18), CNPq/MS/SCTIE/DECIT 31/2014 - Pesquisas sobre Doença de Chagas (466992/2014-9), and Fundação Araucária, PRONEX (255/2013). The Animal Facility from Instituto Carlos Chagas/Fiocruz-PR. Maria Isabel Lovo-Martins' scholarship is supported by CNPq. PFW (460/2013) was a Fundação Araucária fellow, and SG (306709/2016-3) and PPF (307787/2015-0) are CNPq fellows.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.00896/full#supplementary-material>.

- Bayer-Santos E, Aguilar-Bonavides C, Rodrigues SP, Cordero EM, Marques AF, Varela-Ramirez A, et al. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* secretome: characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins. *J Proteome Res* (2013) 12(2):883–97. doi:10.1021/pr300947g
- da Silveira JF, Abrahamson PA, Colli W. Plasma membrane vesicles isolated from epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Biochim Biophys Acta* (1979) 550(2):222–32. doi:10.1016/0005-2736(79)90209-8
- Del Cacho E, Gallego M, Lee SH, Lillehoj HS, Quilez J, Lillehoj EP, et al. Induction of protective immunity against *Eimeria tenella* infection using antigen-loaded dendritic cells (DC) and DC-derived exosomes. *Vaccine* (2011) 29(21):3818–25. doi:10.1016/j.vaccine.2011.03.022
- Giri PK, Schorey JS. Exosomes derived from *M. Bovis* BCG infected macrophages activate antigen-specific CD4+ and CD8+ T cells in vitro and in vivo. *PLoS One* (2008) 3(6):e2461. doi:10.1371/journal.pone.0002461
- Beauvillain C, Ruiz S, Guiton R, Bout D, Dimier-Poisson I. A vaccine based on exosomes secreted by a dendritic cell line confers protection against *T. gondii* infection in syngeneic and allogeneic mice. *Microbes Infect* (2007) 9(14–15):1614–22. doi:10.1016/j.micinf.2007.07.002
- Beauvillain C, Juste MO, Dion S, Pierre J, Dimier-Poisson I. Exosomes are an effective vaccine against congenital toxoplasmosis in mice. *Vaccine* (2009) 27(11):1750–7. doi:10.1016/j.vaccine.2009.01.022
- Schnitzer JK, Berzel S, Fajardo-Moser M, Remer KA, Moll H. Fragments of antigen-loaded dendritic cells (DC) and DC-derived exosomes induce protective immunity against *Leishmania major*. *Vaccine* (2010) 28(36):5785–93. doi:10.1016/j.vaccine.2010.06.077
- Cronemberger-Andrade A, Aragao-Franca L, de Araujo CF, Rocha VJ, Borges-Silva Mda C, Figueira CP, et al. Extracellular vesicles from *Leishmania*-infected macrophages confer an anti-infection cytokine-production profile to naive macrophages. *PLoS Negl Trop Dis* (2014) 8(9):e3161. doi:10.1371/journal.pntd.0003161
- Silverman JM, Clos J, Horakova E, Wang AY, Wiesgigl M, Kelly I, et al. *Leishmania* exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocytes and dendritic cells. *J Immunol* (2010) 185(9):5011–22. doi:10.4049/jimmunol.1000541
- Szempruch AJ, Sykes SE, Kieft R, Dennison L, Becker AC, Gartrell A, et al. Extracellular vesicles from *Trypanosoma brucei* mediate virulence factor transfer and cause host anemia. *Cell* (2016) 164(1–2):246–57. doi:10.1016/j.cell.2015.11.051
- Goncalves MF, Umezawa ES, Katzin AM, de Souza W, Alves MJ, Zingales B, et al. *Trypanosoma cruzi*: shedding of surface antigens as membrane vesicles. *Exp Parasitol* (1991) 72(1):43–53. doi:10.1016/0014-4894(91)90119-H
- Trocoli Torrecilhas AC, Tonelli RR, Pavanelli WR, da Silva JS, Schumacher RI, de Souza W, et al. *Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. *Microbes Infect* (2009) 11(1):29–39. doi:10.1016/j.micinf.2008.10.003
- Clemente TM, Cortez C, Novaes Ada S, Yoshida N. Surface molecules released by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms downregulate host cell invasion.

- PLoS Negl Trop Dis* (2016) 10(8):e0004883. doi:10.1371/journal.pntd.0004883
28. Garcia-Silva MR, das Neves RF, Cabrera-Cabrera F, Sanguinetti J, Medeiros LC, Robello C, et al. Extracellular vesicles shed by *Trypanosoma cruzi* are linked to small RNA pathways, life cycle regulation, and susceptibility to infection of mammalian cells. *Parasitol Res* (2014) 113(1):285–304. doi:10.1007/s00436-013-3655-1
  29. Fernandez-Calero T, Garcia-Silva R, Pena A, Robello C, Persson H, Rovira C, et al. Profiling of small RNA cargo of extracellular vesicles shed by *Trypanosoma cruzi* reveals a specific extracellular signature. *Mol Biochem Parasitol* (2015) 199(1–2):19–28. doi:10.1016/j.molbiopara.2015.03.003
  30. Bayer-Santos E, Lima FM, Ruiz JC, Almeida IC, da Silveira JF. Characterization of the small RNA content of *Trypanosoma cruzi* extracellular vesicles. *Mol Biochem Parasitol* (2014) 193(2):71–4. doi:10.1016/j.molbiopara.2014.02.004
  31. Garcia-Silva MR, Cabrera-Cabrera F, das Neves RF, Souto-Pradón T, de Souza W, Cayota A. Gene expression changes induced by *Trypanosoma cruzi* shed microvesicles in mammalian host cells: relevance of tRNA-derived halves. *Biomed Res Int* (2014) 2014:305239. doi:10.1155/2014/305239
  32. Ramirez MI, Deolindo P, de Messias-Reason IJ, Arigi EA, Choi H, Almeida IC, et al. Dynamic flux of microvesicles modulate parasite-host cell interaction of *Trypanosoma cruzi* in eukaryotic cells. *Cell Microbiol* (2017) 19(4):e12672. doi:10.1111/cmi.12672
  33. Cestari I, Ansa-Addo E, Deolindo P, Inal JM, Ramirez MI. *Trypanosoma cruzi* immune evasion mediated by host cell-derived microvesicles. *J Immunol* (2012) 188(4):1942–52. doi:10.4049/jimmunol.1102053
  34. Wyllie MP, Ramirez MI. Microvesicles released during the interaction between *Trypanosoma cruzi* TcI and TcII strains and host blood cells inhibit complement system and increase the infectivity of metacyclic forms of host cells in a strain-independent process. *Pathog Dis* (2017) 75(7):1–12. doi:10.1093/femspd/ftx077
  35. Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (2009) 104(7):1051–4. doi:10.1590/S0074-02762009000700021
  36. Zeringer E, Li M, Barta T, Schageman J, Pedersen KW, Neurauter A, et al. Methods for the extraction and RNA profiling of exosomes. *World J Methodol* (2013) 3(1):11–8. doi:10.5662/wjm.v3.i1.11
  37. Brenner Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* (1962) 4:389–96.
  38. Lovo-Martins MI, Malvezi AD, da Silva RV, Zanluqui NG, Tatakahara VLH, Camara NOS, et al. Fish oil supplementation benefits the murine host during the acute phase of a parasitic infection from *Trypanosoma cruzi*. *Nutr Res* (2017) 41:73–85. doi:10.1016/j.nutres.2017.04.007
  39. Vespa GN, Cunha FQ, Silva JS. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect Immun* (1994) 62(11):5177–82.
  40. Munoz-Fernandez MA, Fernandez MA, Fresno M. Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. *Eur J Immunol* (1992) 22(2):301–7. doi:10.1002/eji.1830220203
  41. Silva JS, Vespa GN, Cardoso MA, Aliberti JC, Cunha FQ. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infect Immun* (1995) 63(12):4862–7.
  42. Roggero E, Perez AR, Tamae-Kakazu M, Piazzon I, Nepomnaschy I, Besedovsky HO, et al. Endogenous glucocorticoids cause thymus atrophy but are protective during acute *Trypanosoma cruzi* infection. *J Endocrinol* (2006) 190(2):495–503. doi:10.1677/joe.1.06642
  43. Navarro-Gonzalez JA, Garcia-Benayas C, Arenas J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin Chem* (1998) 44(3):679–81.
  44. Panis C, Mazzucco TL, Costa CZ, Victorino VJ, Tatakahara VL, Yamauchi LM, et al. *Trypanosoma cruzi*: effect of the absence of 5-lipoxygenase (5-LO)-derived leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice. *Exp Parasitol* (2011) 127(1):58–65. doi:10.1016/j.exppara.2010.06.030
  45. Marim FM, Silveira TN, Lima DS Jr, Zamboni DS. A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. *PLoS One* (2010) 5(12):e15263. doi:10.1371/journal.pone.0015263
  46. Englen MD, Valdez YE, Lehnert NM, Lehnert BE. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor is expressed and secreted in cultures of murine L929 cells. *J Immunol Methods* (1995) 184(2):281–3. doi:10.1016/0022-1759(95)00136-X
  47. Yoshida N, Mortara RA, Araguth MF, Gonzalez JC, Russo M. Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* (1989) 57(6):1663–7.
  48. Barrias ES, Reignault LC, De Souza W, Carvalho TM. Dynasore, a dynamin inhibitor, inhibits *Trypanosoma cruzi* entry into peritoneal macrophages. *PLoS One* (2010) 5(1):e7764. doi:10.1371/journal.pone.0007764
  49. Aliberti JC, Machado FS, Souto JT, Campanelli AP, Teixeira MM, Gazzinelli RT, et al. beta-Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbistatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* (1999) 67(9):4819–26.
  50. Melo RC, D'Avila H, Bozza PT, Weller PF. Imaging lipid bodies within leukocytes with different light microscopy techniques. *Methods Mol Biol* (2011) 689:149–61. doi:10.1007/978-1-60761-950-5\_9
  51. Nogueira PM, Ribeiro K, Silveira AC, Campos JH, Martins-Filho OA, Bela SR, et al. Vesicles from different *Trypanosoma cruzi* strains trigger differential innate and chronic immune responses. *J Extracell Vesicles* (2015) 4:28734. doi:10.3402/jev.v4.28734
  52. Machado FS, Dutra WO, Esper L, Gollob KJ, Teixeira MM, Factor SM, et al. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Semin Immunopathol* (2012) 34(6):753–70. doi:10.1007/s00281-012-0351-7
  53. Coakley G, Maizels RM, Buck AH. Exosomes and other extracellular vesicles: the new communicators in parasite infections. *Trends Parasitol* (2015) 31(10):477–89. doi:10.1016/j.pt.2015.06.009
  54. Schorey JS, Cheng Y, Singh PP, Smith VL. Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. *EMBO Rep* (2015) 16(1):24–43. doi:10.15252/embr.201439363
  55. Neves RF, Fernandes AC, Meyer-Fernandes JR, Souto-Pradon T. *Trypanosoma cruzi*-secreted vesicles have acid and alkaline phosphatase activities capable of increasing parasite adhesion and infection. *Parasitol Res* (2014) 113(8):2961–72. doi:10.1007/s00436-014-3958-x
  56. Silverman JM, Clos J, deOliveira CC, Shrivani O, Fang Y, Wang C, et al. An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. *J Cell Sci* (2010) 123(Pt 6):842–52. doi:10.1242/jcs.056465
  57. Bafica A, Santiago HC, Goldszmid R, Ropert C, Gazzinelli RT, Sher A. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* (2006) 177(6):3515–9. doi:10.4049/jimmunol.177.6.3515
  58. Dutra WO, Menezes CA, Magalhaes LM, Gollob KJ. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite Immunol* (2014) 36(8):377–87. doi:10.1111/pim.12107
  59. Camargo MM, Andrade AC, Almeida IC, Travassos LR, Gazzinelli RT. Glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* but not from *Leishmania* species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN-gamma-primed macrophages. *J Immunol* (1997) 159(12):6131–9.
  60. Gutierrez FR, Mineo TW, Pavanelli WR, Guedes PM, Silva JS. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (2009) 104(Suppl 1):236–45. doi:10.1590/S0074-02762009000900030
  61. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* (1991) 288(2):481–7. doi:10.1016/0003-9861(91)90224-7
  62. Denicola A, Rubbo H, Rodriguez D, Radi R. Peroxynitrite-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. *Arch Biochem Biophys* (1993) 304(1):279–86. doi:10.1006/abbi.1993.1350
  63. Cunha-Neto E, Nogueira LG, Teixeira PC, Ramasawmy R, Drigo SA, Goldberg AC, et al. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (2009) 104(Suppl 1):252–8. doi:10.1590/S0074-02762009000900032

64. Reed SG, Brownell CE, Russo DM, Silva JS, Grabstein KH, Morrissey PJ. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* (1994) 153(7):3135–40.
65. Kim GD, Lee SE, Yang H, Park HR, Son GW, Park CS, et al. beta2 integrins (CD11/18) are essential for the chemosensory adhesion and migration of polymorphonuclear leukocytes on bacterial cellulose. *J Biomed Mater Res A* (2015) 103(5):1809–17. doi:10.1002/jbm.a.35316
66. St-Pierre J, Ostergaard HL. A role for the protein tyrosine phosphatase CD45 in macrophage adhesion through the regulation of paxillin degradation. *PLoS One* (2013) 8(7):e71531. doi:10.1371/journal.pone.0071531
67. Reuter A, Panozza SE, Macri C, Dumont C, Li J, Liu H, et al. Criteria for dendritic cell receptor selection for efficient antibody-targeted vaccination. *J Immunol* (2015) 194(6):2696–705. doi:10.4049/jimmunol.1402535
68. van Kasteren SI, Overkleef H, Ovaa H, Neeftjes J. Chemical biology of antigen presentation by MHC molecules. *Curr Opin Immunol* (2014) 26:21–31. doi:10.1016/j.coi.2013.10.005
69. Sansom DM, Manzotti CN, Zheng Y. What's the difference between CD80 and CD86? *Trends Immunol* (2003) 24(6):314–9. doi:10.1016/S1471-4906(03)00111-X
70. van den Berg TK, Kraal G. A function for the macrophage F4/80 molecule in tolerance induction. *Trends Immunol* (2005) 26(10):506–9. doi:10.1016/j.it.2005.07.008
71. Melo RC, D'Avila H, Fabrino DL, Almeida PE, Bozza PT. Macrophage lipid body induction by Chagas disease in vivo: putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection. *Tissue Cell* (2003) 35(1):59–67. doi:10.1016/S0040-8166(02)00105-2
72. D'Avila H, Freire-de-Lima CG, Roque NR, Teixeira L, Barja-Fidalgo C, Silva AR, et al. Host cell lipid bodies triggered by *Trypanosoma cruzi* infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with prostaglandin E(2) generation and increased parasite growth. *J Infect Dis* (2011) 204(6):951–61. doi:10.1093/infdis/jir432
73. Pinge-Filho P, Tadokoro CE, Abrahamsohn IA. Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Cell Immunol* (1999) 193(1):90–8. doi:10.1006/cimm.1999.1463
74. Borges MM, Kloetzel JK, Andrade HF Jr, Tadokoro CE, Pinge-Filho P, Abrahamsohn I. Prostaglandin and nitric oxide regulate TNF-alpha production during *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunol Lett* (1998) 63(1):1–8. doi:10.1016/S0165-2478(98)00034-0
75. Ashton AW, Mukherjee S, Nagajyothi FN, Huang H, Braunstein VL, Desruisseaux MS, et al. Thromboxane A2 is a key regulator of pathogenesis during *Trypanosoma cruzi* infection. *J Exp Med* (2007) 204(4):929–40. doi:10.1084/jem.20062432
76. Rangel Moreno J, Estrada Garcia I, De La Luz Garcia Hernandez M, Aguilar Leon D, Marquez R, Hernandez Pando R. The role of prostaglandin E2 in the immunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* (2002) 106(2):257–66. doi:10.1046/j.1365-2567.2002.01403.x
77. Alvarez Y, Valera I, Municio C, Hugo E, Padron F, Blanco L, et al. Eicosanoids in the innate immune response: TLR and non-TLR routes. *Mediators Inflamm* (2010) 2010:1–14. doi:10.1155/2010/201929
78. Michelin MA, Silva JS, Cunha FQ. Inducible cyclooxygenase released prostaglandin mediates immunosuppression in acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp Parasitol* (2005) 111(2):71–9. doi:10.1016/j.exppara.2005.05.001
79. Freire-de-Lima CG, Nascimento DO, Soares MB, Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC, de Mello FG, et al. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature* (2000) 403(6766):199–203. doi:10.1038/35003208
80. Malvezi AD, da Silva RV, Panis C, Yamauchi LM, Lovo-Martins MI, Zanluqui NG, et al. Aspirin modulates innate inflammatory response and inhibits the entry of *Trypanosoma cruzi* in mouse peritoneal macrophages. *Mediators Inflamm* (2014) 2014:580919. doi:10.1155/2014/580919
81. Moraes KC, Diniz LF, Bahia MT. Role of cyclooxygenase-2 in *Trypanosoma cruzi* survival in the early stages of parasite host-cell interaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (2015) 110(2):181–91. doi:10.1590/0074-02760140311

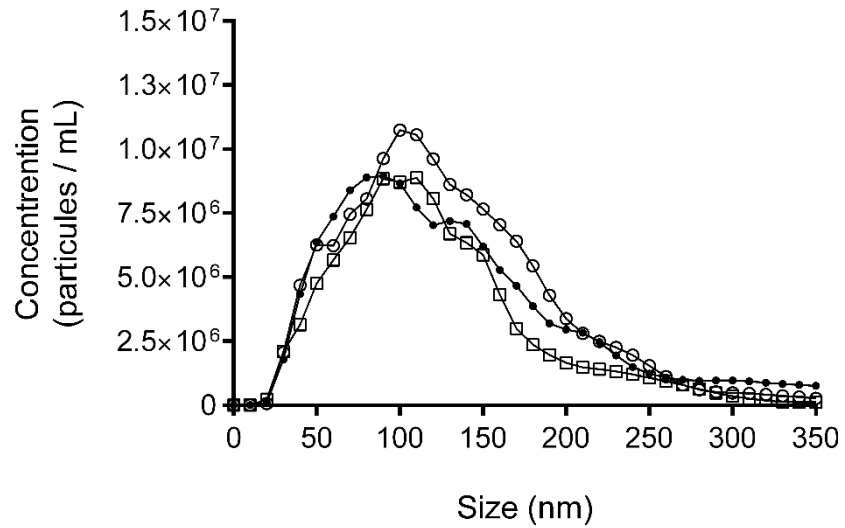
**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

The reviewer HC declared a shared affiliation, though no other collaboration, with several of the authors, ML, PM, SG, PW, to the handling Editor.

Copyright © 2018 Lovo-Martins, Malvezi, Zanluqui, Lucchetti, Tatakihara, Mörking, Oliveira, Goldenberg, Wovk and Pinge-Filho. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## Figura suplementar 1

**Supplementary Figure 1. Nanoparticle tracking analysis of the extracellular vesicles isolated from *T. cruzi* Y.** Concentration (particles/mL) and size distribution (nm) for extracellular vesicles spontaneously shed by tissue culture-derived trypomastigote forms of *T. cruzi* Y (EVs Y) measured in a NanoSight LM10 instrument (Malvern Instruments Ltd). The data are representative of 3 independent experiments.



## 4.2 CONCLUSÃO DO CAPÍTULO I

A comunicação entre o *T. cruzi* e as células do hospedeiro via vesículas extracelulares têm sido objeto de vários estudos atualmente, cujos resultados apontam para mecanismos que favorecem a persistência do parasito no organismo.

Colaborando ainda mais para esse entendimento, mostramos a modulação da resposta imunológica pelas vesículas extracelulares de tripomastigotas de *T. cruzi* Y (EVs Y) em camundongos C57BL/6 durante a fase aguda da infecção. Descrevemos a diminuição do óxido nítrico (NO) no plasma, assim como da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  em animais que tiveram contato com as EVs Y antes da infecção. Mostramos que as células do baço dos animais que recebem EVs Y antes da infecção são menos responsivas ao estímulo com antígeno de *T. cruzi in vitro*, com menor produção de NO e das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6. No peritônio, local da inoculação das EVs Y e também do parasito, as EVs Y modularam o perfil dos macrófagos presentes na cavidade abdominal assim como os níveis de NO produzidos localmente. Considerando que as EVs Y, apesar de terem sido inoculadas no peritônio, modularam até mesmo as células esplênicas, entendemos que o efeito das EVs Y não é apenas local, mas afeta a resposta imunológica de forma sistêmica.

Em ensaios *in vitro* utilizando macrófagos derivados de medula óssea mostramos os efeitos diretos das EVs Y sobre essa importante célula da imunidade inata, que além de atividade tripanocida ainda têm a capacidade de apresentar antígenos para linfócitos, disparando a imunidade adaptativa. Macrófagos que tiveram contato com as EVs Y antes da infecção apresentaram maior internalização de amastigotas. Os ensaios de liberação de tripomastigotas pelos macrófagos mostrou que, além da maior internalização, os parasitos internalizados nos macrófagos tratados com EVs Y foram capazes de continuar seu ciclo de vida, multiplicando, diferenciando novamente em tripomastigotas e rompendo a célula para dar continuidade à infecção.

Esses efeitos observados podem ser explicados, ainda que parcialmente, pelo aumento de corpos lipídicos induzidos pelas EVs Y em macrófagos não infectados, assim como pela produção de PGE<sub>2</sub> por essas células. Apesar do tratamento com as EVs Y ter induzido uma produção menor de PGE<sub>2</sub> pelos macrófagos após a infecção, o perfil inflamatório dessas células já estava reduzido, uma vez que elas apresentaram menor produção de TNF- $\alpha$  e IL-6.



Dessa forma, esses resultados suportam e fornecem novas evidências do papel das EVs liberadas por *T. cruzi* na patogênese da fase aguda da Doença de Chagas, contribuindo com novos conhecimentos para uma melhor compreensão dessa complexa relação parasito-hospedeiro.

## 5 CAPÍTULO II – Efeitos dos ácidos graxos poli-insaturados *n*-3 na patogênese das vesículas extracelulares liberadas por *Trypanosoma cruzi* durante a infecção experimental murina

A relação entre os efeitos protetores do consumo/incorporação dos ácidos graxos poli-insaturados *n*-3 (PUFAs *n*-3) com as ações patogênicas das vesículas extracelulares do *T. cruzi* Y (EVs Y) em modelos de infecção *in vivo* e *in vitro* também foi objeto de investigação desta tese.

Considerando que a ingestão de óleo de peixe rico em PUFAs *n*-3 modula mecanismos envolvidos com a resposta imunológica, o estudo dos efeitos dessa suplementação com a resposta do organismo às doenças infecciosas tem despertado importantes questionamentos. Nosso grupo mostrou recentemente que a suplementação de camundongos C57BL/6 com óleo de peixe rico em PUFAs *n*-3 atenua a fase aguda da infecção por *T. cruzi* (Lovo-Martins et al., 2017). Os animais suplementados com óleo de peixe não desenvolveram trombocitopenia e leucopenia característicos de fase aguda, apresentaram menor parasitismo cardíaco além de maior produção de TNF- $\alpha$  (Anexo II).

Nos resultados adiante mostrados, os animais suplementados com óleo de peixe rico em PUFAs *n*-3 e tratados com EVs Y não apresentaram redução na concentração de NO tanto no plasma quanto em cultura de esplenócitos. Adicionalmente, para melhor entender o papel de cada ácido graxo na modulação dos efeitos das EVs Y, experimentos *in vitro* com macrófagos derivados da medula óssea foram desenvolvidos utilizando o tratamento com ácidos graxos purificados conjugados à soro albumina bovino.

Os resultados a seguir estão apresentados na tese seguindo o formato tradicional de materiais e métodos; resultados e discussão; e conclusão. Posteriormente os resultados serão compilados para publicação em revista científica.

## 5.1 MATERIAIS E MÉTODOS REFERENTES AOS RESULTADOS DO CAPÍTULO II

### 5.1.1 MEIOS DE CULTIVO CELULAR, SOLUÇÕES E REAGENTES

- **Ácidos graxos purificados:** os ácidos graxos ácido araquidônico (AA), ácido Linoleico (LA), ácido oleico (AO), ácido docosahexaenóico (DHA) e ácido eicosapentaenóico (EPA) utilizados para o tratamento dos macrófagos foram adquiridos da Cayman Chemical (MI, EUA). Os ácidos graxos foram preparados conjugados com BSA na concentração de 1000  $\mu$ M no dia da sua utilização.
- **CuSO<sub>4</sub> para ativação dos grânulos de cádmio:** 5 mM de CuSO<sub>4</sub> dissolvidos em tampão glicina-NaOH 45 % (pH do tampão glicina 9,7 ajustado com NaOH).
- **Meio DMEM:** Meio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) em pó, (qsp para 1 L) acrescentado de 2 mM de glutamina, 10 mM de tampão biológico HEPES, 100 UI/mL de penicilina e 100  $\mu$ g/mL estreptomicina e 10% de soro bovino fetal (SBF) inativado, pH 7,2. (todos os reagentes GIBCO, Gran Island, Y).
- **Meio RPMI-1640:** RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) em pó, (qsp para 1 L) acrescentado de 2 mM de glutamina, 10 mM de tampão biológico HEPES, 100 UI/mL de penicilina e 100  $\mu$ g/mL estreptomicina e 5% de soro bovino fetal (SBF) inativado, pH 7,2. (todos os reagentes GIBCO, Gran Island, Y).
- **Óleo de milho:** óleo rico em PUFA's *n*-6, mas pobre em PUFA's *n*-3 (Sigma Chem. Co. C8627).
- **Óleo de peixe:** óleo rico em PUFA's *n*-3 obtido do peixe "menhaden" (Sigma Chem. Co. F8020).
- **Reagente de Griess:** 0,1% N-1 Naftil-etilenediamina e 1% de sulfanilamida em 5% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.
- **Reagentes desproteinizantes para quantificação de NO no plasma:** ZnSO<sub>4</sub> 75 mM; NaOH 55 Mm;  
**Solução para coloração Giemsa:** 4 gotas de Giemsa por mL de tampão para coloração (NewProv produtos para laboratório LTDA).
- **Soro albumina bovino (BSA):** Para o preparo da solução de BSA utilizada para conjugar os ácidos graxos foi utilizado 396 mg de BSA fração V (Sigma, #

A-8806), livre de ácidos graxos e endotoxinas, em 12 mL de DMEM. Essa solução foi misturada gentilmente e permaneceu em banho 37°C por 30 minutos (com agitação a cada 10 minutos), sendo posteriormente filtrada em membrana de nitrocelulose com poros de 0,22 µm. A solução de BSA foi armazenada na geladeira e usada dentro de, no máximo, 1 mês.

- **Tampão de lise de hemácias:** 8,90% NH<sub>4</sub>Cl, 0,34% EDTA, 0,80% NaHCO<sub>3</sub>.
- **Tampão glicina-NaOH para quantificação de NO no plasma:** 15% de glicina, pH 9,7 ajustado com NaOH.
- **Tampão para coloração com Giemsa:** 0,044% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 0,056% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.
- **Tampão salina-fosfato (PBS):** 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

### 5.1.2 APROVAÇÃO DO PROJETO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Todos os procedimentos experimentais desse projeto foram realizados de acordo com as diretrizes do Código Brasileiro para o Uso de Animais de Laboratório. O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA-111/2015 registrado sob o processo número 7045.2015.06) (Anexo I).

A manutenção da cepa Y de *T. cruzi in vivo* através de repiques periódicos em camundongos Swiss está respaldada pela aprovação do Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina, registrado sob o processo número 28.841.2016.41.

### 5.1.3 MANUTENÇÃO DA CEPA Y DE *Trypanosoma cruzi*

A cepa Y do *T. cruzi* foi mantida *in vivo* através de repiques realizados a cada 10 dias com inoculação de 2 x 10<sup>5</sup> formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*, diluídas em PBS, por via intraperitoneal em camundongos Swiss.

Para a manutenção *in vitro* da cepa Y foram utilizadas células Vero-E6 infectadas. As células Vero-E6 utilizadas para a manutenção *in vitro* do *T. cruzi* Y (ATCC CRL-1586; American Type Culture Collection, Rockville, MD) foram cultivadas em meio RPMI-1640 completo, contendo 5% de SBF, mantidas a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> e atmosfera úmida.

Para iniciar o ciclo celular de replicação do *T. cruzi* e consequente liberação de tripomastigotas em cultivo de células *in vitro*, formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* foram obtidas a partir da coleta de sangue de camundongos Swiss e utilizadas para infectar monocamadas de células Vero-E6 em garrafa de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>. Após 8 horas de interação as células foram lavadas com PBS a 37°C para remoção dos parasitos não internalizados. Decorrido cerca de 10 dias após a infecção das células, as formas tripomastigotas presentes em grande quantidade no sobrenadante do cultivo celular e foram utilizados para infecção de novas culturas de células Vero-E6, agora em garrafas de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup> (expansão dos tripomastigotas derivados de cultura de células). Estas formas tripomastigotas derivadas de cultivo celular foram utilizadas para obtenção de vesículas extracelulares do parasito assim como para as infecções de camundongos C57BL/6.

#### 5.1.4 ANIMAIS C57BL/6

Foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6 machos de 8 a 12 semanas de idade provenientes do biotério do Instituto Carlos Chagas, Fiocruz Paraná, e por endocruzamentos realizados na Universidade Estadual de Londrina a partir de matrizes provenientes do CEMIB da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os animais foram mantidos até o término dos experimentos em gaiolas coletivas, comportando até 6 animais cada. A alimentação dos animais foi realizada com dieta comercial (Nuvilab-CR1, Quimtia Nuvital, Colombo, Brasil) e água esterilizada “*ad libitum*”.

#### 5.1.5 OBTENÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE *Trypanosoma cruzi* Y

O sobrenadante de células Vero-E6 contendo tripomastigotas foi recolhido e centrifugado em baixa rotação para remoção das células Vero-E6 eventualmente presentes nesse sobrenadante (1000 x g, 5 minutos, 25°C). Posteriormente, os tripomastigotas presentes no sobrenadante foram lavados 3 vezes com meio RPMI não suplementado (2600 x g, 10 minutos, 25°C) e a concentração foi determinada em câmara de Neubauer. Os parasitos foram ressuspensos na concentração de 1 x 10<sup>8</sup> parasitos por mL de RPMI-1640 sem SBF e incubado por 2 horas a 37°C, período no qual ocorreu a liberação de vesículas extracelulares do parasito no meio de cultivo. Decorrido o período de incubação, essa solução foi centrifugada para remoção dos

parasitos (2600 x g, 10 minutos, 25°C) e o sobrenadante rico em vesículas extracelulares de *T. cruzi* cepa Y foi filtrado em membrana com poros 0,45 µm para remoção de grandes partículas, como corpos apoptóticos, grumos de vesículas ou fragmentos do parasito. Esse protocolo foi delineado com base no trabalho de Trocoli Torrecilhas *et al.* (2009). As vesículas extracelulares de *T. cruzi* Y foram denominadas no presente trabalho como EVs Y (do inglês *Extracellular vesicles T. cruzi* Y).

Para a purificação das EVs Y foi utilizado o Kit comercial de extração *Total Exosome Isolation Form Culture Cell* (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA). Ao volume de sobrenadante rico em EVs Y obtido após a filtração foi adicionado o reagente do Kit, de acordo com as instruções do fabricante. Essa solução foi homogeneizada e armazenada *overnight* a 4°C (cerca de 16 horas), sendo centrifugada em seguida a 10000 x g por 1 hora, 4°C. O sobrenadante foi delicadamente aspirado e descartado. As EVs Y sedimentadas foram ressuspensas em DPBS estéril, mantendo a proporção de 100 µL de DPBS para cada 1 x 10<sup>8</sup> parasitos utilizados inicialmente. O princípio do método se baseia na ligação de moléculas de água na solução, forçando componentes menos solúveis, como as vesículas, para fora da solução, permitindo que elas sedimentem após uma centrifugação com baixa velocidade e curta duração em comparação com a ultracentrifugação necessária sem o uso do reagente. As EVs Y foram mantidas a 4°C até a sua utilização, não sendo armazenadas por mais de 2 meses.

As EVs Y obtidas foram utilizadas em ensaios *in vivo* e *in vitro*. Para o cálculo da concentração das EVs Y utilizadas nos experimentos foi considerado sempre o número inicial de parasitos utilizados para fazer a obtenção das EVs Y e o volume final que essas EVs Y foram ressuspensas. Dessa forma, os tratamentos sempre foram realizados considerando inóculo de EVs Y derivadas de 1x10<sup>6</sup> parasitos para os ensaios *in vivo* e EVs Y derivadas de 1x10<sup>7</sup> parasitos para os ensaios *in vitro*.

#### 5.1.6 ANÁLISE DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DE *Trypanosoma cruzi* Y POR NANOPARTICLE TRACKING ANALYSIS (MONITORAMENTO DE MOVIMENTO)

As suspensões contendo EVs Y foram analisadas quanto ao tamanho e concentração através do equipamento *Nano Sight LM10* (NanoSight Ltd., Amesbury, United Kingdom). As amostras foram diluídas em PBS e aplicadas em um sistema de injeção automática a 25°C e velocidade de infusão 50.

O sistema do equipamento *Nano Sight* consiste num laser de 532 nm que emite um feixe finamente focado na amostra (uma suspensão de partículas diluídas) através de um prisma de vidro. O feixe refrata em um ângulo baixo ao entrar na amostra, resultando em um fino feixe de luz que ilumina as partículas da amostra, que por sua vez são visualizadas por um microscópio óptico de luz convencional acoplado a uma câmera de vídeo que capta a dispersão de luz de todas as partículas no campo de visão. Vídeos de 60 segundos são feitos, com 30 quadros por segundo, e o movimento das partículas é analisado pelo *NTA software* (Nanosight Ltd.). O *NTA software* identifica e acompanha cada partícula em cada quadro adquirido no vídeo, e o movimento browniano é acompanhado e mensurado. A velocidade do movimento das partículas é usado para calcular o tamanho da partícula através da equação de duas dimensões de Stokes-Einstein (Dragovic *et al.*, 2011).

#### 5.1.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL *in vivo*

O protocolo adotado para avaliar os efeitos da inoculação de EVs Y na infecção *in vivo* foi delineado com base no trabalho de Trocoli Torrecilhas *et al.* (2009), com a diferença que optamos por avaliar esses efeitos em animais C57BL/6, um modelo de resistência a essa cepa de *T. cruzi*.

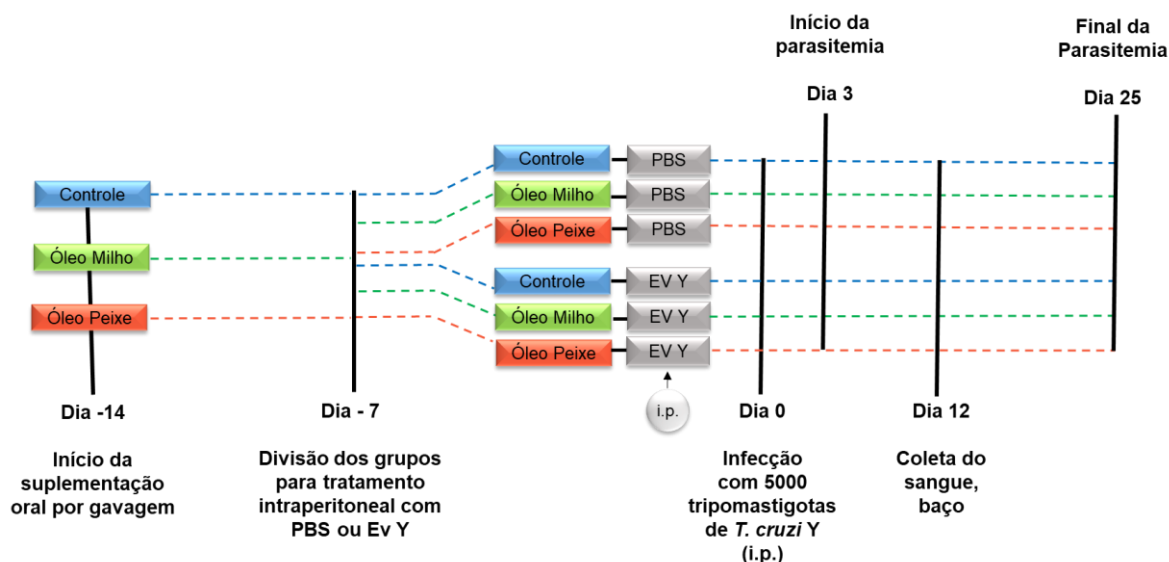
Para avaliar a relação dos efeitos das EVs Y na infecção por *T. cruzi* com a suplementação oral *in vivo* com óleos ricos em diferentes ácidos graxos utilizamos óleo de peixe, rico em PUFAs *n-3*, e óleo de milho, rico em PUFAs *n-6*, mas pobre em PUFAs *n-3*.

Iniciando 14 dias antes da infecção por *T. cruzi*, camundongos C57BL/6 foram suplementados diariamente e no mesmo horário por gavagem com óleo de milho ou óleo de peixe. Todos os tratamentos foram administrados na dose de 0,6% volume/massa (mL por 100g de massa corporal). Durante todo o período os camundongos tiveram ração e água "*ad libitum*".

Após 7 dias do início da suplementação oral os animais receberam por via intraperitoneal EVs Y referentes à  $1 \times 10^6$  tripomastigotas (ou apenas PBS como controle). Decorridos 7 dias do inóculo de EVs Y, 14 dias após do início da suplementação por via oral com óleo de peixe ou óleo de milho, os animais foram infectados com  $5 \times 10^3$  *T. cruzi* Y obtidos do sobrenadante de cultura de células Vero-E6. Durante a infecção foi avaliada a parasitemia e sobrevivência (até o 25º dia após a infecção) ou os animais foram anestesiados (100 mg/kg de Ketamina e 10 mg/kg

Xilasina) e sacrificados no 12<sup>o</sup> dia após a infecção para a coleta de sangue por punção cardíaca e remoção do baço. O plasma foi aliquoteado e armazenado a -80°C para posterior quantificação de NO. A suplementação foi mantida diariamente até a eutanásia dos animais (Figura 5.1).

**Figura 5.1: Desenho experimental da associação de suplementação oral com óleo de milho ou óleo de peixe e inoculação de vesículas extracelulares de *Trypanosoma cruzi* Y na infecção por *T. cruzi* in vivo.** A suplementação oral por gavagem com óleo de milho e óleo de peixe iniciou-se 14 dias antes da infecção e seguiu diariamente até o final do experimento (grupos controle não receberam suplementação por via oral). Após 7 dias, o grupo controle e cada grupo de animais suplementados foram divididos em dois: um recebeu o inóculo de vesículas extracelulares de *T. cruzi* Y (EVs Y) por via intraperitoneal e o outro recebeu PBS também pela via intraperitoneal. Decorridos 7 dias da inoculação das EVs Y os animais foram infectados com 5000 tripomastigotas de *T. cruzi* Y. A quantificação dos parasitemia iniciou-se no terceiro dia após a infecção, e foi realizada em dias alternados, até que não fossem mais encontrados parasitos no sangue. Em outros grupos experimentais foi feita a anestesia e eutanásia no 12<sup>o</sup> dia após a infecção para a coleta de sangue e baço.



Para as infecções dos camundongos C57BL/6 foram utilizados *T. cruzi* Y obtidos da primeira passagem em células Vero-E6 infectadas com parasitos do sangue de camundongos Swiss, amenizando dessa forma a perda de virulência da cepa causada por várias passagens em cultura de células. Sobrenadante das células Vero-E6 contendo tripomastigotas foram recolhidos e centrifugados a 1000 g por 5 minutos para remoção de células. A solução contendo os tripomastigotas passou por duas etapas de lavagens com 30 mL de PBS (centrifugações a 2600 g por 20 minutos, temperatura ambiente). Após a última lavagem os tripomastigotas foram ressuspensos em PBS e a concentração determinada utilizando câmara de Neubauer. Os animais foram infectados por via intraperitoneal com  $5 \times 10^3$  tripomastigotas de *T. cruzi* Cepa Y.



#### 5.1.8 PARASITEMIA

A parasitemia sanguínea foi determinada de acordo com Brener (1962). A técnica consiste na observação direta de 50 campos em microscópio óptico no aumento de 400x (modelo Olympus CH30LF100 – Olympus Optical CO., LTD) em 5 µL de sangue heparinizado colhido da veia da cauda do camundongo em dias alternados, a partir do terceiro dia após a infecção por *T. cruzi*. Os resultados foram expressos como o número de parasitos/mL de sangue (Araújo-Jorge, 2000).

#### 5.1.9 PREPARO DO ANTÍGENO DE *Trypanosoma cruzi* (TcAg)

Tripomastigotas obtidas do sobrenadante de células Vero-E6 foram recolhidas e centrifugadas em baixa rotação (1000 x g, 5 minutos, 25°C) para remoção de eventuais células Vero-E6 presentes nesse sobrenadante. Em seguida os tripomastigotas foram centrifugados em alta rotação (2600 x g, 10 minutos, 25°C) e ressuspensos em volume pequeno (mantendo sempre a concentração entre 10<sup>8</sup> - 10<sup>9</sup> por mL). Os tripomastigotas foram então submetidos a 10 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido seguido de descongelamento em banho 37°C. Alíquotas de TcAg foram armazenadas em -20°C até a sua utilização. A quantidade de TcAg utilizada para estimular células *in vitro* seguiu a proporção de 1:1 (1 parasito da solução inicial utilizada para preparar o TcAg para cada célula em cultura) (Curotto De Lafaille *et al.*, 1990).

#### 5.1.10 OBTENÇÃO E CULTIVO DE CÉLULAS DO BAÇO

No 12º dia após a infecção os camundongos dos diferentes grupos experimentais foram anestesiados (100 mg/kg de Ketamina e 10 mg/kg Xilasina) e sacrificados. O baço de cada animal foi imediatamente removido, colocado em 10 mL de RPMI-1640 sem SBF e macerado para liberação das células do órgão no meio de cultura. A suspensão contendo as células foi centrifugada (1000 x g, 5 minutos, 4°C) e as hemácias foram lisadas com 1mL de tampão de lise por baço durante 5 minutos, no gelo. A lise foi interrompida acrescentando 10 mL de RPMI-1640 sem SBF. As células foram novamente centrifugadas (1000 x g, 5 minutos, 4°C) e ressuspensas em RPMI-1640 com 5% de SBF. Uma alíquota de cada amostra foi diluída em azul de

tripan 0,1% e a concentração celular das células viáveis foi determinada em câmara de Neubauer.

As células foram semeadas em placas de 48 poços na densidade de  $5 \times 10^6$  células por poço em 500  $\mu\text{L}$  de RPMI-1640 contendo 5% de SBF. As células receberam estímulos *in vitro* com TcAg na proporção de 1 parasito para cada esplenócito em cultivo (1:1) e foram mantidas em estufa de  $\text{CO}_2$ ,  $37^\circ\text{C}$ , atmosfera úmida. Por ser uma cultura com células mistas, podendo ser aderentes como macrófagos e não aderentes como linfócitos e células dendríticas, após 48 horas as placas de cultivo de esplenócitos foram centrifugadas ( $1100 \times g$ , 5 minutos,  $4^\circ\text{C}$ ) e o sobrenadante foi aliquotado e armazenado para posterior quantificação de NO.

#### 5.1.11 QUANTIFICAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO NO PLASMA E SOBRENADANTE DE CULTURA DE CÉLULAS

O óxido nítrico (NO) é uma molécula muito instável que rapidamente se quebra dando origem aos compostos estáveis nitrato e nitrito. Portanto, a concentração de NO nas amostras de plasma e sobrenadante de cultura de células pode ser estimada pelos níveis de nitrito (Navarro-Gonzalvez *et al.*, 1998).

Para a quantificação do nitrito no plasma foi utilizado o método de descrito por Navarro-Gonzalvez *et al.* (1998) e adaptado por Panis *et al.* (2011) para utilização em amostras biológicas de camundongos. Para aumentar a sensibilidade da técnica, o tratamento de amostras biológicas com cádmio foi utilizado para converter todo o nitrato presente na amostra em nitrito, e assim promover melhor acurácia do método original de detecção de nitrito como estimativa da produção total de NO.

Inicialmente foi realizada desproteinização de 60  $\mu\text{L}$  de cada amostra de plasma pela adição de 50  $\mu\text{L}$  de 75 mM  $\text{ZnSO}_4$  (agitados 30 segundos no vórtex e centrifugado a  $6500 \times g$  por 2 minutos) seguido da adição de 70  $\mu\text{L}$  de 55 mM NaOH (agitados 30 segundos no vórtex e centrifugado a  $6500 \times g$  por 5 minutos), em temperatura ambiente. O sobrenadante foi recuperado e as proteínas sedimentadas foram descartadas. Um volume de 150  $\mu\text{L}$  por amostra foi diluído em 50  $\mu\text{L}$  de tampão glicina 45% para estabilizar o pH da reação. Em seguida grânulos de cádmio (Fluka, Poland) estocados em solução de 100 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$  foram lavados com água destilada e colocados em contato com  $\text{CuSO}_4$  5 mM por 5 minutos para ativação do cádmio. Posteriormente, 400 mg de grânulos de cádmio foram colocados em cada amostra, que permaneceu em agitação por 10 minutos.

Decorrido esse tempo, realizou-se a quantificação do nitrito pelo método de Griess convencional: 50 µL de cada amostra foi colocado em duplicata em poços de uma placa de 96 poços para microtitulação e o reagente de Griess foi adicionado em igual volume. A quantificação do nitrito presente nas amostras de sobrenadante de cultura de esplenócitos e macrófagos foi realizada diretamente pelo método de Griess convencional, que consiste na adição de 50 µL do reagente de Griess à 50 µL de sobrenadante de cultura.

Uma curva padrão em diluição seriada foi realizada a partir de uma solução de NaNO<sub>3</sub> 250 µM para verificar a linearidade da reação e calcular um fator de conversão de valores de absorbância em concentração (equação da reta). A absorbância dos testes foi quantificada em 548 nm em espectrofotômetro para microplacas Synergy Microplate Reader com análise por *software* BioTek Gen5 Data Analysis Software (BioTek instruments, Winooski, Vermont, EUA).

#### 5.1.12 SOBRENADANTE DE CÉLULAS L929

As células L929 (ATCC CCL-1: NCTC clone 929) secretam no seu sobrenadante o fator estimulador de colônia macrófago M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*), o que permite a utilização desse sobrenadante condicionado como estímulo para diferenciação das células da medula óssea em macrófagos (Englen *et al.*, 1995).

Células L929 foram semeadas em garrafas de cultivo celular de 175 cm<sup>2</sup> na densidade de 35 x 10<sup>6</sup> em 116 mL de meio de cultura DMEM contendo 10% de SBF. Após 14 dias em cultivo em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>, 37°C e atmosfera úmida, sem troca de meio durante o período, o sobrenadante foi recolhido, centrifugado (1000 x g, 5 minutos, 4°C) e filtrado em membrana de nitrocelulose com poros de 0,22 µm para remoção de debris celulares. O sobrenadante foi aliquoteado e congelado a -80°C até o momento do uso.

#### 5.1.13 OBTENÇÃO DE CÉLULAS DA MEDULA E DIFERENCIAÇÃO PARA MACRÓFAGOS

Macrófagos foram obtidos a partir da diferenciação de células da medula óssea do fêmur e tíbia de camundongos C57BL/6 de 6 a 12 semanas de acordo com a metodologia descrita por Marim *et al.* (2010). Após a anestesia (100 mg/kg de Ketamina e 10 mg/kg Xilasina) e eutanásia do animal por deslocamento cervical o

camundongo foi banhado com álcool 70% e os ossos das patas traseiras foram retirados utilizando tesoura e pinça. Em seguida os tecidos (como músculos e nervos) foram removidos utilizando uma pinça e bisturi, assim como a fíbula, e os ossos (fêmur e tíbia) foram colocados em 5 mL de DMEM sem SBF. Os ossos foram então mergulhados em álcool 70% por 1 minuto e lavados em DMEM sem SBF. Em seguida as epífises dos ossos foram cortadas com um bisturi e uma seringa com agulha contendo DMEM foi introduzida numa das extremidades do osso. A pressão exercida pelo fluxo de meio de cultura dentro do osso removeu as células em um tubo posicionado abaixo do osso. As células foram gentilmente agitadas com o auxílio de uma micropipeta de 1000 µL para desmanchar os grumos celulares. A lise de hemácias foi realizada na sequência com adição de 1mL de tampão de lise durante 5 minutos, no gelo. A lise foi interrompida acrescentando 10 mL de DMEM sem SBF. As células foram centrifugadas (1000 x g, 5 minutos, 4°C) e ressuspensas em DMEM com 5% de SBF.

As células obtidas da medula óssea de um camundongo foram cultivadas em 3 placas de 6 poços em meio DMEM suplementado com 10% de SBF inativado (6 mL/poço) contendo também 30% de sobrenadante de células L-929 (sobrenadante rico em fator estimulador de colônia de macrófagos M-CSF) e mais 16% de SBF. Após cinco dias foi adicionado mais 3 mL de DMEM contendo 10% SBF por poço e 30% de sobrenadante de células L-929. Decorridos 7 dias do início do cultivo celular as células estavam diferenciadas em macrófagos. A desaderência dos macrófagos foi realizada com tripsina 0,25% (Gibco, Thermo Fisher Scientific, MD, USA) diluída 10 x, sendo as células imediatamente lavadas com DMEM 10% (1000 x g, 5 minutos, 4°C). Uma alíquota das células foi dissolvida em azul de tripan e as células viáveis foram quantificadas em câmara de Neubauer para montagem das placas experimentais.

#### 5.1.14 IMUNOFENOTIPAGEM DE MACRÓFAGOS

Logo após a obtenção dos macrófagos a partir da diferenciação de células da medula óssea de camundongos C57BL/6 a confirmação fenotípica dessas células foi realizada por citometria de fluxo, sendo utilizado para isso  $5 \times 10^5$  células por marcação.

Foram utilizados anticorpos anti-CD11b (FITC), anti-F4/80 (PE), anti-CD45 (PE), anti-CD86 (PECy5), anti-MHC classe I (PE) e anti-MHC classe II (PECy5), isotópicos FITC, PE e PECy5 (todos eBioscience, CA, USA), além do anti-CD206 (PE)

(BioLegend, Inc. CA, USA) (1:50). As células foram incubadas com tampão de bloqueio para citometria por 30 minutos, após esse período as células foram centrifugadas e os anticorpos foram adicionados seguindo os seguintes grupos de marcação: marcação A (anti-CD11b, anti-F4/80), marcação B (anti-CD11b, anti-CD206, anti-CD86) e marcação C (anti-CD11b, anti-MHC-I, anti-MHC-II) por 30 minutos em tampão de bloqueio.

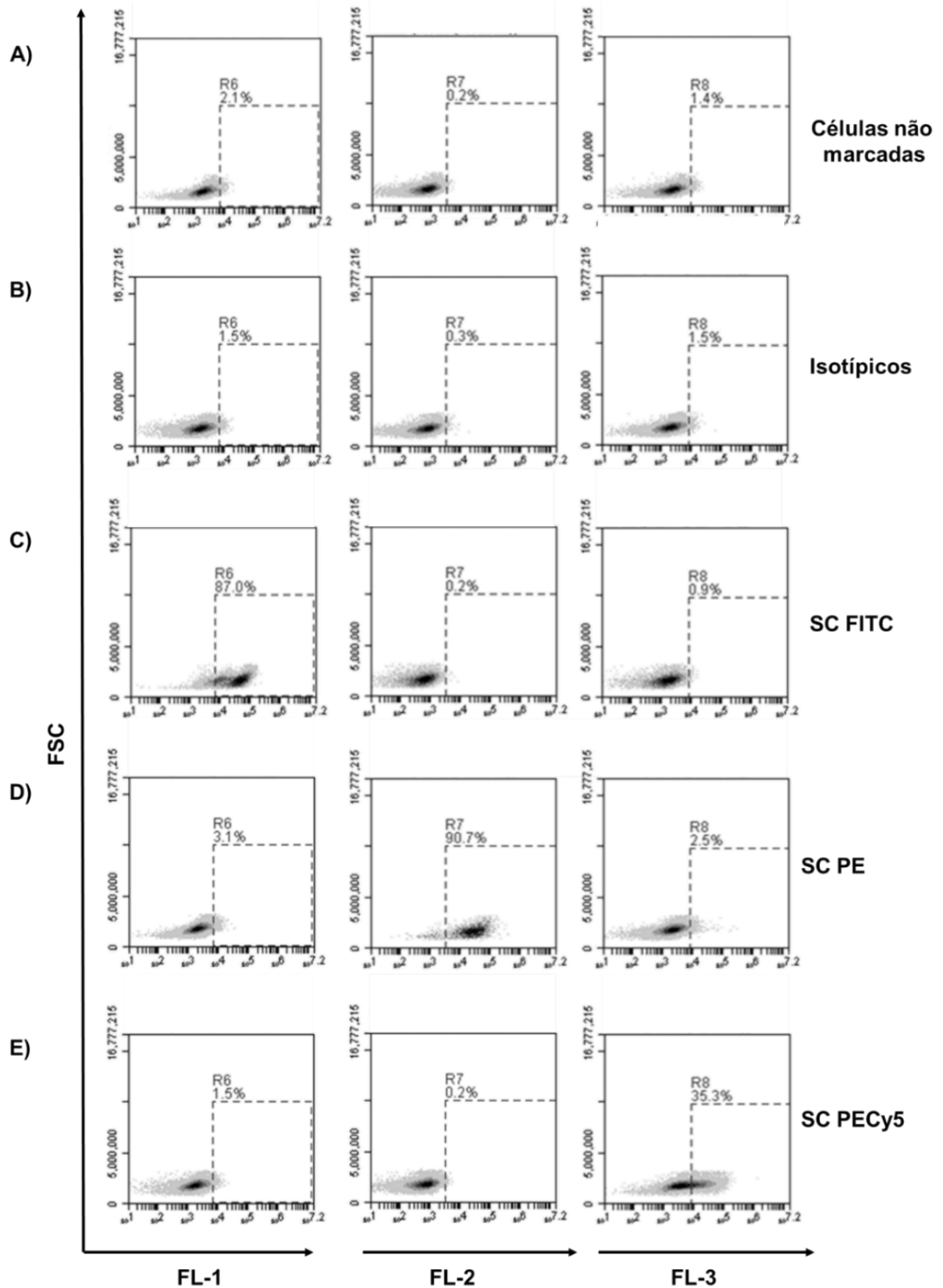
Adicionalmente, foi realizado o delineamento do *gate* nas células não marcadas (figura 5.2 A), seguido da marcação para ligação inespecífica com anticorpos isotípicos (figura 5.2 B), e grupos de positividade única para cada fluoróforo, *single color* (SC) apenas para FITC (figura 5.2 C), apenas para PE (figura 5.2 D), ou apenas PE-Cy5 (figura 5.2 E) que foram utilizados para a compensação do equipamento. Decorrido o período de incubação, as células foram lavadas com PBS, ressuspensas também em PBS e foi realizada a leitura de 30 mil eventos em citômetro de fluxo. A análise foi realizada com o Software C6 BD Accuri.

#### 5.1.15 TRATAMENTO *in vitro* DOS MACRÓFAGOS COM ÁCIDOS GRAXOS E VESÍCULAS EXTRACELULARES DE *Trypanosoma cruzi* Y

Para o estudo dos efeitos *in vitro* das EVs Y em macrófagos, células recém diferenciadas e já aderidas nos poços foram expostas a EVs Y (provenientes de  $1 \times 10^7$  tripomastigotas) durante 24 h. Em seguida as células foram lavadas com PBS 37°C para remoção das EVs Y e imediatamente infectadas com *T. cruzi* Y durante 14 horas.

Para relacionar os efeitos das EVs Y em células expostas a 50 µM de diferentes ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) ou mono-insaturado (MUFA), macrófagos aderidos foram expostos aos PUFAs *n*-6 ácido araquidônico (AA) e ácido Linoleico (LA); ao MUFA *n*-9 ácido oleico (OA) e aos PUFAs *n*-3 ácido docosahexaenóico (DHA) e eicosapentaenóico (EPA) por 24 h ou ao veículo BSA (soro albumina bovino). Decorrido esse período as células foram lavadas com PBS 37°C para remoção dos ácidos graxos e adicionou-se EVs Y (provenientes de  $1 \times 10^7$  tripomastigotas) por mais 24 h. Após essa incubação, as células foram lavadas com PBS 37°C para remoção das EVs Y e imediatamente infectadas com *T. cruzi* Y obtidos do sobrenadante de cultura de células Vero E-6.

**Figura 5.2: Controles de marcação para a imunofenotipagem de macrófagos.** Macrófagos obtidos a partir da medula óssea de camundongos C57BL/6 foram marcados para determinação de *gate* e compensação do equipamento. (A) Marcação de *gate* em células não marcadas; (B) controles utilizando anticorpos isotípicos FITC, PE e PE-Cy5 de marcação inespecífica; controles positivos para marcação (*single color* - SC) de (C) FITC-FL-1, (D) PE-FL-2, ou (E) PE-Cy5-FL-3. Em seguida, foi realizada a leitura de 30 mil eventos em citômetro de fluxo e análise utilizando o Software C6 BD Accuri.



Todos os ácidos graxos utilizados para o tratamento dos macrófagos foram conjugados com BSA fração V, livre de ácidos graxos e endotoxinas. Os ácidos graxos foram preparados conjugados com BSA na concentração de 1000 µM no dia da sua utilização. A partir dessa solução foram realizadas diluições diretamente nos poços para atingir a concentração de 50 µM utilizada nos experimentos. O uso do BSA como veículo de ácidos graxos permite introduzir esses ácidos graxos num contexto mais próximo do fisiológico, onde podem estar complexados com albumina (Fritsche, 2007).

#### 5.1.16 ENSAIO DE INTERNALIZAÇÃO DE *Trypanosoma cruzi* EM MACRÓFAGOS

O ensaio de invasão de *T. cruzi* em macrófagos foi delineado a partir da metodologia descrita por Yoshida *et al.* (1989). Macrófagos obtidos a partir da diferenciação de células da medula óssea de camundongos C57BL/6 foram semeados na densidade de  $2 \times 10^5$  células por poço em placas de 24 poços contendo lamínulas de 15 mm de vidro previamente esterilizadas. Decorrido 4 horas de cultivo e aderência na lamínula as células foram submetidas aos diferentes tratamentos com ácidos graxos já citados anteriormente. Os macrófagos foram infectados com formas tripomastigotas de *T. cruzi* Y de cultura por 14 h (MOI 5), em meio DMEM com 0,5% de SBF. Vale ressaltar que durante esse período o protozoário é capaz de internalizar na célula, mas ainda não houve tempo para sua replicação (Dvorak e Hyde, 1973). Decorrido o tempo de infecção, os poços foram lavados com PBS a 37°C para a retirada dos parasitos não internalizados, as células fixadas com metanol por 10 minutos e coradas com a solução para coloração de Giemsa por 30 minutos.

As lamínulas foram retiradas das placas e montadas em lâmina de vidro com Permount (Fischer Scientific, NJ, EUA). O índice de internalização foi calculado pela multiplicação da porcentagem de células infectadas pela média do número de parasitos das células infectadas (Barrias *et al.*, 2010). A quantificação foi realizada utilizando microscopia de luz (modelo Olympus CH30LF100 – Olympus Optical CO., LTD) onde 500 células foram analisadas por lamínula de forma duplo-cego.

#### 5.1.17 ENSAIO DE SAÍDA DE *Trypanosoma cruzi* DE MACRÓFAGOS

Macrófagos obtidos a partir da diferenciação de células da medula óssea de camundongos C57BL/6 foram semeados na densidade de  $2 \times 10^5$  células por poço em placas de 48 poços. Após os tratamentos *in vitro* com EVs Y e/ou ácidos graxos

as células foram infectadas com formas tripomastigotas de *T. cruzi* Y de cultura por 14 h, na proporção de 0,1 parasito para cada célula. O uso de baixa multiplicidade de infecção é necessário para o desenvolvimento de uma infecção sincronizada nos macrófagos, com liberação contínua e crescente de parasitos no sobrenadante.

Posteriormente os poços foram lavados 3 vezes com PBS 37°C para a retirada dos parasitos não internalizados, e em seguida, foi adicionado meio DMEM. Diariamente o sobrenadante de cultura de cada poço foi coletado isoladamente, centrifugado (2600 x g, 5 minutos, 25°C), desprezado o sobrenadante realizado a contagem de *T. cruzi* em câmara de Neubauer sem diluição prévia. A quantidade de parasitos contados na Neubauer ( $\times 10^4/\text{mL}$ ) foi ajustada ao volume de sobrenadante utilizado, sendo, portanto, os resultados expressos em números absolutos de *T. cruzi* por amostra. Diariamente foi acrescentado meio DMEM aos poços. A partir da infecção das células esse procedimento foi realizado por 9 dias (Silva *et al.*, 1995; Aliberti *et al.*, 1999).

#### 5.1.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o programa estatístico GraphPad versão 6.01 (San Diego, CA). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. A diferença em dados agrupados foi analisada com o teste Two-way ANOVA seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Tukey/Sidak. A diferença entre dois grupos foi analisada com teste *T-student* não pareado. Já as análises entre mais de dois grupos não agrupados foram realizadas com o teste One-way ANOVA seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Tukey/Bonferroni. Considerado como estatisticamente diferente quando  $P \leq 0,05$ .

## 5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO - CAPÍTULO II

### 5.2.1 PERFIL DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES SECRETADAS POR *Trypanosoma cruzi* Y

O estudo das vesículas extracelulares em suas diversas aplicações trouxe junto a necessidade de um método de análise e quantificação dessas partículas. No sistema *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA) o equipamento visualiza a dispersão de luz das vesículas utilizando um microscópio de luz. Um vídeo é gravado e o programa *NTA software* utiliza o movimento browniano das vesículas individualmente para



calcular o diâmetro via equação de Stokes-Einstein, assim como a concentração das partículas em suspensão (Dragovic *et al.*, 2011).

As vesículas extracelulares de *Trypanosoma cruzi* cepa Y foram purificadas utilizando a metodologia de kit *Total Exosome isolation*. Para verificar a eficiência dessa metodologia foram selecionadas três suspensões de EVs Y obtidas em diferentes dias para análise quanto à concentração e tamanho através do Monitoramento de Movimento (*Nanoparticle Tracking Analysis* – NTA). As suspensões de EVs Y analisadas apresentaram o mesmo perfil de tamanho e concentração de partículas entre si, com uma população de vesículas heterogêneas e polidispersas, com moda variando entre 92 nm até 103 nm (tabela 5.1).

**Tabela 5.1 Caracterização das vesículas extracelulares de *Trypanosoma cruzi* de acordo com tamanho e concentração.** Vesículas extracelulares secretadas por formas tripomastigotas de *T. cruzi* Y foram purificadas utilizando o kit comercial *Total Exosome Isolation*. Utilizando *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA) as medidas correspondentes ao diâmetro (em nm) das EVs Y e a concentração presente nas diferentes suspensões foram analisadas.

Amostra	Média das EVs Y	Moda das EVs Y	Desvio padrão	Partículas / mL
1	139 nm	103 nm	96 nm	14,56 x 10 <sup>8</sup>
2	143 nm	87 nm	90 nm	13,38 x 10 <sup>8</sup>
3	127 nm	92 nm	73 nm	12,93 x 10 <sup>8</sup>
<b>Média</b>	136,33 nm	94 nm	86,3 nm	12,93 nm

O diâmetro médio encontrado das EVs Y nas três amostras apresentou variação compatível com o tamanho descrito na literatura. Nogueira e colaboradores (2015) analisaram por NTA vesículas extracelulares de quatro cepas de *T. cruzi* (Y, Colombiana, CL-14 e YuYu), encontrando tamanhos similares para as vesículas extracelulares dessas quatro cepas, com diâmetro médio de 150 nm. O trabalho de Bayer-Santos *et al.* (2013) apresentou pela primeira vez a técnica de purificação de vesículas de *T. cruzi* por protocolo de fracionamento, conseguindo separar e obter vesículas maiores e menores. As vesículas derivadas de epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi* cepa Dm28c foram analisadas no NTA confirmando a obtenção de vesículas menores, com moda de aproximadamente 50 nm, e vesículas maiores, com moda de 111 para vesículas liberadas por epimastigotas e moda de 136 nm para vesículas liberadas por tripomastigotas. Utilizando a mesma técnica de fracionamento por centrifugação, os resultados apresentados no trabalho de Clemente *et al.* (2016) referentes à análise de vesículas secretadas por

tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi* cepa CL e cepa G mostram que esses parasitos liberam principalmente dois tamanhos de vesículas entre 50 e 250 nm: as maiores com diâmetro em torno de 100 nm e as menores com aproximadamente 50 nm. A dispersão no tamanho das EVs Y utilizadas nesse trabalho, entre 50 nm e 250 nm, confirma a denominação adotada para essas partículas como “Vesículas Extracelulares”.

#### 5.2.2 A SUPLEMENTAÇÃO ORAL COM ÓLEO DE PEIXE OU ÓLEO DE MILHO IMPEDE O AUMENTO DA PARASITEMIA INDUZIDO PELO TRATAMENTO COM VESÍCULAS EXTRACELULARES DE *Trypanosoma cruzi* Y

Recentemente nosso grupo de pesquisa publicou os resultados do estudo envolvendo a suplementação oral com óleo de peixe rico em ácidos graxos poli-insaturados *n*-3 (PUFAs *n*-3), ou ômega-3, e a infecção experimental por *T. cruzi* Y em camundongos C57BL/6 (Lovo-Martins *et al.*, 2017). Neste trabalho, mostramos que apesar dos animais suplementados com óleo de peixe apresentarem parasitemia mais alta durante a fase aguda da infecção, esses mesmos animais apresentam redução do parasitismo cardíaco, redução das alterações hematológicas características de fase aguda e modulação da resposta imunológica a favor do hospedeiro (Anexo II).

Levando em consideração os efeitos patogênicos que as EVs Y desencadeiam nos animais infectados por *T. cruzi* Y e, por outro lado, a melhora observada na suplementação com óleo de peixe durante a infecção, decidimos estudar os efeitos das EVs Y em animais suplementados com óleo de peixe ou óleo de milho. Assim como o óleo de peixe, o óleo de milho fornece calorias ao animal, mas consiste em uma fonte pobre em PUFAs *n*-3, porém rico em PUFAs *n*-6, sendo um bom controle experimental para os efeitos específicos dos PUFAs *n*-3.

Camundongos C57BL/6 começaram a ser suplementados por via oral com óleo de milho (CO, *corn oil*) ou óleo de peixe (FO, *fish oil*) 14 dias antes da infecção (0,6% volume/peso). No sétimo dia de suplementação, os animais de cada tratamento foram divididos em dois grupos: um que recebeu vesículas extracelulares de *T. cruzi* (EVs Y) por via intraperitoneal e outro grupo que recebeu PBS, também por via intraperitoneal, como controle. Decorridos 7 dias da inoculação de EVs Y (e 14 dias de suplementação) os animais foram infectados por  $5 \times 10^3$  tripomastigotas obtidos no sobrenadante de cultura de células Vero-E6 por via intraperitoneal. A suplementação

diária com CO ou FO continuou sendo administrada durante todo o experimento, enquanto a parasitemia foi avaliada (Figura 5.1).

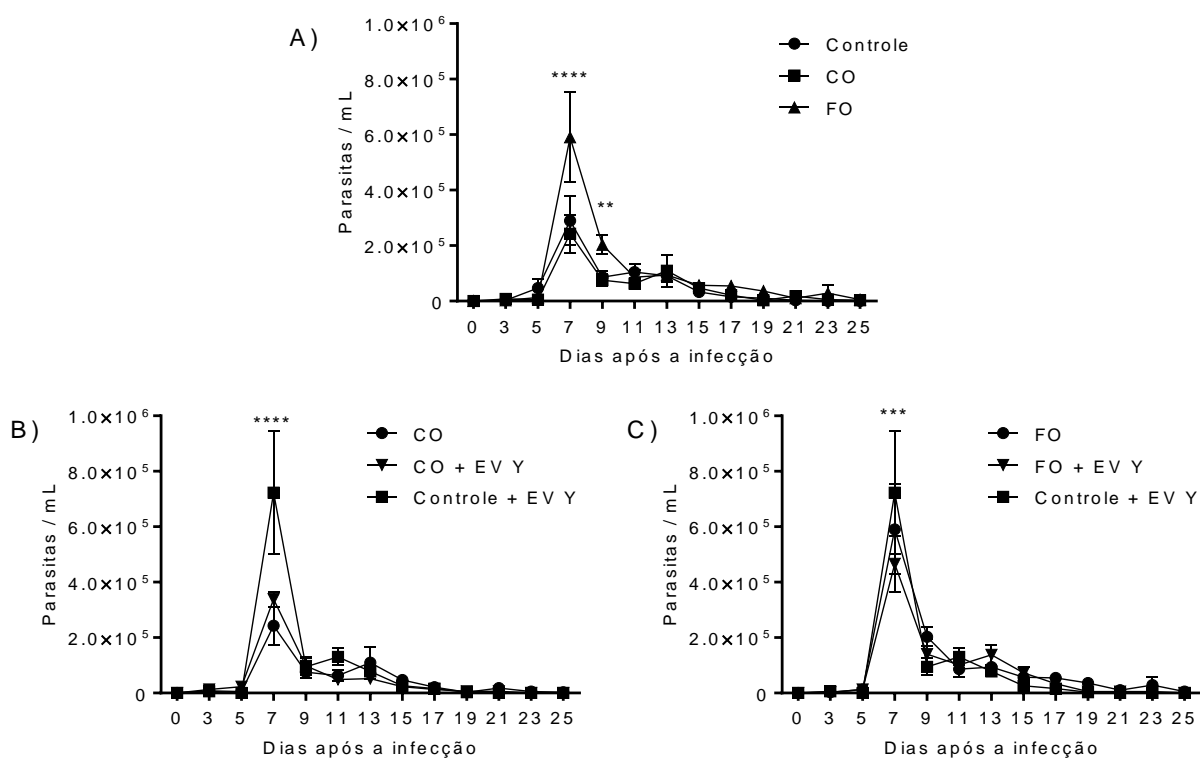
Corroborando com os resultados já publicados (Lovo-Martins *et al.*, 2017), a suplementação oral com óleo de peixe (*Fish oil* - FO) iniciada antes da infecção provocou aumento dos parasitos circulantes no sangue no sétimo e nono dia após a infecção (*day post infection* - dpi), em comparação com os grupos tratados com óleo de milho (*Corn oil* - CO) e controle não suplementado (5.3 A). Após o 7º dpi, os níveis de parasitos circulantes no sangue se igualaram, não sendo mais encontrados parasitos a partir do 25º dpi. Não houve diferença na parasitemia entre os animais suplementados com CO e o controle não suplementado (Figura 5.3 A). Os animais que receberam apenas tratamento prévio com EVs Y (controle + EVs Y) apresentaram maior parasitemia (Figura 5.3 B e 5.3 C).

No grupo suplementado por via oral com óleo de milho e que receberam EVs Y previamente à infecção (CO + EVs Y), a parasitemia se manteve igual a observada nos animais suplementados com óleo de milho e que não receberam EVs Y (CO) (Figura 5.3 B). Da mesma forma, nos animais suplementados por via oral com óleo de peixe e que receberam EVs Y sete dias antes da infecção (FO + EVs Y), a parasitemia se manteve igual a observada nos animais suplementados com óleo de peixe e que não receberam vesículas (FO) (Figura 5.3 C). Apesar da suplementação com óleo de peixe causar aumento da parasitemia no sétimo dia em relação ao controle não suplementado e ao grupo óleo de milho (Figura 5.3 A), a inoculação de EVs Y previamente à infecção não causou adicional aumento nos parasitos circulantes no sangue desses animais, na verdade a parasitemia do grupo FO + EVs Y foi menor do que a parasitemia dos animais tratados apenas com EVs Y (Figura 5.3 C).

O aumento da parasitemia no 7º dpi em decorrência do contato do camundongo com EVs Y antes da infecção está associado à modulação da resposta imunológica do hospedeiro a favor do parasito, conforme mostrado no artigo do capítulo anterior. Isso indica que os mecanismos envolvidos com o aumento da parasitemia induzido por EVs Y provavelmente são diferentes daqueles envolvidos no aumento da parasitemia induzido pela suplementação com FO, uma vez que nosso grupo já mostrou que a suplementação com FO está associada a modulação do sistema imune a favor do hospedeiro, enquanto nos resultados aqui mostrados as EVs Y favorecem o parasito. Ou seja, nos dois grupos de suplementação a ingestão dos óleos ricos em PUFAs *n*-3 (FO) e PUFAs *n*-6 (CO) parece ter interferido nos efeitos que as EVs Y exercem *in vivo*, uma vez que a inoculação de EVs Y concomitante à

suplementação e previamente à infecção não mudou a curva de parasitemia desses animais em comparação com aquela que os grupos apenas suplementados com CO ou FO apresentam.

**Figura 5.3: Efeito da inoculação de vesículas extracelulares de *Trypanosoma cruzi* Y sobre a parasitemia de camundongos C57BL/6 suplementados por via oral com óleo de milho ou óleo de peixe.** Camundongos C57BL/6 foram suplementados por via oral com óleo de milho (CO) ou óleo de peixe (FO) (0,6% volume/massa) ou mantidos sem tratamento por via oral (controle). Sete dias após o início da suplementação os camundongos receberam PBS ou vesículas extracelulares de *T. cruzi* (EVs Y) por via intraperitoneal. Decorridos mais sete dias os animais foram infectados por 5000 tripomastigotas de *T. cruzi* Y. A) camundongos controles, CO e FO B) camundongos suplementados com CO e tratados com EVs Y ou PBS i.p. C) camundongos suplementados com FO e tratados com EVs Y ou PBS i.p.. Os valores da parasitemia são médias  $\pm$  erro padrão de cinco animais por grupo, de dois experimentos independentes. \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001; \*\*\*\* P < 0,0001 estatisticamente diferente (Two-way ANOVA, Pós-teste Tukey) – Graph Pad Prism.



Apenas três trabalhos relacionando a suplementação com óleo de peixe e infecção por *T. cruzi* estão disponíveis atualmente. O primeiro, publicado em 1958 por Godfrey trouxe a relação entre a suplementação de camundongos com óleo de bacalhau e a infecções por diferentes tripanosomatídeos. Com o *T. cruzi*, o autor mostrou que a suplementação com óleo de bacalhau não diminuiu a parasitemia dos animais infectados. Apesar de não discutido no trabalho, a curva de parasitemia apresentada permite supor que o óleo de bacalhau aumentou a parasitemia nos

animais, em uma livre interpretação dos resultados. Anos depois, a suplementação com FO na infecção por *T. cruzi* em camundongos foi abordada por Takeda e colaboradores (1995), contudo, apesar dos níveis mais altos de TNF- $\alpha$  no plasma desses animais, os autores não encontraram diferenças no desenvolvimento da infecção. Por outro lado, utilizando um delineamento experimental diferente do adotado por Takeda (1995), com maior inóculo de parasitos e sem utilizar LPS como estímulo, nosso grupo mostrou que a suplementação com FO beneficia o hospedeiro murino na infecção por *T. cruzi* (Lovo-Martins *et al.*, 2017).

Os estudos da suplementação com óleo de peixe na resistência a infecções por diferentes patógenos têm apresentado resultados divergentes na literatura científica. Além disso, poucos são os estudos envolvendo doenças parasitárias. (Anderson e Fritsche, 2002). Infecções bacterianas e sepse são mais estudadas, principalmente pelo fato da modulação da inflamação exacerbada associada ao controle da replicação bacteriana ser um ponto chave no controle da sepse (Irons *et al.*, 2003; Ferguson *et al.*, 2014; Tsutsumi *et al.*, 2015).

### 5.2.3 ÓLEO DE PEIXE IMPEDE A MODULAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO VIA VESÍCULAS EXTRACELULARES DE *Trypanosoma cruzi*

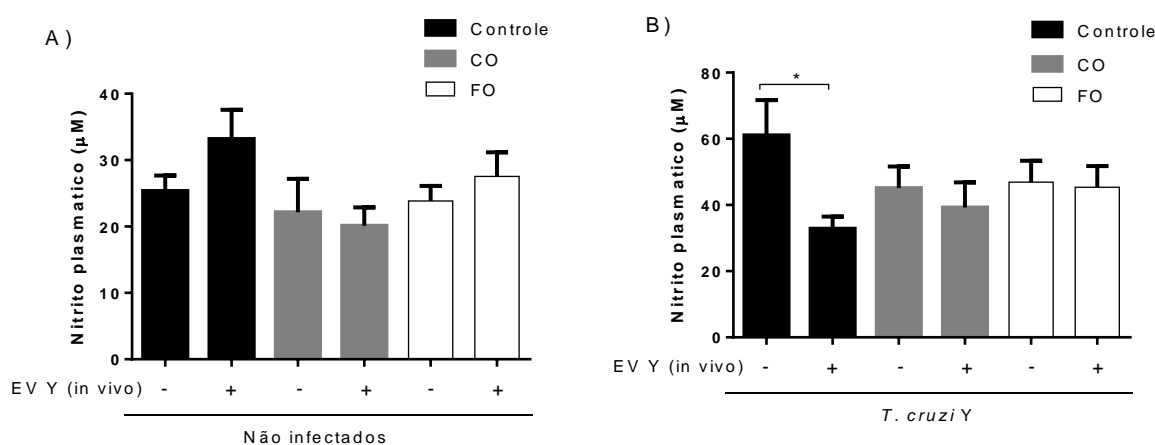
Como discutido anteriormente, o óxido nítrico (NO) tem papel importante na resistência de camundongos à infecção por *T. cruzi* (Vespa *et al.*, 1994). Além do potencial tripanocida que essa espécie reativa possui em macrófagos, ela ainda exerce efeitos regulatórios sobre outras células do sistema imunológico, modulando a resposta inflamatória e a produção de citocinas que ocorre durante a infecção (Gutierrez *et al.*, 2009).

O óxido nítrico (NO) plasmático foi analisado nos animais dos diferentes grupos de tratamento no 12<sup>o</sup> dpi. Apenas o tratamento dos animais com EVs Y, na ausência de infecção, não alterou os níveis de nitrito no plasma em comparação com os animais controles que não haviam recebido EVs Y. A associação da inoculação de EVs Y com a suplementação com CO ou FO nos animais não infectados também não resultou em mudanças no nitrito plasmático desses animais (Figura 5.4 A).

Os animais infectados apresentaram grande concentração de nitrito no 12<sup>o</sup> dpi, enquanto os animais que receberam tratamento com EVs Y previamente à infecção apresentaram níveis menores de nitrito no plasma (figura 5.4 B). No entanto, a suplementação tanto com CO ou FO, associada ou não ao tratamento com EVs Y,

manteve os níveis de nitrito intermediários nesses animais, de forma que não são estatisticamente diferentes nem do controle infectado que não recebeu EVs Y como do animal controle que recebeu EVs Y e foi infectado (figura 5.4 B).

**Figura 5.4: Vesículas extracelulares de *Trypanosoma cruzi* Y não alteram a produção de óxido nítrico no plasma de camundongos suplementados com óleo de milho ou óleo de peixe.** Camundongos C57BL/6 foram suplementados por via oral com óleo de milho (CO) ou óleo de peixe (FO) (0,6% volume/massa) ou mantidos sem tratamento por via oral (controle). Sete dias após o início da suplementação os camundongos receberam PBS ou vesículas extracelulares de *T. cruzi* (EVs Y) por via intraperitoneal. Decorridos mais sete dias os animais foram infectados por 5000 tripomastigotas de *T. cruzi*. O plasma foi coletado no 12º dia após a infecção. O nitrito foi mensurado pela técnica de Cádmio seguido pela reação de Griess, como estimativa da produção de óxido nítrico (NO) no plasma de animais (A) não infectados e (B) infectados. Os resultados expressam as médias  $\pm$  erro padrão de cinco animais por grupo, de dois experimentos independentes. \* P < 0,05; estatisticamente diferente (One-way ANOVA, pós-teste Tukey) – Graph Pad Prism.



Considerando que as EVs Y parecem exercer efeitos moduladores sobre às células do hospedeiro, foi realizado o cultivo *in vitro* das células do baço com o objetivo de avaliar a capacidade das células responsáveis pela resposta imunológica do animal suplementado com FO ou CO responderem ao estímulo com antígeno de *T. cruzi* (TcAg). Os animais no 12º dpi já passaram pela fase de reconhecimento do *T. cruzi* pelo sistema imune inato, apresentação de antígenos e ativação da imunidade adaptativa nos órgãos linfoides, como o baço. A estimulação das células dos animais infectados com TcAg permite estimular uma resposta correspondente ao *status* de ativação também apresentado *in vivo*. O baço dos camundongos dos diferentes grupos de tratamento foi removido no 12º dpi para cultivo dos esplenócitos *in vitro*. O nitrito foi quantificado no sobrenadante dessas culturas após 48 horas de cultivo em meio de cultura ou com estímulo com TcAg.

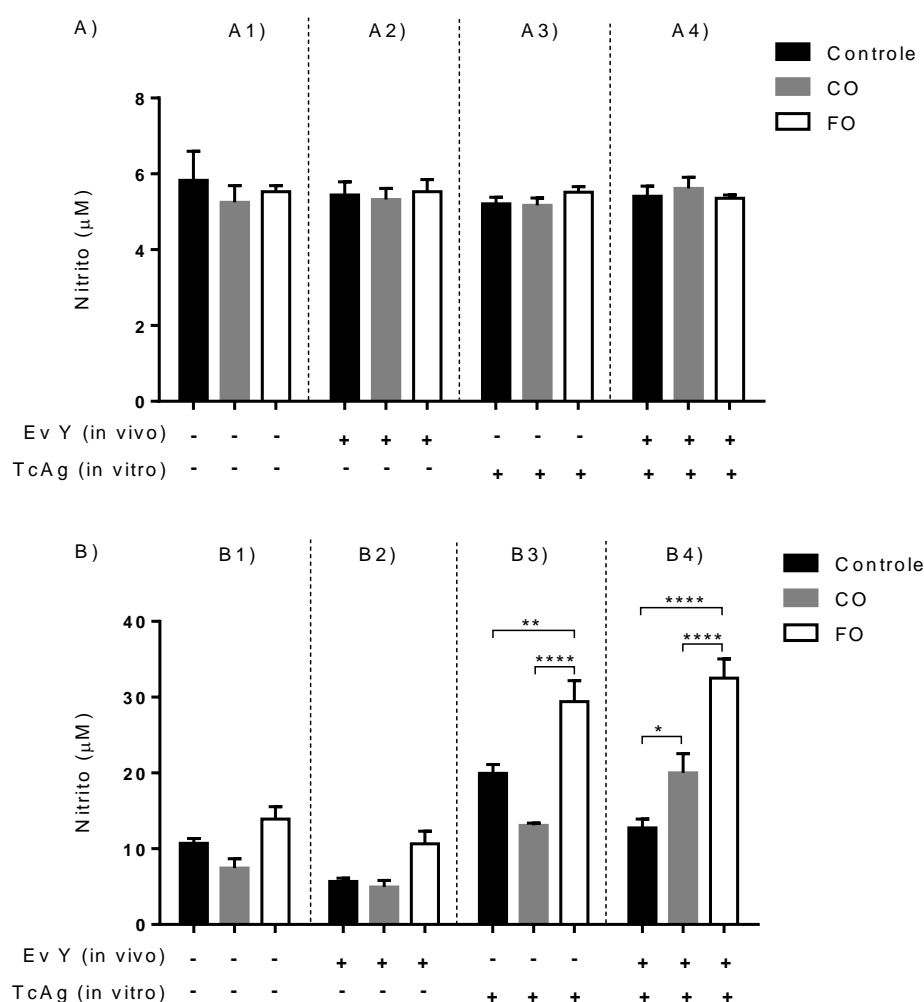
Nos animais não infectados a suplementação com CO ou FO (Figura 5.5-A1) associada a inoculação de EVs Y (Figura 5.5-A2) não alterou a resposta dos esplenócitos *in vitro* quanto a produção de NO, mesmo quando estimulados com TcAg (Figura 5.5-A3 e A4). Nos animais infectados, apenas a suplementação com CO ou FO também não alterou a capacidade de produção *in vitro* de NO pelos esplenócitos (Figura 5.5-B1), nem mesmo quando os animais haviam sido tratados com EVs Y antes da infecção (Figura 5.5-B2).

Nos animais infectados, as células provenientes dos animais suplementados com FO produziram mais NO em resposta ao estímulo com TcAg do que as células dos animais controles e suplementados com CO (Figura 5.5-B3). Nos animais apenas tratados com EVs Y antes da infecção (sem suplementação com óleos) a produção de NO foi menor quando essas células foram estimuladas com TcAg (Figura 5.5-B3 comparada com 5.5-B4,  $P < 0,01$ ). Nos animais suplementados com CO, a produção de NO, tanto no cultivo sem estímulo (Figura 5.5-B3) como quando estimulados com TcAg (Figura 5.5-B4) foi semelhante ao controle sem suplementação. Já nos animais suplementados com FO, o estímulo das células do baço desses animais com TcAg resultou em grande produção de NO (Figura 5.5-B4). Embora o tratamento com EVs Y tenha resultado em diminuição da capacidade de produção de NO nos animais controles sem suplementação, os animais tratados com EVs Y e que estavam sendo suplementados com FO apresentaram grande produção de NO em resposta ao estímulo com TcAg (Figura 5.5-B4). Portanto, a ingestão do FO rico em PUFAs *n*-3 está impedindo os efeitos moduladores das EVs Y sobre a resposta desses animais a infecção. De maneira mais discreta, mas ainda representativa, os animais tratados com EVs Y e que estavam sendo suplementados com CO também produziram mais NO que o controle quando estimulados com TcAg (Figura 5.5-B4,  $P < 0,05$ ), e menos do que os suplementados com FO (Figura 5.5-B4,  $P < 0,0001$ ).

Como discutido anteriormente, o óxido nítrico (NO) produzido nos macrófagos constitui um importante mecanismo tripanocida nessas células, sozinho ou quando combinado com o superóxido, dando origem ao peroxinitrito. Isso é confirmado em modelos murinos onde o bloqueio *in vivo* da enzima NO sintase induzível promove o aumento da parasitemia e mortalidade em animais infectados. Adicionalmente, o uso de fármacos doadores de NO é capaz de matar parasitos *in vitro* em culturas axênicas, sugerindo dessa forma que o NO possui diretamente função tripanocida (Vespa *et al.*, 1994). O reconhecimento dos tripomastigotas por

macrófagos, juntamente com outros estímulos, ativa a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), disparando grande produção da espécie reativa NO com consequente eliminação do parasito (Gutierrez *et al.*, 2009).

**Figura 5.5: A suplementação com óleo de peixe impede que vesículas extracelulares de *Trypanosoma cruzi* Y diminuam a capacidade dos esplenócitos produzirem óxido nítrico.** Camundongos C57BL/6 foram suplementados por via oral com óleo de milho (CO) ou óleo de peixe (FO) (0,6% volume/massa) ou mantidos sem tratamento por via oral (controle). Sete dias após o início da suplementação os camundongos receberam PBS ou vesículas extracelulares de *T. cruzi* (EVs Y) por via intraperitoneal. O baço foi removido no 12º dia após a infecção e os esplenócitos dos camundongos (A) não-infectados e (B) infectados foram cultivados com ou sem antígeno de *T. cruzi* (TcAg). O nitrito foi mensurado pela técnica de Griess, como estimativa da produção de óxido nítrico (NO). Os resultados expressam as médias  $\pm$  erro padrão de cinco animais por grupo, de três experimentos independentes. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\*\* P < 0,0001 estatisticamente diferente (Two-way ANOVA, pós-teste Tukey) – Graph Pad Prism.



O FO utilizado nesse trabalho é rico em PUFAs *n*-3, tais como o ácido eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), que possuem grande potencial de modulação da resposta imunológica e inflamação. A associação da suplementação



com FO e infecção experimental por *T. cruzi* publicada pelo nosso grupo recentemente mostrou que a suplementação com FO aumenta a produção de TNF- $\alpha$  por esplenócitos de animais no início da infecção (7<sup>o</sup> dpi). Também Takeda e colaboradores (1995) mostraram que a suplementação com FO induz níveis mais altos de TNF- $\alpha$  no plasma de camundongos infectados por *T. cruzi*.

Embora o macrófago tenha mecanismos que permitem o reconhecimento do *T. cruzi*, para que essa célula consiga responder de forma mais eficiente é necessário que ele seja ativado via citocinas. Dentro desse contexto, o IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$ , desempenham papel fundamental na ativação de macrófagos, potencializando a resposta e tornando essas células mais eficientes na eliminação do parasito. (Gazzinelli *et al.*, 1992; Vespa *et al.*, 1994; Silva *et al.*, 1995).

Nos resultados aqui apresentados, os níveis de NO no plasma dos camundongos no 12<sup>o</sup> dia após a infecção não foram modificados pela suplementação com FO ou CO. As EVs Y foram capazes de reduzir o NO apenas no plasma dos camundongos sem suplementação e tratado com EVs Y e infectados.

Também os esplenócitos dos camundongos que receberam EVs Y previamente a infecção produziram menos NO quando estimulados com antígeno de *T. cruzi*, em comparação com o controle que não recebeu EVs Y. Já nas células obtidas de animais suplementados com FO o estímulo com antígeno de *T. cruzi* fez com que essas células produzissem NO em concentrações mais altas que os controles sem tratamento e CO. O tratamento com EVs Y *in vivo* nos animais suplementados com FO não interferiu com a resposta dessas células ao estímulo *in vitro* com antígeno de *T. cruzi*. Na verdade, essas células produziram NO em concentrações semelhantes a produzida pelos esplenócitos estimulados com antígeno de *T. cruzi* dos animais suplementados com FO e que não haviam recebido EVs Y *in vivo*.

A ativação e maior produção de NO pelos esplenócitos dos animais tratados com FO, mesmo com a inoculação de EVs Y previamente a infecção, mostra que mais do que efeitos anti-inflamatórios os PUFAs *n*-3 possuem efeitos imunomoduladores. Isso porque as células continuam responsivas à antígenos do parasito quanto a produção de NO, o que é importante para a resposta do hospedeiro a infecção.

Além dos efeitos tripanocidas, o óxido nítrico também desempenha um papel regulador/supressor na resposta de linfócitos a infecção por *T. cruzi*. Foi observado supressão da resposta proliferativa de linfócitos expostos ao NO produzido

por macrófagos do baço de camundongos infectados ativados por IFN- $\gamma$  e TNF, supressão que decorre também da diminuição de IL-2 (Abrahamsohn e Coffman, 1995). A liberação de PGE<sub>2</sub> por células aderentes/macrófagos do baço foi outro mecanismo descrito como supressor da resposta de células T (Pinge-Filho *et al.*, 1999) e da produção de TNF- $\alpha$  (juntamente com o NO) na infecção por *T. cruzi* (Borges *et al.*, 1998).

A suplementação com FO aumenta a proporção dos PUFAs *n*-3 ácido eicosapentaenóico e docosahexaenóico nos fosfolipídeos das membranas de células inflamatórias, com conseqüente redução na quantidade do PUFAs *n*-6 ácido araquidônico. Dentre os vários mecanismos já descritos de imunomodulação por PUFAs *n*-3, a mudança na classe de mediadores lipídicos produzidos a partir desses ácidos graxos representa um dos principais mecanismos responsáveis pelo controle da inflamação (Calder, 2015b). Os PUFAs *n*-3 inibem competitivamente a formação de eicosanóides pelas enzimas ciclo-oxigenase e lipo-oxigenase a partir do ácido araquidônico, sendo produzidos, a partir dos PUFAs *n*-3, prostaglandinas e tromboxanos da série 3 e leucotrienos da série 5, que por sua vez apresentam menor atividade inflamatória em relação a prostaglandinas da série 2 sintetizadas a partir do ácido araquidônico. Ou seja, a suplementação com FO está associada com menor produção de prostaglandina E<sub>2</sub> (Calder *et al.*, 1994; Peterson *et al.*, 1998).

Células do baço de camundongos suplementados com FO obtidos no 7<sup>o</sup> dpi produzem metade da concentração de PGE<sub>2</sub> em resposta a infecção por *T. cruzi* em comparação com células obtidas de animais suplementados com óleo de milho ou controle não suplementado. Mesmo após a estimulação dessas células com TcAg, os níveis de PGE<sub>2</sub> nas células obtidas de animais suplementados com FO e infectados ainda é metade em comparação com os grupos controles. Além disso, como discutido anteriormente, no 7<sup>o</sup> dpi as células dos animais suplementados com FO também produzem mais TNF- $\alpha$  em resposta a infecção (Lovo-Martins *et al.*, 2017).

Os resultados do artigo mostrados no capítulo anterior descrevem a formação de corpos lipídicos em macrófagos tratados com EV, mesmo na ausência de *T. cruzi*. Melo *et al.* (2003) mostraram que na infecção por *T. cruzi* esses corpos lipídicos constituem fonte de substrato para a geração de PGE<sub>2</sub>. Em alta concentração a PGE<sub>2</sub> está associada a imunossupressão observada no início da resposta ao parasito (Pinge-Filho *et al.*, 1999). Diante dessas informações, hipotetizamos que a capacidade reduzida das células produzirem PGE<sub>2</sub> em decorrência da suplementação com FO pode ser o fator minimizador os efeitos das EVs Y, mantendo eficiente a

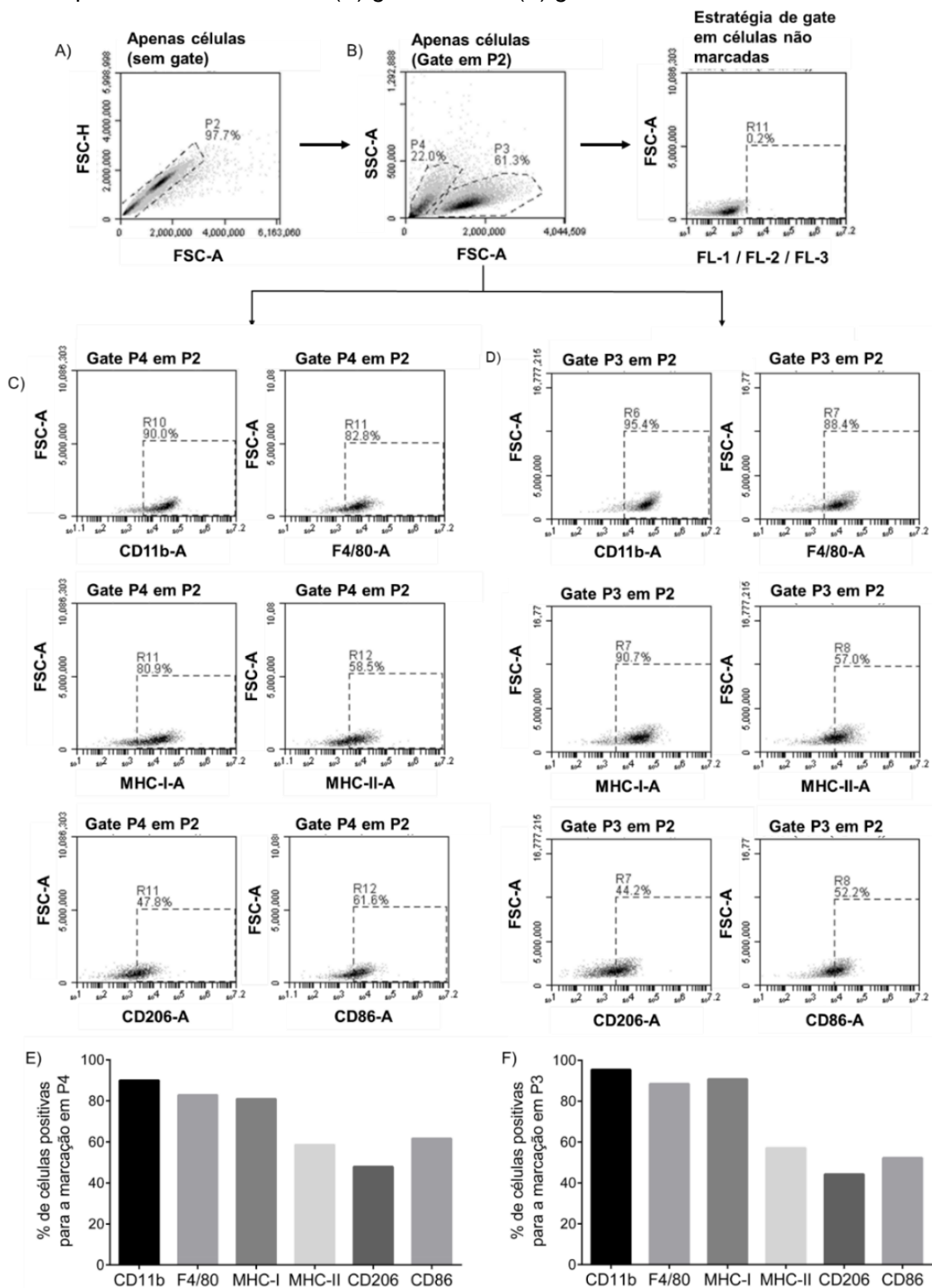
produção de NO pelos fagócitos e assim tornando o ambiente celular menos favorável para o parasito.

#### 5.2.4 INTERNALIZAÇÃO E CONSEQUENTE LIBERAÇÃO DE *Trypanosoma cruzi* EM MACRÓFAGOS EXPOSTOS A DIFERENTES ÁCIDOS GRAXOS E VESÍCULAS EXTRACELULARES DE *T. CRUZI*

O estudo dos macrófagos é de grande interesse na imunologia e na relação parasito-hospedeiro. Linhagens celulares imortalizadas de macrófagos, como J774A.1, RAW264.7 e P388D1 apresentam a vantagem de terem uma rápida proliferação, contudo a pressão positiva imposta pelas constantes passagens celulares em cultivo resulta em perda de genes que não são importantes para a replicação celular, mas essenciais para as funções imunológicas dos macrófagos. Assim como os camundongos são um bom modelo de estudo da resposta imunológica *in vivo*, os macrófagos desses animais constituem um bom modelo celular para a investigação dessa importante célula do sistema imunológico. A partir das células tronco da medula óssea de apenas um camundongo macrófagos podem ser obtidos em grande quantidade e sem apresentarem nenhum tipo de ativação decorrente de sinais migratórios ou estimulatórios no animal. Esses aspectos têm favorecido o uso de macrófagos derivados de células da medula em estudos imunológicos (Marim *et al.*, 2010).

Os macrófagos utilizados nos ensaios *in vitro* foram obtidos a partir da diferenciação de células da medula óssea de camundongos C57BL/6 (Englen *et al.*, 1995; Marim *et al.*, 2010). Após sete dias de diferenciação as células foram marcadas com anticorpos contra moléculas de membrana características de macrófagos para verificação da eficiência do protocolo adotado. Utilizamos anticorpos anti-CD11b, anti-F4-80, anti-MHC-I, anti-MHC-II, anti-CD206, anti-CD80 e anti-CD86. As células obtidas apresentaram duas populações com tamanhos diferentes (figura 5.6 B) e por isso foram analisadas separadamente quanto aos marcadores de superfície de macrófagos. A porcentagem de células positivas para os marcadores analisados foi semelhante nos dois *gates* (P4 e P3) delimitados conforme mostrado na figura 5.6 B, com quase 100% das células apresentando os marcadores CD11b e F4/80. Quanto aos marcadores que indicam o grau de ativação do macrófago, houve maior expressão da molécula apresentadora de antígeno MHC-II e da molécula co-estimulatória CD86 em relação a menor expressão do receptor de manose CD206.

**Figura 5.6: Estratégia de *gate* e imunofenotipagem de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6.** Macrófagos obtidos a partir de diferenciação de células da medula óssea de camundongos C57BL/6 foram submetidos a marcação de moléculas superfície, seguido da análise por citometria de fluxo (células diferenciadas a partir da medula óssea de 1 animal,  $n = 1$ ). (A) Gráfico de tamanho-altura (FSC-H) por tamanho-área (FSC-A) para seleção de células não-agrupadas no *gate* P2 (B) Gráfico de tamanho (FSC) por granulosidade (SSC) no *gate* P2 e seleção de duas populações com tamanhos diferentes (P3 e P4) com a marcação de *gate* nas células não marcadas. Marcação para diferentes moléculas de superfície: CD11b; F4/80; MHC-I; MHC-II; CD206; CD86 dentro da população do *gate* (C) P4 e (D) P3, ambos em P2. Representação gráfica da porcentagem de células positivas para os marcadores no (E) *gate* P4 e no (F) *gate* P3.



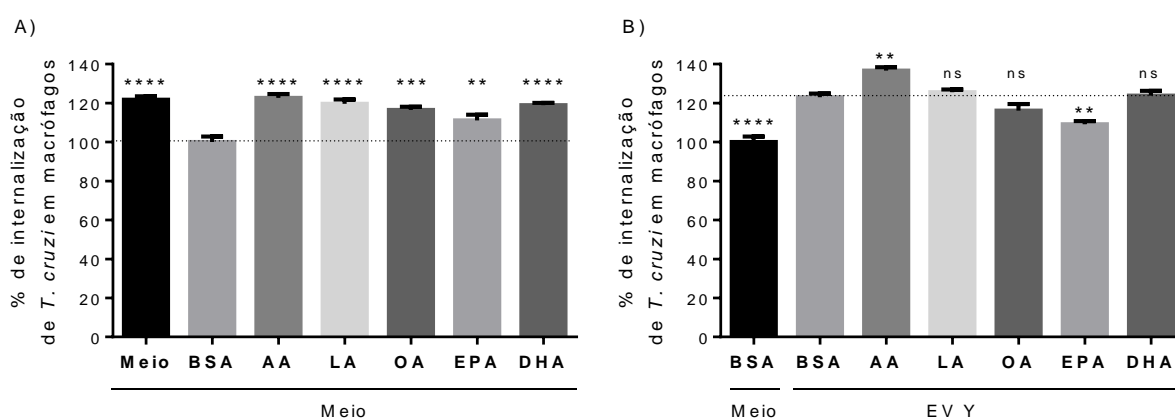
Os marcadores CD11b e F4/80 estão presentes em quase 100% das células obtidas. A molécula CD11b faz parte da família das integrinas, e participa da migração e adesão celular dos macrófagos. Já o F4/80 é considerado o marcador mais específico para identificação de macrófagos maduros (Kim *et al.*, 2015), e está envolvido com o desenvolvimento de tolerância imunológica (Van Den Berg e Kraal, 2005). Dessa forma, essas moléculas são marcadores característicos de macrófagos, confirmando que o protocolo utilizado foi eficiente para a obtenção dessas células.

Apesar do óleo de peixe ter características bem diferentes do óleo de milho - o primeiro é rico em PUFAs *n*-3 e o segundo tem predominantemente PUFAs *n*-6 e 9, com ausência de PUFAs *n*-3 – ambos os óleos constituem uma mistura de ácidos graxos. Com o objetivo de entender a relação dos ácidos graxos individualmente e a sua relação com os efeitos patogênicos das EVs Y foram selecionados cinco ácidos graxos purificados para estudo *in vitro* em macrófagos: PUFAs *n*-6 ácido araquidônico (AA) e ácido linoleico (LA); o MUFA *n*-9 ácido oleico (OA) e os PUFAs *n*-3 ácido docosahexaenóico (DHA) e eicosapentaenóico (EPA). Considerando que o BSA constitui o veículo para tratamento com os ácidos graxos, o grupo tratado com BSA foi utilizado como controle 100% para as comparações, tanto no cultivo com meio como no tratamento com EVs Y.

Os macrófagos tratados com o veículo BSA apresentaram menos parasitos internalizados quando em comparação com as células cultivadas apenas em meio de cultura (Figura 5.7 A). Em relação aos macrófagos tratados com ácidos graxos AA, LA, AO, EPA e DHA e cultivados com meio de cultura, todos os ácidos graxos ocasionaram maior internalização de amastigotas em relação ao controle BSA + meio (Figura 5.7 A). Mesmo a internalização sendo menor nas células tratadas com BSA em relação aos macrófagos não tratados, o BSA não impediu que as EVs Y aumentassem a internalização de amastigotas nos macrófagos (Figura 5.7 B), confirmando resultados mostrados no capítulo anterior.

Já no tratamento das células com os ácidos graxos individualmente, seguido da exposição às EVs Y, as células tratadas com AA + EVs Y apresentaram mais amastigotas internalizadas em comparação às células tratadas com BSA + EVs Y. Por outro lado, os macrófagos tratados com EPA + EVs Y mostraram redução na internalização de amastigotas também em comparação com as células tratadas com BSA + EVs Y. Nos tratamentos com LA, AO e DHA seguido da exposição às EVs Y, não houve diferença em comparação com o grupo BSA + EVs Y (Figura 5.7 B).

**Figura 5.7: Índice de internalização de amastigotas em macrófagos tratados com diferentes ácidos graxos e expostos às vesículas extracelulares de *Trypanosoma cruzi* Y.** Macrófagos derivados da medula óssea de camundongos C57BL/6 foram tratados durante 24 horas com ácidos graxos (50  $\mu$ M) e, em seguida, foram expostos durante mais 24 horas a vesículas extracelulares de *T. cruzi* (EVs Y). As EVs Y foram removidas e as células foram infectadas durante 14 horas com tripomastigotas de *T. cruzi* Y (MOI 5). Após a remoção dos parasitos não internalizados as lâminas foram coradas com Giemsa e analisadas por microscopia de luz. A porcentagem de internalização foi calculada considerando o número de amastigotas internalizadas por macrófago, considerando o grupo BSA + meio como 100%. (A) Porcentagem de internalização nos macrófagos tratados com os ácidos graxos + meio (controle meio e controle BSA, soro albumina bovino; AA, ácido araquidônico, LA, ácido linoleico, OA, ácido oleico; EPA, ácido eicosapentaenóico; DHA, ácido docosahexaenóico) e (B) em macrófagos tratados com ácidos graxos + EVs Y. Os resultados expressam a porcentagem média  $\pm$  erro padrão, com dois experimentos independentes. \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*\*\*  $P < 0,0001$  diferentes do controle BSA + meio (A) e BSA + EVs Y (B) (One-way ANOVA com pós-teste Bonferroni) – Graph Pad Prism.



Apesar da internalização ser uma etapa essencial da infecção por *T. cruzi*, para que ela seja efetiva o parasito precisa evadir dos mecanismos tripanocidas do macrófago, replicar e romper a membrana celular, dando continuidade ao seu ciclo. Para avaliar a eficiência da infecção por *T. cruzi* nos macrófagos tratados com ácidos graxos e expostos às EVs Y previamente à infecção, a liberação de parasitos no sobrenadante dos macrófagos dos diferentes grupos de tratamento foi quantificada diariamente (Figura 5.8) (Silva *et al.*, 1995; Aliberti *et al.*, 1999).

Nesse experimento, as células foram expostas aos ácidos graxos por 24h para incorporação pelos macrófagos. Após a remoção dos ácidos graxos as células foram expostas às EVs Y por mais 24h, ou seja, as EVs Y entraram em contato com os macrófagos que já haviam incorporado os ácidos graxos. As EVs foram então removidas e as células foram colocadas em contato com *T. cruzi* por 14h. Após a remoção dos parasitos não internalizados o meio de cultura foi trocado diariamente e,

para assegurar que os ácidos graxos continuassem presentes nas células, o meio de cultura adicionado após a infecção sempre continha 50 µM do respectivo ácido graxo.

Nos macrófagos expostos às EVs Y, a liberação de tripomastigotas no sobrenadante de cultura foi maior em relação ao controle BSA (Figura 5.8 F). Portanto, as EVs Y aumentaram não só a internalização, mas também a replicação e consequente liberação do *T. cruzi* foi maior nesse grupo.

Analisando a liberação de parasitos pelas células tratadas somente com os ácidos graxos (Figura 5.8, painel superior), os tratamentos com LA ou OA resultaram em maior liberação quando comparado ao controle BSA (Figura 5.8 B e C). Já os tratamentos com AA, EPA e DHA reduziram drasticamente a liberação de *T. cruzi* no sobrenadante dos macrófagos durante todo o período analisado (Figura 5.8 A, D e E). Apesar dessa diferença marcante na liberação de parasitos entre os tratamentos com os ácidos graxos, a internalização do *T. cruzi* não foi diferente entre os grupos, o que demonstra que a incorporação de LA ou OA aos macrófagos favorece a replicação do parasito, enquanto a incorporação de AA, EPA e DHA não interfere na internalização, mas prejudica acentuadamente a replicação do *T. cruzi*.

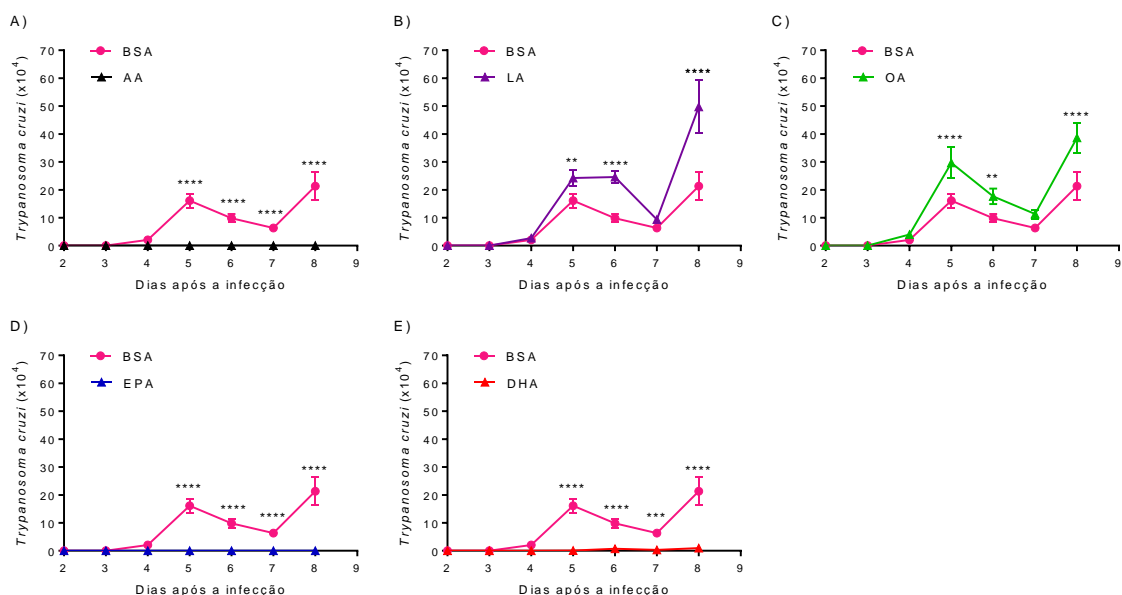
Adicionalmente, quando os macrófagos foram tratados com LA ou OA seguido da exposição às EVs Y, houve acentuado aumento da liberação de tripomastigotas no sobrenadante dessas células em comparação com a liberação induzida pelo tratamento BSA + EVs Y (Figura 5.8 H e I). Também nesses grupos a internalização de *T. cruzi* não foi diferente do controle. Ou seja, além dos ácidos graxos LA e OA sozinhos aumentarem a liberação de parasitos, a associação deles com as EVs Y potencializou ainda mais a replicação e liberação do parasito.

Assim como aconteceu nos macrófagos tratados apenas com AA, EPA e DHA, a associação deles com as EVs Y não alterou a liberação de parasitos. Nesses grupos os parasitos foram liberados até mesmo em quantidades muito menores do que as que foram observadas no controle BSA sem EVs Y (Figuras 5.8 G, J e K). O interessante é que, em comparação ao grupo BSA + EVs Y, no tratamento com AA + EVs Y a internalização foi maior, enquanto que no tratamento com EPA + EVs Y a internalização foi menor. O AA é um PUFA *n*-6 presente no óleo de milho e é utilizado como substrato para a síntese de eicosanóides com grande potencial inflamatório. Já o EPA e o DHA são PUFAs *n*-3 presentes no óleo de peixe, e estão são utilizados para a síntese de eicosanóides com menor potencial inflamatório (Calder, 2015b; Lovo-Martins *et al.*, 2017). Provavelmente os mecanismos envolvidos com a redução

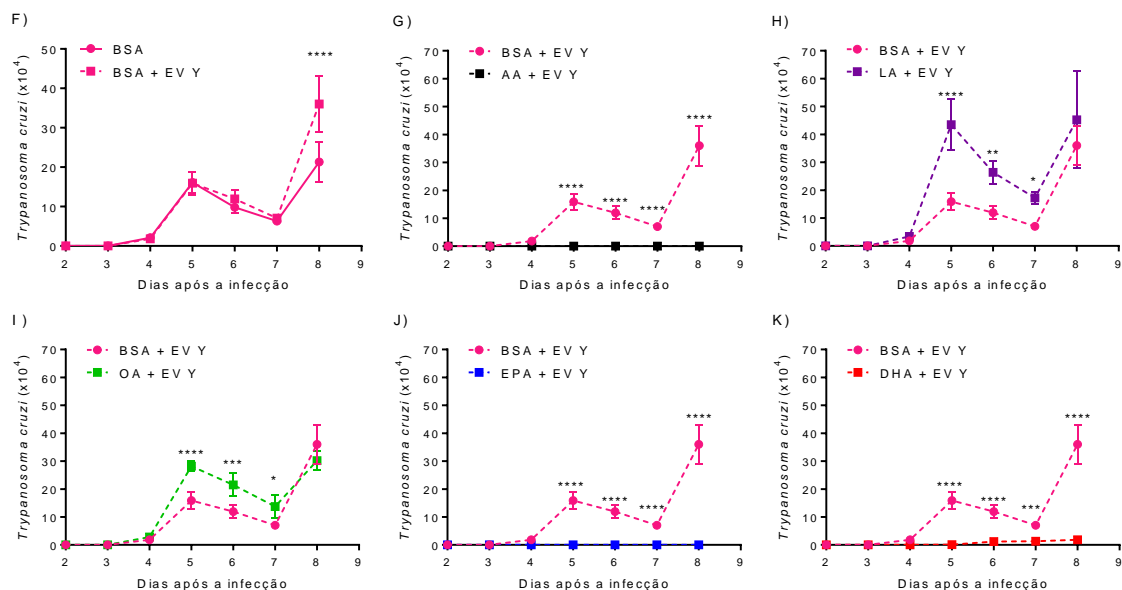
da replicação do parasito observado nesses ácidos graxos são diferentes, o que demanda mais estudos para elucidar essa questão.

**Figura 5.8 Modulação de ácidos graxos e vesículas extracelulares de *Trypanosoma cruzi* Y na liberação de parasitos no sobrenadante de macrófagos.** Macrófagos derivados da medula óssea de camundongos C57BL/6 foram tratados durante 24 horas com ácidos graxos (50  $\mu$ M) e, em seguida, foram expostos durante mais 24 horas a vesículas extracelulares de *T. cruzi* (EVs Y). As EVs Y foram removidas e as células foram infectadas durante 14 horas com tripomastigotas de *T. cruzi* Y (0,1 parasitos por macrófago). A liberação de tripomastigotas no sobrenadante foi monitorada diariamente. (BSA, soro albumina bovino; AA, ácido araquidônico, LA, ácido linoleico, OA, ácido oleico; EPA, ácido eicosapentaenóico; DHA, ácido docosahexaenóico). Os resultados expressam a média  $\pm$  erro padrão de um experimento. \*\*\*\* P < 0,0001 (Two-way ANOVA, pós-teste Sidak) – Graph Pad Prism.

Somente ácidos graxos conjugados com BSA



Ácidos graxos conjugados com BSA + EVY





Durante o processo de internalização do *T. cruzi* na célula hospedeira diversas vias podem estar envolvidas, todas elas iniciando com a adesão do parasito a célula e desencadeando sinalizações intracelulares que culminam com a entrada do protozoário (revisado por Barrias *et al.* 2013). Já é bem descrito que durante a suplementação da dieta com PUFA *n*-3 esses ácidos graxos são incorporados nos macrófagos, assim como em outras células, alterando sua estrutura, função e até mesmo fluidez da membrana plasmática (Peterson *et al.*, 1998; Bonilla *et al.*, 2010).

A literatura científica ainda não possui nenhum estudo sobre a interferência da incorporação dos PUFA *n*-3 na membrana das células com as vias de internalização do *T. cruzi*. Experimentos utilizando bloqueadores das vias de *T. cruzi* em associação ao tratamento com ácidos graxos podem representar uma melhor perspectiva para o entendimento dos fenômenos aqui observados.

Estão descritos mecanismos de modulação *in vitro* por ácidos graxos em células infectadas por *Micobacterium tuberculosis* e pelo vírus oncogênico Papilomavírus Humano (HPV). Em modelo de estudo com *M. tuberculosis* foi visto que a incorporação de EPA e DHA pela célula modifica a composição das membranas endossomais, alterando a organização da actina em fagossomos contendo o *M. tuberculosis* e assim prejudicando a formação do fagolisossomo em macrófagos de linhagem J774. Em contrapartida, a incorporação do PUFA *n*-6 ácido araquidônico potencializa a maturação do fagossomo e a eliminação do *M. tuberculosis* nesses macrófago J774 (Sturgill-Koszycki *et al.*, 1994; Anes *et al.*, 2003; Bonilla *et al.*, 2010).

Em um estudo também *in vitro* foi demonstrado que o tratamento com o PUFA *n*-3 DHA de células infectadas pelo vírus HPV ativa o sistema celular de degradação ubiquitina/proteassoma, levando a degradação das proteínas virais E6/E7 e indução de apoptose nas células infectadas. Esse aumento na atividade do sistema ubiquitina/proteassoma via DHA está associado com a superprodução de espécies reativas de oxigênio pelas mitocôndrias. Os autores concluem, nesse caso, que o DHA possui um mecanismo único anticâncer para a quimioproteção e tratamento de tumores associados ao HPV (Jing *et al.*, 2014).

### 5.3 CONCLUSÃO - CAPÍTULO II

Os nossos resultados *in vivo* mostraram que a suplementação dos animais com CO e FO foi capaz de interferir com os efeitos patogênicos das EVs Y, aqui demonstrados pelo aumento da parasitemia e redução da produção de NO por

esplenócitos. Discutimos que, provavelmente via corpos lipídicos, as EVs Y de *T. cruzi* criam um ambiente favorável a produção de PGE<sub>2</sub> durante a infecção, levando a supressão da resposta imunológica ao parasito durante a fase aguda da infecção. Ainda nesse raciocínio, sabendo que a suplementação com FO promove redução de PGE<sub>2</sub>, acreditamos que esse pode ser um dos mecanismos pelo qual as EVs Y não alteram a infecção nos animais suplementados com FO (EVs Y não aumentam a parasitemia nos animais FO) tão pouco interferem com a resposta das células desses animais (EVs Y não diminuem a produção de NO pelos esplenócitos dos animais FO).

Os experimentos *in vitro* utilizando ácidos graxos purificados podem fornecer subsídios para o entendimento da relação entre os PUFAs e os mecanismos de infecção por *T. cruzi*. De fato, o tratamento de macrófagos com diferentes ácidos graxos altera o perfil de infecção do *T. cruzi* nos macrófagos. Para entender melhor esses resultados, o bloqueio de etapas relacionadas com vias de internalização utilizadas pelo *T. cruzi* (por exemplo através do bloqueio do aumento de cálcio intracelular, ativação de PI3K ou de adenilato ciclase) pode ajudar a esclarecer os mecanismos em que as EVs Y atuam para aumentar a internalização de *T. cruzi* nos macrófagos. Apesar do tratamento com EVs Y aumentar a internalização de *T. cruzi* nos macrófagos, mostramos que o tratamento com ácidos graxos não alterou a internalização de *T. cruzi* nessas células. No entanto, a posterior liberação de formas tripomastigotas foi modulada pelos ácidos graxos, sendo liberadas mais formas tripomastigotas nos tratamentos com OA e LA e caindo acentuadamente a liberação dos parasitos nos tratamentos com AA, EPA ou DHA.

Portanto, os experimentos *in vitro* demonstraram que os tipos de ácidos graxos incorporados aos macrófagos alteram diretamente o curso da infecção por *T. cruzi*. Considerando que certos tipos de ácidos graxos são mais presentes no óleo de milho (ácido araquidônico, linoleico e oleico) ou mais presentes no óleo de peixe (ácido eicosapentaenólico e docosahexaenólico) (Lovo-Martins *et al.*, 2017) esses dados podem colaborar com o entendimento das diferenças observadas *in vivo* entre a suplementação oral com óleo de milho ou óleo de peixe, na infecção por *T. cruzi*.

## 6. DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS FUTURAS

O objetivo da presente tese foi investigar os efeitos imunopatológicos das vesículas extracelulares de *Trypanosoma cruzi* (EVs Y), assim como a sua associação com a ação imunomoduladora dos ácidos graxos poli-insaturados na patogênese da doença de Chagas experimental. Inicialmente, avaliamos os efeitos das EVs Y seguindo um protocolo experimental onde primeiro os animais ou os macrófagos tiveram contato com as EVs Y para depois a infecção ser efetuada. Já num segundo momento, decidimos por um delineamento experimental que permitisse primeiro a incorporação e modulação do ambiente pelos PUFAs, seguido do contato do animal ou das células com as EVs Y para enfim a infecção ser realizada.

No desenvolvimento deste trabalho, durante o estudo da associação entre os mecanismos patogênicos desempenhados pelas EVs Y e a suplementação com PUFAs *n*-3, observamos que os resultados encontrados especificamente em relação aos efeitos imunomoduladores das EVs Y ainda não estavam descritos na literatura científica. Diante disso, optamos por dividir os resultados em duas partes. A primeira descreve os efeitos das EVs Y na modulação da resposta imunológica *in vivo* e *in vitro*, enquanto a segunda aborda a relação entre a patogenicidade das EVs Y com os efeitos protetores dos PUFAs *n*-3.

Atualmente, a suplementação oral diária com PUFAs *n*-3 é recomendada pela Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção de Aterosclerose, atualizada em 2017 pela Sociedade Brasileira de Cardiologia (2 a 4 g ao dia), como um complemento importante na prevenção da aterosclerose e pelos seus benefícios cardioprotetores (Faludi *et al.*, 2017). No mesmo sentido, a suplementação com PUFAs *n*-3 é recomendada pelo Colégio Americano de Cardiologia e Associação Americana do Coração como um importante adjuvante no tratamento de insuficiência cardíaca (Yancy *et al.*, 2013).

Apesar da reconhecida relevância da suplementação com PUFAs *n*-3 no tratamento suplementar de doenças cardiovasculares, e considerando os importantes comprometimentos cardíacos que podem acontecer durante a fase crônica do doença de Chagas, somente em 2013 foi lançado o primeiro delineamento para o estudo clínico da suplementação com PUFAs *n*-3 (EPA + DHA) em pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica (Silva *et al.*, 2013). Embora os benefícios da suplementação com PUFAs *n*-3 na resistência a doenças infecciosas ainda ser muito discutido (Anderson e Fritsche, 2002), mostramos recentemente que a suplementação

oral com PUFA *n*-3 está associada a uma melhor resposta imunológica do hospedeiro durante infecção aguda por *T. cruzi*, assim como uma atenuação das alterações clínicas características da fase aguda da infecção (Lovo-Martins *et al.*, 2017). De forma complementar ao trabalho já publicado, os resultados dessa tese contribuem para o entendimento dos mecanismos pelos quais os PUFA *n*-3 favorecem o hospedeiro, com foco especificamente na patogenicidade exercida pelas EVs Y.

Os resultados do teste clínico lançado em 2013 foram publicados por Silva *et al.* (2017), abordando os efeitos dos PUFA *n*-3 sobre perfil lipídico e marcadores inflamatórios dos pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica. Após 8 semanas de suplementação diária com PUFA *n*-3 os pacientes apresentaram redução dos triglicérides séricos e tiveram a redução da citocina IL-10 atenuada, em relação aos pacientes que receberam óleo de milho (utilizado como placebo). Apesar da grande adesão dos pacientes ao tratamento, os autores discutem que o tempo relativamente curto do estudo não permitiu o acompanhamento da evolução clínica dos pacientes, assim como os resultados podem não ter sido tão expressivos pela falta de um grupo controle saudável e pela dificuldade de monitorar a atividade física de cada paciente, o que pode interferir sobre a interpretação dos resultados.

Apesar da importância dos testes clínicos em pacientes, os resultados de experimentos em modelos animais e em culturas de células, como os desenvolvidos nessa tese, permitem uma complementação e melhor compreensão dos efeitos e mecanismos de ação da suplementação com PUFA *n*-3, fornecendo subsídios científicos para justificar e tornar mais seguro os protocolos de aplicação clínica. Através dos testes experimentais é possível separar cada evento analisado (tratamento com PUFA, tratamento com EVs Y e infecção), sempre acompanhados dos controles, permitindo avaliar e discutir os mecanismos envolvidos em cada etapa. Contudo, sabemos que no curso da infecção natural esses eventos se sobrepõem, ou seja, o paciente não entra em contato com as EVs Y para depois ser infectado, nem inicia a suplementação com óleo de peixe estrategicamente antes de uma infecção. Reconhecendo essas limitações, ainda assim acreditamos que o trabalho fornece importantes subsídios para o entendimento dessa relação.

Analisando os resultados dos ensaios que relacionam os efeitos das EVs Y nos animais tratados com PUFA *n*-3, vemos que as modulações da resposta imunológica exercida pelas EVs Y a favor do parasito não acontecem quando os animais são tratados com óleo de peixe, assim como a infecção não progride em

macrófagos tratados *in vitro* com ácido araquidônico (AA, PUFA *n*-6), ácido docosahexaenóico (DHA, PUFA *n*-3) ou ácido eicosapentaenóico (EPA, PUFA *n*-3).

Nesse contexto, torna-se imprescindível a análise da produção de citocinas e mediadores lipídicos nos animais tratados com PUFA *n*-3 e desafiados com EVs Y antes da infecção. Já *in vitro*, ensaios utilizando bloqueadores de diferentes vias de internalização do *T. cruzi* poderão indicar quais mecanismos estão envolvidos com a internalização e infecção do *T. cruzi* nas células do hospedeiro suplementadas com PUFA *n*-3 e submetidas aos efeitos das EVs Y.

A ingestão diária de PUFA *n*-3 diminui a quantidade de ácido araquidônico (AA) nos fosfolípidios de membrana das células envolvidas com a inflamação, com consequente aumento da incorporação de DHA e EPA. Dessa forma, diminuindo os eicosanóides produzidos a partir do AA a princípio pelo simples fato de menores quantidade de AA estarem disponíveis como substrato para as enzimas ciclo-oxigenase (COX) e lipo-oxigenase (LOX), mas também pela diminuição da ativação das enzimas COX e LOX (Yaqoob *et al.*, 2000; Calder, 2015b).

Uma vez que os ácidos graxos EPA e DHA são incorporados à membrana plasmática, ao serem metabolizados pela enzima COX dão origem a prostaglandinas (PG) e tromboxanos (TX) da série 3, e quando metabolizados pela enzima LOX dão origem a leucotrienos (LT) da série 5. Esses mediadores inflamatórios possuem menor potencial inflamatório em relação aos eicosanóides produzidos a partir do ácido araquidônico, como prostaglandinas e tromboxanos da série 2 e leucotrienos da série 4 (Chapkin *et al.*, 1991; Bagga *et al.*, 2003; Calder, 2013).

Durante a infecção por *T. cruzi*, a produção de eicosanóides representa um importante ponto na regulação entre resposta imunológica do hospedeiro e a eficiência da infecção. A infecção aguda por *T. cruzi* em modelos murinos caracteriza-se por lesões cardíacas acompanhadas de altos níveis de PGE<sub>2</sub> (Abdalla *et al.*, 2008). Tanto a PGE<sub>2</sub>, como o seu receptor EP-2, estão envolvidos com a inflamação e infiltrado inflamatório cardíaco durante a infecção aguda por *T. cruzi* (Guerrero *et al.*, 2015), assim como os leucotrienos (Pavanelli *et al.*, 2010), que são importantes para a produção local de NO e controle do parasitismo cardíaco (Panis *et al.*, 2011). Adicionalmente, os níveis de PGE<sub>2</sub> (Celentano *et al.*, 1995), PGF<sub>2α</sub>, TBX<sub>2</sub> e 6-oxo-PGF<sub>1α</sub> plasmáticos estão aumentados em modelos murinos de infecção aguda (Cardoni e Antunez, 2004). Além dos efeitos cardíacos, as prostaglandinas estão associadas à imunossupressão dos animais infectados, com redução da proliferação

dos linfócitos, dos níveis de TNF- $\alpha$  e das funções microbicidas dos macrófagos (Pinge-Filho *et al.*, 1999; Michelin *et al.*, 2005).

Em ensaios *in vitro* já foi mostrado que a fagocitose de fragmentos celulares apoptóticos por macrófagos durante a infecção por *T. cruzi* potencializa a liberação de PGE<sub>2</sub> e TGF- $\beta$  por essas células, conseqüentemente diminuindo o NO e permitindo que o parasito sobreviva e replique na célula hospedeira (Freire-De-Lima *et al.*, 2000). Também a inibição farmacológica da enzima COX com aspirina em macrófagos diminuí a internalização de tripomastigotas nessas células, com aumento da interleucina-1 $\beta$  (IL1- $\beta$ ), de óxido nítrico e de lipoxinas (Malvezi *et al.*, 2014). Adicionalmente, a PGE<sub>2</sub> desencadeia vias de sinalização capazes de instantaneamente inibirem a ativação do inflamassoma NLRP3 (Sokolowska *et al.*, 2015). Isso pode ser relevante no contexto de infecção por *T. cruzi*, uma vez que a ativação do complexo inflamassoma NLRP3 e caspase-1 é importante para o controle do parasito na fase aguda da infecção, com ativação da capacidade tripanocida de macrófagos e produção de NO (Goncalves *et al.*, 2013).

Contudo, apesar da presença da PGE<sub>2</sub> ser importante para o parasito no início da infecção, o bloqueio farmacológico *in vivo* das enzimas COX durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi* acarreta níveis mais altos de parasitemia e menor sobrevida dos animais (Sterin-Borda *et al.*, 1996; Mukherjee *et al.*, 2013), assim como maior parasitismo cardíaco (Hideko Tatakihara *et al.*, 2008). No entanto, o bloqueio da COX com aspirina já na fase crônica (60 dias após a infecção) não ocasiona aumento da parasitemia ou mortalidade, mas está associado a melhora da fração ejetora cardíaca (Mukherjee *et al.*, 2013).

Confirmando a importância da síntese de mediadores lipídicos da inflamação na infecção por *T. cruzi* está o fato do próprio parasito sintetizar prostaglandinas e tromboxanos (Machado *et al.*, 2011). Estágios infectivos do *T. cruzi* apresentam a enzima fosfolipase A-1 (Belaunzaran *et al.*, 2007), importante para liberação de ácidos graxos (como o AA) das membranas e para o início da síntese dos eicosanóides. A partir do AA, o *T. cruzi* sintetiza preferencialmente TXA<sub>2</sub>, além de pequenas quantidades de PGE<sub>2 $\alpha$</sub>  (Ashton *et al.*, 2007). Durante a infecção aguda, o TXA<sub>2</sub> produzido pelo parasito atua no endotélio vascular criando um fenótipo inflamatório, com aumento da expressão de moléculas de adesão, além de participar diretamente do controle da parasitemia e sobrevida do hospedeiro. A ausência do receptor para TXA<sub>2</sub> em células do hospedeiro infectadas resulta em grande parasitismo celular, em comparação com células que possuem o receptor. Isso indica

que o *T. cruzi* possui um mecanismo auto regulador da sua proliferação, via TXA<sub>2</sub> (Ashton *et al.*, 2007). A ação tanto do TXA<sub>2</sub> produzido pelo parasito, como da PGE<sub>2</sub> produzida pelo hospedeiro, criam um ambiente de imunomodulação que favorece a sobrevivência do hospedeiro, fator indispensável para a sobrevivência também do parasito e manutenção da fase crônica da infecção (Sterin-Borda *et al.*, 1996; Ashton *et al.*, 2007).

No trabalho publicado recentemente, já citado acima, a suplementação com óleo de peixe diminuiu a produção de PGE<sub>2</sub> em camundongos infectados por *T. cruzi* (Lovo-Martins *et al.*, 2017). Além disso, como exposto anteriormente, está descrito na literatura que a suplementação com PUFA's *n*-3 promove a produção de TX da série 3, em detrimento da produção de TX da série 2, um mediador lipídico descrito como importante para a regulação e continuidade da infecção por *T. cruzi* (Ashton *et al.*, 2007). A utilização de PUFA's *n*-3 para modular a produção dos eicosanóides apresenta importantes diferenças quando comparado a utilização de inibidores farmacológicos das isoformas da COX. Enquanto o bloqueio farmacológico resulta em diminuição acentuada na produção dos eicosanóides, os PUFA's *n*-3 atuam promovendo uma mudança na classe dos eicosanóides produzidos, sem, no entanto, abolir completamente aqueles produzidos a partir do AA. Além disso, a partir dos PUFA's *n*-3 DHA e EPA são produzidos resolvinas, maresinas e protectinas, mediadores lipídicos que atuam na resolução da inflamação, controlando o excesso de lesão tecidual decorrente da ativação exacerbada da resposta imunológica (Calder, 2015b).

Portanto, a elucidação dos mecanismos envolvidos com os efeitos protetores da suplementação alimentar com PUFA's *n*-3 sobre a infecção por *T. cruzi*, assim como a confirmação das hipóteses aqui levantadas, constituem importantes aspectos a serem investigados. Considerando os resultados apresentados nessa tese, assim como todos os pontos levantados da literatura científica, fica cada vez mais coerente afirmar que a modulação exercida pela suplementação com PUFA's *n*-3 de fato favorece o hospedeiro e pode representar uma perspectiva para o tratamento complementar de pacientes acometidos pela doença de Chagas.

## 7. CONCLUSÃO FINAL

O presente estudo mostrou novos mecanismos pelos quais as EVs Y exercem efeitos imunomoduladores no hospedeiro murino infectado por *T. cruzi*, diminuindo a responsividade das células do sistema imunológico, induzindo a formação de corpos lipídicos em macrófagos assim como a produção de PGE<sub>2</sub> e, como resultado dessa modulação, favorecendo o parasito durante a infecção de hospedeiros mamíferos. Além disso, mostramos pela primeira vez que a suplementação dos animais com ácidos graxos interfere com os efeitos imunopatológicos induzidos pelas EVs Y, favorecendo a resposta do hospedeiro à infecção. Os estudos *in vitro* utilizando macrófagos e ácidos graxos purificados indicam diferentes efeitos para cada ácido graxo: enquanto o ácido linoleico e ácido oleico potencializam a infecção e até mesmo os efeitos das EVs Y, os ácidos araquidônico, eicosapentaenóico e docosahexaenóico quase que anularam a replicação do parasito, mesmo após o tratamento com EVs Y. Dessa forma, estes resultados contribuem para uma melhor compreensão da complexa relação parasito-hospedeiro que ocorre na doença de Chagas, assim como fornecem novos subsídios para o entendimento da regulação da infecção pelo consumo de diferentes ácidos graxos.



## 8. REFERÊNCIAS

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. **Exp Parasitol**, v. 118, n. 4, p. 514-21, Apr 2008. ISSN 0014-4894 (Print).

ABELS, E. R.; BREAKEFIELD, X. O. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. **Cell Mol Neurobiol**, v. 36, n. 3, p. 301-12, Apr 2016. ISSN 0272-4340.

ABRAHAMSOHN, I. A. Cytokines in innate and acquired immunity to *Trypanosoma cruzi* infection. **Braz J Med Biol Res**, v. 31, n. 1, p. 117-21, Jan 1998. ISSN 0100-879X (Print).

ABRAHAMSOHN, I. A.; COFFMAN, R. L. Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, v. 155, n. 8, p. 3955-63, Oct 15 1995. ISSN 0022-1767 (Print).

ADELIZZI, R. A. COX-1 and COX-2 in health and disease. **J Am Osteopath Assoc**, v. 99, n. 11 Suppl, p. S7-12, Nov 1999. ISSN 0098-6151 (Print).

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, 03/02 2013. ISSN 0167-594X

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. 12, n. 10, p. 784-9, Sep 2010. ISSN 1286-4579.

ALIBERTI, J. C.; CARDOSO, M. A.; MARTINS, G. A.; GAZZINELLI, R. T.; VIEIRA, L. Q.; SILVA, J. S. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infect Immun**, v. 64, n. 6, p. 1961-7, Jun 1996. ISSN 0019-9567 (Print).

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 microbistatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. **Infect Immun**, v. 67, n. 9, p. 4819-26, Sep 1999. ISSN 0019-9567 (Print).

ALVAREZ, Y.; VALERA, I.; MUNICIO, C.; HUGO, E.; PADRON, F.; BLANCO, L.; RODRIGUEZ, M.; FERNANDEZ, N.; CRESPO, M. S. Eicosanoids in the innate immune response: TLR and non-TLR routes. **Mediators Inflamm**, v. 2010, p. 1-14, 2010. ISSN 0962-9351.

AMBROZOVA, G.; PEKAROVA, M.; LOJEK, A. Effect of polyunsaturated fatty acids on the reactive oxygen and nitrogen species production by raw 264.7 macrophages. **Eur J Nutr**, v. 49, n. 3, p. 133-9, Apr 2010. ISSN 1436-6207.

- ANDERSON, M.; FRITSCHKE, K. L. (n-3) Fatty acids and infectious disease resistance. **J Nutr**, v. 132, n. 12, p. 3566-76, Dec 2002. ISSN 0022-3166 (Print).
- ANDRADE, D. V.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Acute chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 7, p. e3010, 2014. ISSN 1935-2727.
- ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. **J Exp Med**, v. 200, n. 9, p. 1135-43, Nov 01 2004. ISSN 0022-1007 (Print).
- ANDREU, Z.; YANEZ-MO, M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. **Front Immunol**, v. 5, p. 442, 2014. ISSN 1664-3224 (Print).
- ANDREWS, N. W.; ABRAMS, C. K.; SLATIN, S. L.; GRIFFITHS, G. A T. cruzi-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. **Cell**, v. 61, n. 7, p. 1277-87, Jun 29 1990. ISSN 0092-8674 (Print).
- ANES, E.; KUHNEL, M. P.; BOS, E.; MONIZ-PEREIRA, J.; HABERMANN, A.; GRIFFITHS, G. Selected lipids activate phagosome actin assembly and maturation resulting in killing of pathogenic mycobacteria. **Nat Cell Biol**, v. 5, n. 9, p. 793-802, Sep 2003. ISSN 1465-7392 (Print).
- ANGHEBEN, A.; ANSEMI, M.; GOBBI, F.; MAROCCO, S.; MONTEIRO, G.; BUONFRATE, D.; TAIS, S.; TALAMO, M.; ZAVARISE, G.; STROHMEYER, M.; BARTALESI, F.; MANTELLA, A.; DI TOMMASO, M.; AIELLO, K.; VENERUSO, G.; GRAZIANI, G.; FERRARI, M.; SPREAFICO, I.; BONIFACIO, E.; GAIERA, G.; LANZAFAME, M.; MASCARELLO, M.; CANCRINI, G.; ALBAJAR-VINAS, P.; BISOFFI, Z.; BARTOLONI, A. Chagas disease in Italy: breaking an epidemiological silence. **Euro Surveill**, v. 16, n. 37, Sep 15 2011. ISSN 1025-496x.
- ARALDI, E.; KRAMER-ALBERS, E. M.; HOEN, E. N.; PEINADO, H.; PSONKA-ANTONCZYK, K. M.; RAO, P.; VAN NIEL, G.; YANEZ-MO, M.; NAZARENKO, I. International Society for Extracellular Vesicles: first annual meeting, April 17-21, 2012: ISEV-2012. **J Extracell Vesicles**, v. 1, p. 19995, 2012. ISSN 2001-3078 (Print).
- ARAÚJO-JORGE, T. C. **Doença de Chagas - Manual para experimentação animal**. 20. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2000. 368 ISBN 85-85676-75-2.
- ARAÚJO-JORGE, T. C. D. The biology of *Trypanosoma cruzi*-macrophage interaction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, p. 441-462, 1989. ISSN 0074-0276. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02761989000400001&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761989000400001&nrm=iso)>.
- 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. **Int J Environ Res Public Health**, v. 2, n. 1, p. 123-31, Apr 2005. ISSN 1661-7827 (Print).
- ARONOFF, D. M.; CANETTI, C.; PETERS-GOLDEN, M. Prostaglandin E2 inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in intracellular cyclic AMP. **J Immunol**, v. 173, n. 1, p. 559-65, Jul 01 2004. ISSN 0022-1767 (Print).

ASHTON, A. W.; MUKHERJEE, S.; NAGAJYOTHI, F. N.; HUANG, H.; BRAUNSTEIN, V. L.; DESRUISSEAU, M. S.; FACTOR, S. M.; LOPEZ, L.; BERMAN, J. W.; WITTNER, M.; SCHERER, P. E.; CAPRA, V.; COFFMAN, T. M.; SERHAN, C. N.; GOTLINGER, K.; WU, K. K.; WEISS, L. M.; TANOWITZ, H. B. Thromboxane A2 is a key regulator of pathogenesis during *Trypanosoma cruzi* infection. **J Exp Med**, v. 204, n. 4, p. 929-40, Apr 16 2007. ISSN 0022-1007 (Print).

AUFDERHEIDE, A. C.; SALO, W.; MADDEN, M.; STREITZ, J.; BUIKSTRA, J.; GUHL, F.; ARRIAZA, B.; RENIER, C.; WITTMERS, L. E., JR.; FORNACIARI, G.; ALLISON, M. A 9,000-year record of Chagas' disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 7, p. 2034-9, Feb 17 2004. ISSN 0027-8424 (Print).

BAFICA, A.; SANTIAGO, H. C.; GOLDSZMID, R.; ROPERT, C.; GAZZINELLI, R. T.; SHER, A. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, v. 177, n. 6, p. 3515-9, Sep 15 2006. ISSN 0022-1767 (Print).

BAGGA, D.; WANG, L.; FARIAS-EISNER, R.; GLASPY, J. A.; REDDY, S. T. Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 4, p. 1751-6, Feb 18 2003. ISSN 0027-8424 (Print).

BARBOSA, H. S.; DE MEIRELLES MDE, 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*. **Parasitol Res**, v. 78, n. 5, p. 404-9, 1992. ISSN 0932-0113 (Print).

BARBOSA, H. S.; MEIRELLES, M. N. Evidence of participation of cytoskeleton of heart muscle cells during the invasion of *Trypanosoma cruzi*. **Cell Struct Funct**, v. 20, n. 4, p. 275-84, Aug 1995. ISSN 0386-7196 (Print)..

BARRIAS, E. S.; DE CARVALHO, T. M.; DE SOUZA, W. *Trypanosoma cruzi*: Entry into Mammalian Host Cells and Parasitophorous Vacuole Formation. **Front Immunol**, v. 4, p. 186, 2013. ISSN 1664-3224 (Print).

BARRIAS, E. S.; DUTRA, J. M.; DE SOUZA, W.; CARVALHO, T. M. Participation of macrophage membrane rafts in *Trypanosoma cruzi* invasion process. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 363, n. 3, p. 828-34, Nov 23 2007. ISSN 0006-291X (Print)..

BARRIAS, E. S.; REIGNAULT, L. C.; DE SOUZA, W.; CARVALHO, T. M. Dynasore, a dynamin inhibitor, inhibits *Trypanosoma cruzi* entry into peritoneal macrophages. **PLoS One**, v. 5, n. 1, p. e7764, Jan 20 2010. ISSN 1932-6203.

BARRIAS, E. S.; REIGNAULT, L. C.; DE SOUZA, W.; CARVALHO, T. M. *Trypanosoma cruzi* uses macropinocytosis as an additional entry pathway into mammalian host cell. **Microbes Infect**, v. 14, n. 14, p. 1340-51, Nov 2012. ISSN 1286-4579.

BARTENEVA, N. S.; MALTSEV, N.; VOROBYEV, I. A. Microvesicles and intercellular communication in the context of parasitism. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 3, p. 49, 2013. ISSN 2235-2988 (Print).

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. **J Proteome Res**, v. 12, n. 2, p. 883-97, Feb 01 2013. ISSN 1535-3893.

BAYER-SANTOS, E.; LIMA, F. M.; RUIZ, J. C.; ALMEIDA, I. C.; DA SILVEIRA, J. F. Characterization of the small RNA content of *Trypanosoma cruzi* extracellular vesicles. **Mol Biochem Parasitol**, v. 193, n. 2, p. 71-4, Feb 2014. ISSN 0166-6851.

BELAUNZARAN, M. L.; WAINSELBAUM, M. J.; LAMMEL, E. M.; GIMENEZ, G.; ALOISE, M. M.; FLORIN-CHRISTENSEN, J.; ISOLA, E. L. Phospholipase A1 from *Trypanosoma cruzi* infective stages generates lipid messengers that activate host cell protein kinase c. **Parasitology**, v. 134, n. Pt 4, p. 491-502, Apr 2007. ISSN 0031-1820 (Print).

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. **N Engl J Med**, v. 334, n. 24, p. 1557-60, Jun 13 1996. ISSN 0028-4793 (Print).

BERMEJO, D. A.; AMEZCUA VESELY, M. C.; KHAN, M.; ACOSTA RODRIGUEZ, E. V.; MONTES, C. L.; MERINO, M. C.; TOELLNER, K. M.; MOHR, E.; TAYLOR, D.; CUNNINGHAM, A. F.; GRUPPI, A. *Trypanosoma cruzi* infection induces a massive extrafollicular and follicular splenic B-cell response which is a high source of non-parasite-specific antibodies. **Immunology**, v. 132, n. 1, p. 123-33, Jan 2011. ISSN 0019-2805.

BERN, C. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. **N Engl J Med**, v. 364, n. 26, p. 2527-34, Jun 30 2011. ISSN 0028-4793.

BERN, C. Chagas' Disease. **N Engl J Med**, v. 373, n. 5, p. 456-66, Jul 30 2015. ISSN 0028-4793.

BERN, C.; MARTIN, D. L.; GILMAN, R. H. Acute and congenital Chagas disease. **Adv Parasitol**, v. 75, p. 19-47, 2011. ISSN 0065-308x.

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.; SALVATELLA, R.; MOORE, A. C. Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: a systematic review. **Jama**, v. 298, n. 18, p. 2171-81, Nov 14 2007. ISSN 0098-7484.

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. 213-7, Sep 07 2002. ISSN 1043-4666 (Print).

BLOK, W. L.; VOGELS, M. T.; CURFS, J. H.; ELING, W. M.; BUURMAN, W. A.; VAN DER MEER, J. W. Dietary fish-oil supplementation in experimental gram-negative infection and in cerebral malaria in mice. **J Infect Dis**, v. 165, n. 5, p. 898-903, May 1992. ISSN 0022-1899 (Print).

BLOODSWORTH, A.; O'DONNELL, V. B.; FREEMAN, B. A. Nitric oxide regulation of free radical- and enzyme-mediated lipid and lipoprotein oxidation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 20, n. 7, p. 1707-15, Jul 2000. ISSN 1079-5642 (Print).

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. ISSN 1932-6203.

BONNEY, K. M.; ENGMAN, D. M. Autoimmune pathogenesis of Chagas heart disease: looking back, looking ahead. **Am J Pathol**, v. 185, n. 6, p. 1537-47, Jun 2015. ISSN 0002-9440.

BORGES, M. M.; KLOETZEL, J. K.; ANDRADE, H. F., JR.; TADOKORO, C. E.; PINGE-FILHO, P.; ABRAHAMSOHN, I. Prostaglandin and nitric oxide regulate TNF-alpha production during *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunol Lett**, v. 63, n. 1, p. 1-8, Aug 1998. ISSN 0165-2478 (Print).

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 4, p. 389-96, Nov-Dec 1962. ISSN 0036-4665 (Print).

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annu Rev Microbiol**, v. 27, p. 347-82, 1973. ISSN 0066-4227 (Print).

BURLEIGH, B. A.; CALER, E. V.; WEBSTER, P.; ANDREWS, N. W. A cytosolic serine endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* is required for the generation of Ca<sup>2+</sup> signaling in mammalian cells. **J Cell Biol**, v. 136, n. 3, p. 609-20, Feb 10 1997. ISSN 0021-9525 (Print).

CALDER, P. C. Long-chain fatty acids and inflammation. **Proc Nutr Soc**, v. 71, n. 2, p. 284-9, May 2012. ISSN 0029-6651.

CALDER, P. C. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? **Br J Clin Pharmacol**, v. 75, n. 3, p. 645-62, Mar 2013. ISSN 0306-5251.

CALDER, P. C. Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v. 39, n. 1 Suppl, p. 18s-32s, Sep 2015a. ISSN 0148-6071 (Print).

CALDER, P. C. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. **Biochim Biophys Acta**, v. 1851, n. 4, p. 469-84, Apr 2015b. ISSN 0006-3002 (Print).

CALDER, P. C. Very long-chain n-3 fatty acids and human health: fact, fiction and the future. **Proc Nutr Soc**, v. 77, n. 1, p. 52-72, Feb 2018. ISSN 0029-6651.

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. **Biochem J**, v. 300 ( Pt 2), p. 509-18, Jun 01 1994. ISSN 0264-6021 (Print).

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. **J Cell Physiol**, v. 224, n. 1, p. 144-51, Jul 2010. ISSN 0021-9541.

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. **Scand J Immunol**, v. 55, n. 1, p. 96-104, Jan 2002. ISSN 0300-9475 (Print).

CARDONI, R. L.; ANTUNEZ, M. I. Circulating levels of cyclooxygenase metabolites in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **Mediators Inflamm**, v. 13, n. 4, p. 235-40, Aug 2004. ISSN 0962-9351 (Print).

CARDOSO, M. S.; REIS-CUNHA, J. L.; BARTHOLOMEU, D. C. Evasion of the Immune Response by *Trypanosoma cruzi* during Acute Infection. **Front Immunol**, v. 6, p. 659, 2015. ISSN 1664-3224 (Print).

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. **Br J Nutr**, v. 113, n. 2, p. 191-9, Jan 28 2015. ISSN 0007-1145.

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*. **Biochim Biophys Acta**, v. 1037, n. 2, p. 186-91, Feb 09 1990. ISSN 0006-3002 (Print).

CELENTANO, A. M.; GORELIK, G.; SOLANA, M. E.; STERIN-BORDA, L.; BORDA, E.; GONZALEZ CAPPA, S. M. PGE2 involvement in experimental infection with *Trypanosoma cruzi* subpopulations. **Prostaglandins**, v. 49, n. 3, p. 141-53, Mar 1995. ISSN 0090-6980 (Print).

CESTARI, I.; ANSA-ADDO, E.; DEOLINDO, P.; INAL, J. M.; RAMIREZ, M. I. *Trypanosoma cruzi* immune evasion mediated by host cell-derived microvesicles. **J Immunol**, v. 188, n. 4, p. 1942-52, Feb 15 2012. ISSN 0022-1767.

CESTARI, I.; EVANS-OSES, I.; SCHLAPBACH, L. J.; DE MESSIAS-REASON, I.; RAMIREZ, M. I. Mechanisms of complement lectin pathway activation and resistance by trypanosomatid parasites. **Mol Immunol**, v. 53, n. 4, p. 328-34, Apr 2013. ISSN 0161-5890.

CESTARI IDOS, S.; EVANS-OSES, I.; FREITAS, J. C.; INAL, J. M.; RAMIREZ, M. I. Complement C2 receptor inhibitor trispanning confers an increased ability to resist complement-mediated lysis in *Trypanosoma cruzi*. **J Infect Dis**, v. 198, n. 9, p. 1276-83, Nov 01 2008. ISSN 0022-1899 (Print).

CHAGAS, C. Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiolojico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1909. ISSN 0074-0276. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02761909000200008&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761909000200008&nrm=iso)>.

CHAPKIN, R. S.; AKOH, C. C.; MILLER, C. C. Influence of dietary n-3 fatty acids on macrophage glycerophospholipid molecular species and peptidoleukotriene synthesis. **J Lipid Res**, v. 32, n. 7, p. 1205-13, Jul 1991. ISSN 0022-2275 (Print).

CLEMENTE, T. M.; CORTEZ, C.; NOVAES ADA, S.; YOSHIDA, N. Surface Molecules Released by *Trypanosoma cruzi* Metacyclic Forms Downregulate Host Cell Invasion. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 8, p. e0004883, Aug 2016. ISSN 1935-2727.

COLASANTI, M.; GRADONI, L.; MATTU, M.; PERSICHINI, T.; SALVATI, L.; VENTURINI, G.; ASCENZI, P. Molecular bases for the anti-parasitic effect of NO (Review). **Int J Mol Med**, v. 9, n. 2, p. 131-4, Feb 2002. ISSN 1107-3756 (Print).

COLASANTI, M.; PERSICHINI, T.; MENEGAZZI, M.; MARIOTTO, S.; GIORDANO, E.; CALDARERA, C. M.; SOGOS, V.; LAURO, G. M.; SUZUKI, H. Induction of nitric oxide synthase mRNA expression. Suppression by exogenous nitric oxide. **J Biol Chem**, v. 270, n. 45, p. 26731-3, Nov 10 1995. ISSN 0021-9258 (Print).

COLASANTI, M.; SUZUKI, H. The dual personality of NO. **Trends Pharmacol Sci**, v. 21, n. 7, p. 249-52, Jul 2000. ISSN 0165-6147 (Print).

COSTA, V. M.; TORRES, K. C.; MENDONCA, R. Z.; GRESSER, I.; GOLLOB, K. J.; ABRAHAMSOHN, I. A. Type I IFNs stimulate nitric oxide production and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, v. 177, n. 5, p. 3193-200, Sep 01 2006. ISSN 0022-1767 (Print).

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 31-40, 2009. ISSN 0074-0276. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02762009000900006&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762009000900006&nrm=iso) >.

CROSS, G. A.; TAKLE, G. B. The surface trans-sialidase family of *Trypanosoma cruzi*. **Annu Rev Microbiol**, v. 47, p. 385-411, 1993. ISSN 0066-4227 (Print).

CUNHA-NETO, E.; KALIL, J. Heart-infiltrating and peripheral T cells in the pathogenesis of human Chagas' disease cardiomyopathy. **Autoimmunity**, v. 34, n. 3, p. 187-92, 2001. ISSN 0891-6934 (Print).

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. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 252-8, Jul 2009. ISSN 0074-0276.

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. **Exp Parasitol**, v. 70, n. 2, p. 164-74, Feb 1990. ISSN 0014-4894 (Print).

D'AVILA, H.; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; ROQUE, N. R.; TEIXEIRA, L.; BARJA-FIDALGO, C.; SILVA, A. R.; MELO, R. C.; DOSREIS, G. A.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; BOZZA, P. T. Host cell lipid bodies triggered by *Trypanosoma cruzi* infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with prostaglandin E(2) generation and increased parasite growth. **J Infect Dis**, v. 204, n. 6, p. 951-61, Sep 15 2011. ISSN 0022-1899.

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 Negl Trop Dis**, v. 4, n. 2, p. e604, Feb 16 2010. ISSN 1935-2727.

DA SILVEIRA, J. F.; ABRAHAMSOHN, P. A.; COLLI, W. Plasma membrane vesicles isolated from epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. **Biochim Biophys Acta**, v. 550, n. 2, p. 222-32, Jan 19 1979. ISSN 0006-3002 (Print).

DE CATERINA, R.; CYBULSKY, M. I.; CLINTON, S. K.; GIMBRONE, M. A., JR.; LIBBY, P. The omega-3 fatty acid docosahexaenoate reduces cytokine-induced expression of proatherogenic and proinflammatory proteins in human endothelial cells. **Arterioscler Thromb**, v. 14, n. 11, p. 1829-36, Nov 1994. ISSN 1049-8834 (Print).

DE LIMA, T. M.; DE SA LIMA, L.; SCAVONE, C.; CURI, R. Fatty acid control of nitric oxide production by macrophages. **FEBS Lett**, v. 580, n. 13, p. 3287-95, May 29 2006. ISSN 0014-5793 (Print).

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. **Sci Rep**, v. 6, p. 27293, Jun 8 2016. ISSN 2045-2322.

DE SOUZA, W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Int Rev Cytol**, v. 86, p. 197-283, 1984. ISSN 0074-7696 (Print).

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. **Int J Cell Biol**, v. 2010, 2010. ISSN 1687-8876.

DEOLINDO, P.; EVANS-OSES, I.; RAMIREZ, M. I. Microvesicles and exosomes as vehicles between protozoan and host cell communication. **Biochem Soc Trans**, v. 41, n. 1, p. 252-7, Feb 01 2013. ISSN 0300-5127.

DEVERA, R.; FERNANDES, O.; COURA, J. R. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after *in vitro* culturing and mice infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 1-12, 2003. ISSN 0074-0276. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02762003000100001&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762003000100001&nrm=iso) >.

DRAGOVIC, R. A.; GARDINER, C.; BROOKS, A. S.; TANNETTA, D. S.; FERGUSON, D. J.; HOLE, P.; CARR, B.; REDMAN, C. W.; HARRIS, A. L.; DOBSON, P. J.; HARRISON, P.; SARGENT, I. L. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. **Nanomedicine**, v. 7, n. 6, p. 780-8, Dec 2011. ISSN 1549-9634.

DUTRA, W. O.; MENEZES, C. A.; MAGALHAES, L. M.; GOLLOB, K. J. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. **Parasite Immunol**, v. 36, n. 8, p. 377-87, Aug 2014. ISSN 0141-9838.



DVORAK, J. A.; HYDE, T. P. *Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells *in vitro*. 1. Individual interactions at the cellular and subcellular levels. **Exp Parasitol**, v. 34, n. 2, p. 268-83, Oct 1973. ISSN 0014-4894 (Print).

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. **J Immunol Methods**, v. 184, n. 2, p. 281-3, Aug 18 1995. ISSN 0022-1759 (Print).

FABER, J.; BERKHOUT, M.; VOS, A. P.; SIJZEN, J. W.; CALDER, P. C.; GARSSEN, 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. **J Nutr**, v. 141, n. 5, p. 964-70, May 2011. ISSN 0022-3166.

FALUDI, A. A.; IZAR, M. C. O.; SARAIVA, J. F. K.; CHACRA, A. P. M.; BIANCO, H. T.; AFIUNE, A. N.; BERTOLAMI, A.; PEREIRA, A. C.; LOTTENBERG, A. M.; SPOSITO, A. C.; CHAGAS, A. C. P.; CASELLA, A. F.; SIMAO, A. F.; ALENCAR, A. C. F.; CARAMELLI, B.; MAGALHAES, C. C.; NEGRAO, C. E.; FERREIRA, C.; SCHERR, C.; FEIO, C. M. A.; KOVACS, C.; ARAUJO, D. B.; MAGNONI, D.; CALDERARO, D.; GUALANDRO, D. M.; MELLO, E. P. J.; ALEXANDRE, E. R. G.; SATO, E. I.; MORIGUCHI, E. H.; RACHED, F. H.; SANTOS, F. C. D.; CESENA, F. H. Y.; FONSECA, F. A. H.; FONSECA, H.; XAVIER, H. T.; MOTA, I. C. P.; GIULIANO, I. C. B.; ISSA, J. S.; DIAMENT, J.; PESQUERO, J. B.; SANTOS, J. E. D.; FARIA, J. R. N.; MELO, J. X. F.; KATO, J. T.; TORRES, K. P.; BERTOLAMI, M. C.; ASSAD, M. H. V.; MINAME, M. H.; SCARTEZINI, M.; FORTI, N. A.; COELHO, O. R.; MARANHÃO, R. C.; SANTOS, R. D. D. F.; ALVES, R. J.; CASSANI, R. L.; BETTI, R. T. B.; CARVALHO, T.; MARTINEZ, T.; GIRALDEZ, V. Z. R.; SALGADO, W. F. **Arq Bras Cardiol**, v. 109, n. 2 Supl 1, p. 1-76, Jul 2017. ISSN 0066-782x.

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 Leukot Essent Fatty Acids**, v. 89, n. 6, p. 379-90, Nov-Dec 2013. ISSN 0952-3278.

FERGUSON, J. F.; MULVEY, C. K.; PATEL, P. N.; SHAH, R. Y.; DOVEIKIS, J.; ZHANG, W.; TABITA-MARTINEZ, J.; TEREMBULA, K.; EIDEN, M.; KOULMAN, A.; GRIFFIN, J. L.; MEHTA, N. N.; SHAH, R.; PROPERT, K. J.; SONG, W. L.; REILLY, M. P. Omega-3 PUFA supplementation and the response to evoked endotoxemia in healthy volunteers. **Mol Nutr Food Res**, v. 58, n. 3, p. 601-13, Mar 2014. ISSN 1613-4125.

FERNANDES, M. C.; ANDREWS, N. W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. **FEMS Microbiol Rev**, v. 36, n. 3, p. 734-47, May 2012. ISSN 0168-6445.

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. **J Exp Med**, v. 208, n. 5, p. 909-21, May 09 2011. ISSN 0022-1007.

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. **Int J Parasitol**, v. 37, n. 13, p. 1431-41, Nov 2007. ISSN 0020-7519 (Print).

FERNANDES, O.; SANTOS, S.; JUNQUEIRA, A.; JANSEN, A.; CUPOLILLO, E.; CAMPBELL, D.; ZINGALES, B.; COURA, J. Populational heterogeneity of Brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the mini-exon and ribosomal spacers. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 195-197, 1999. ISSN 0074-

0276. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02761999000700028&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761999000700028&nrm=iso) >.

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. **Mol Biochem Parasitol**, v. 199, n. 1-2, p. 19-28, Jan-Feb 2015. ISSN 0166-6851.

FERREIRA, V.; VALCK, C.; SANCHEZ, G.; GINGRAS, A.; TZIMA, S.; MOLINA, M. C.; SIM, R.; SCHWAEBLE, W.; FERREIRA, A. The classical activation pathway of the human complement system is specifically inhibited by calreticulin from *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol**, v. 172, n. 5, p. 3042-50, Mar 01 2004. ISSN 0022-1767 (Print).

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. ISSN 0019-2805 (Print).

FITZNER, D.; SCHNAARS, M.; VAN ROSSUM, D.; KRISHNAMOORTHY, G.; DIBAJ, P.; BAKHTI, M.; REGEN, T.; HANISCH, U. K.; SIMONS, M. Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. **J Cell Sci**, v. 124, n. Pt 3, p. 447-58, Feb 01 2011. ISSN 0021-9533.

FORATTINI, O. P. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 14, p. 265-299, 1980. ISSN 0034-8910. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-89101980000300002&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89101980000300002&nrm=iso) >.

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. **J Cell Biol**, v. 111, n. 2, p. 483-93, Aug 1990. ISSN 0021-9525 (Print).

FRASCH, A. C. Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol Today**, v. 16, n. 7, p. 282-6, Jul 2000. ISSN 0169-4758 (Print).

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. ISSN 0028-0836 (Print).

FRITSCHKE, K. Fatty acids as modulators of the immune response. **Annu Rev Nutr**, v. 26, p. 45-73, 2006. ISSN 0199-9885 (Print).

FRITSCHKE, K. Important differences exist in the dose-response relationship between diet and immune cell fatty acids in humans and rodents. **Lipids**, v. 42, n. 11, p. 961-79, Nov 2007. ISSN 0024-4201 (Print).

FRITSCHKE, K. L.; BYRGE, M.; FENG, C. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids from fish oil reduce interleukin-12 and interferon-gamma production in mice. **Immunol Lett**, v. 65, n. 3, p. 167-73, Feb 1999. ISSN 0165-2478 (Print).

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. v. 2014, p. 305239, 2014.

GARCIA-SILVA, M. R.; DAS NEVES, R. F.; CABRERA-CABRERA, F.; SANGUINETTI, J.; MEDEIROS, L. C.; ROBELLO, C.; NAYA, H.; FERNANDEZ-CALERO, T.; SOUTO-PADRON, T.; DE SOUZA, W.; CAYOTA, A. Extracellular vesicles shed by *Trypanosoma cruzi* are linked to small RNA pathways, life cycle regulation, and susceptibility to infection of mammalian cells. **Parasitol Res**, v. 113, n. 1, p. 285-304, Jan 2014. ISSN 0932-0113.

GAZZINELLI, R. T.; DENKERS, E. Y. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 12, p. 895-906, Dec 2006. ISSN 1474-1733 (Print).

GAZZINELLI, R. T.; OSWALD, I. P.; HIENY, S.; JAMES, S. L.; SHER, A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. **Eur J Immunol**, v. 22, n. 10, p. 2501-6, Oct 1992. ISSN 0014-2980 (Print).

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. **J Biol Chem**, v. 274, n. 6, p. 3461-8, Feb 05 1999. ISSN 0021-9258 (Print).

GODFREY, D. G. Influence of dietary cod liver oil upon *Trypanosoma congolense*, *T. cruzi*, *T. vivax* and *T. brucei*. **Exp Parasitol**, v. 7, n. 3, p. 255-68, May 1958. ISSN 0014-4894 (Print).

GOMEZ GARCIA, V.; SANZ SAMPELAYO, M. R.; FERNANDEZ NAVARRO, J. R.; CARMONA LOPEZ, F. D.; GIL EXTREMERA, F.; RODRIGUEZ OSORIO, M. Polyunsaturated fatty acids and parasitism: effect of a diet supplemented with fish oil on the course of rat trichinellosis. **Vet Parasitol**, v. 117, n. 1-2, p. 85-97, Nov 03 2003. ISSN 0304-4017 (Print).

GONCALVES, M. F.; UMEZAWA, E. S.; KATZIN, A. M.; DE SOUZA, W.; ALVES, M. J.; ZINGALES, B.; COLLI, W. *Trypanosoma cruzi*: shedding of surface antigens as membrane vesicles. **Exp Parasitol**, v. 72, n. 1, p. 43-53, Jan 1991. ISSN 0014-4894 (Print).

GONCALVES, V. M.; MATTEUCCI, K. C.; BUZZO, C. L.; MIOLLO, B. H.; FERRANTE, D.; TORRECILHAS, A. C.; RODRIGUES, M. M.; ALVAREZ, J. M.; BORTOLUCI, K. R. NLRP3 controls *Trypanosoma cruzi* infection through a caspase-1-dependent IL-1R-independent NO production. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 10, p. e2469, 2013. ISSN 1935-2727.

GRELLIER, P.; VENDEVILLE, S.; JOYEAU, R.; BASTOS, I. M.; DROBECQ, H.; FRAPPIER, F.; TEIXEIRA, A. R.; SCHREVEL, J.; DAVIOUD-CHARVET, E.; SERGHERAERT, C.; SANTANA, J. M. *Trypanosoma cruzi* prolyl oligopeptidase Tc80 is involved in nonphagocytic mammalian cell invasion by trypomastigotes. **J Biol Chem**, v. 276, n. 50, p. 47078-86, Dec 14 2001. ISSN 0021-9258 (Print).

GRIMBLE, R. F.; HOWELL, W. M.; O'REILLY, G.; TURNER, S. J.; MARKOVIC, O.; HIRRELL, S.; EAST, J. M.; CALDER, P. C. The ability of fish oil to suppress tumor necrosis factor alpha production by peripheral blood mononuclear cells in healthy men is associated with polymorphisms in genes that influence tumor necrosis factor alpha production. **Am J Clin Nutr**, v. 76, n. 2, p. 454-9, Aug 2002. ISSN 0002-9165 (Print).

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 Negl Trop Dis**, v. 9, n. 8, p. e0004025, 2015. ISSN 1935-2727.

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 Negl Trop Dis**, v. 7, n. 6, p. e2291, 2013. ISSN 1935-2727.

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. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 236-45, Jul 2009. ISSN 0074-0276.

HALL, B. F.; WEBSTER, P.; MA, A. K.; JOINER, K. A.; ANDREWS, N. W. Desialylation of lysosomal membrane glycoproteins by *Trypanosoma cruzi*: a role for the surface neuraminidase in facilitating parasite entry into the host cell cytoplasm. **J Exp Med**, v. 176, n. 2, p. 313-25, Aug 01 1992. ISSN 0022-1007 (Print).

HALL, B. S.; PEREIRA, M. A. Dual role for transforming growth factor beta-dependent signaling in *Trypanosoma cruzi* infection of mammalian cells. **Infect Immun**, v. 68, n. 4, p. 2077-81, Apr 2000. ISSN 0019-9567 (Print).

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 Immunol Med Microbiol**, v. 52, n. 1, p. 47-58, Jan 2008. ISSN 0928-8244 (Print).

HOKARI, R.; MATSUNAGA, H.; MIURA, S. Effect of dietary fat on intestinal inflammatory diseases. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 28 Suppl 4, p. 33-6, Dec 2013. ISSN 0815-9319.

HOLSCHER, C.; KOHLER, G.; MULLER, U.; MOSSMANN, H.; SCHAUB, G. A.; BROMBACHER, F. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. **Infect Immun**, v. 66, n. 3, p. 1208-15, Mar 1998. ISSN 0019-9567 (Print).

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. **Infect Immun**, v. 68, n. 7, p. 4075-83, Jul 2000. ISSN 0019-9567 (Print).

HONG, S.; GRONERT, K.; DEVCHAND, P. R.; MOUSSIGNAC, R. L.; SERHAN, C. N. Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells.

Autacoids in anti-inflammation. **J Biol Chem**, v. 278, n. 17, p. 14677-87, Apr 25 2003. ISSN 0021-9258 (Print).

HOTEZ, P. Enlarging the "Audacious Goal": elimination of the world's high prevalence neglected tropical diseases. **Vaccine**, v. 29 Suppl 4, p. D104-10, Dec 30 2011. ISSN 0264-410x.

HURLEY, J. H.; HANSON, P. I. Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 11, n. 8, p. 556-66, Aug 2010. ISSN 1471-0072.

INAL, J. M.; FAIRBROTHER, U.; HEUGH, S. Microvesiculation and disease. **Biochem Soc Trans**, v. 41, n. 1, p. 237-40, Feb 01 2013. ISSN 0300-5127.

INOUE, S.; KAWANISHI, S. Oxidative DNA damage induced by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide. **FEBS Lett**, v. 371, n. 1, p. 86-8, Aug 28 1995. ISSN 0014-5793 (Print).

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. **J Nutr**, v. 133, n. 4, p. 1163-9, Apr 2003. ISSN 0022-3166 (Print).

JING, K.; SHIN, S.; JEONG, S.; KIM, S.; SONG, K. S.; PARK, J. H.; HEO, J. Y.; SEO, K. S.; PARK, S. K.; KWEON, G. R.; WU, T.; PARK, J. I.; LIM, K. Docosahexaenoic acid induces the degradation of HPV E6/E7 oncoproteins by activating the ubiquitin-proteasome system. **Cell Death Dis**, v. 5, p. e1524, Nov 13 2014.

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 Rev Mol Med**, v. 12, p. e29, Sep 15 2010. ISSN 1462-3994.

KAECH, C.; BOCHUD, P. Y.; CALANDRA, T. Cytokines and Escherichia coli Sepsis. **EcoSal Plus**, v. 2, n. 1, Jan 2006. ISSN 2324-6200 (Print).

KAHN, S. J.; WLEKLINSKI, M.; EZEKOWITZ, R. A.; CODER, D.; ARUFFO, A.; FARR, A. The major surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes are ligands of the human serum mannose-binding protein. **Infect Immun**, v. 64, n. 7, p. 2649-56, Jul 1996. ISSN 0019-9567 (Print)

KANAOKA, Y.; BOYCE, J. A. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: cellular distribution and function in immune and inflammatory responses. **J Immunol**, v. 173, n. 3, p. 1503-10, Aug 01 2004. ISSN 0022-1767 (Print).

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. 2742-8, Jun 13 2000. ISSN 0009-7322.

KERR, M. C.; TEASDALE, R. D. Defining macropinocytosis. **Traffic**, v. 10, n. 4, p. 364-71, Apr 2009. ISSN 1398-9219.

KHAIR-EL-DIN, T.; SICHER, S. C.; VAZQUEZ, M. A.; CHUNG, G. W.; STALLWORTH, K. A.; KITAMURA, K.; MILLER, R. T.; LU, C. Y. Transcription of the murine iNOS gene is inhibited by docosahexaenoic acid, a major constituent of fetal and neonatal sera as well as fish oils. **J Exp Med**, v. 183, n. 3, p. 1241-6, Mar 01 1996. ISSN 0022-1007 (Print).

KIERSZENBAUM, F. Protection of congenitally athymic mice against *Trypanosoma cruzi* infection by passive antibody transfer. **J Parasitol**, v. 66, n. 4, p. 673-5, Aug 1980. ISSN 0022-3395 (Print).

KIERSZENBAUM, F.; DE DIEGO, J. L.; FRESNO, M.; SZTEIN, M. B. Inhibitory effects of the *Trypanosoma cruzi* membrane glycoprotein AGC10 on the expression of IL-2 receptor chains and secretion of cytokines by subpopulations of activated human T lymphocytes. **Eur J Immunol**, v. 29, n. 5, p. 1684-91, May 1999. ISSN 0014-2980 (Print).

KIERSZENBAUM, F.; LOPEZ, H. M.; SZTEIN, M. B. Inhibition of *Trypanosoma cruzi*-specific immune responses by a protein produced by T. cruzi in the course of Chagas' disease. **Immunology**, v. 81, n. 3, p. 462-7, Mar 1994. ISSN 0019-2805 (Print).

KIM, G. D.; LEE, S. E.; YANG, H.; PARK, H. R.; SON, G. W.; PARK, C. S.; PARK, Y. S. beta2 integrins (CD11/18) are essential for the chemosensory adhesion and migration of polymorphonuclear leukocytes on bacterial cellulose. **J Biomed Mater Res A**, v. 103, n. 5, p. 1809-17, May 2015. ISSN 1549-3296.

KLESHCHENKO, Y. Y.; MOODY, T. N.; FURTAK, V. A.; OCHIENG, J.; LIMA, M. F.; VILLALTA, F. Human galectin-3 promotes *Trypanosoma cruzi* adhesion to human coronary artery smooth muscle cells. **Infect Immun**, v. 72, n. 11, p. 6717-21, Nov 2004. ISSN 0019-9567 (Print).

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. 2451-60, Mar 12 2009. ISSN 0006-4971.

KRETTLI, A. U.; BRENER, Z. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. **J Immunol**, v. 116, n. 3, p. 755-60, Mar 1976. ISSN 0022-1767 (Print).

KROMANN, N.; GREEN, A. Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950-1974. **Acta Med Scand**, v. 208, n. 5, p. 401-6, 1980. ISSN 0001-6101 (Print).

KUMARATILAKE, L. M.; ROBINSON, B. S.; FERRANTE, A.; POULOS, A. Antimalarial properties of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids: *in vitro* effects on *Plasmodium falciparum* and *in vivo* effects on *P. berghei*. **J Clin Invest**, v. 89, n. 3, p. 961-7, Mar 1992. ISSN 0021-9738 (Print).

LANDS, B. Historical perspectives on the impact of n-3 and n-6 nutrients on health. **Prog Lipid Res**, v. 55, p. 17-29, Jul 2014. ISSN 0163-7827.

LANNES-VIEIRA, J. *Trypanosoma cruzi*-elicited CD8+ T cell-mediated myocarditis: chemokine receptors and adhesion molecules as potential therapeutic targets to control chronic inflammation? **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p. 299-304, Apr 2003. ISSN 0074-0276 (Print).

LEY, V.; ANDREWS, N. W.; ROBBINS, E. S.; NUSSENZWEIG, V. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. **J Exp Med**, v. 168, n. 2, p. 649-59, Aug 01 1988. ISSN 0022-1007 (Print).

LIDANI, K. C. F.; BAVIA, L.; AMBROSIO, A. R.; DE MESSIAS-REASON, I. J. The Complement System: A Prey of *Trypanosoma cruzi*. **Front Microbiol**, v. 8, p. 607, 2017. ISSN 1664-302X (Print).

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. **Front Immunol**, v. 6, p. 428, 2015. ISSN 1664-3224 (Print).

LOPEZ, L.; ARAI, K.; GIMENEZ, E.; JIMENEZ, M.; PASCUZO, C.; RODRIGUEZ-BONFANTE, C.; BONFANTE-CABARCAS, R. [C-reactive protein and interleukin-6 serum levels increase as Chagas disease progresses towards cardiac failure]. **Rev Esp Cardiol**, v. 59, n. 1, p. 50-6, Jan 2006. ISSN 0300-8932 (Print).

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.; FRITSCHKE, K. L.; PINGE-FILHO, P. Fish oil supplementation benefits the murine host during the acute phase of a parasitic infection from *Trypanosoma cruzi*. **Nutr Res**, v. 41, p. 73-85, May 2017. ISSN 0271-5317.

LOZITO, T. P.; TUAN, R. S. Endothelial cell microparticles act as centers of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) activation and vascular matrix remodeling. **J Cell Physiol**, v. 227, n. 2, p. 534-49, Feb 2012. ISSN 0021-9541.

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. **Nutr Neurosci**, p. 1-8, Jul 17 2016. ISSN 1028-415x.

MACHADO, F. S.; DUTRA, W. O.; ESPER, L.; GOLLOB, K. J.; TEIXEIRA, M. M.; FACTOR, S. M.; WEISS, L. M.; NAGAJYOTHI, F.; TANOWITZ, H. B.; GARG, N. J. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. **Semin Immunopathol**, v. 34, n. 6, p. 753-70, Nov 2012. ISSN 1863-2297.

MACHADO, F. S.; MUKHERJEE, S.; WEISS, L. M.; TANOWITZ, H. B.; ASHTON, A. W. Bioactive lipids in *Trypanosoma cruzi* infection. **Adv Parasitol**, v. 76, p. 1-31, 2011. ISSN 0065-308x.

MACMICKING, J.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu Rev Immunol**, v. 15, p. 323-50, 1997. ISSN 0732-0582 (Print).

MAGANTO-GARCIA, E.; PUNZON, C.; TERHORST, C.; FRESNO, M. Rab5 activation by Toll-like receptor 2 is required for *Trypanosoma cruzi* internalization and replication in macrophages. **Traffic**, v. 9, n. 8, p. 1299-315, Aug 2008. ISSN 1398-9219.

MAGDESIAN, M. H.; GIORDANO, R.; ULRICH, H.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; SCHUMACHER, R. I.; COLLI, W.; ALVES, M. J. Infection by *Trypanosoma cruzi*. Identification of a parasite ligand and its host cell receptor. **J Biol Chem**, v. 276, n. 22, p. 19382-9, Jun 01 2001. ISSN 0021-9258 (Print).

MALVEZI, A. D.; DA SILVA, R. V.; PANIS, C.; YAMAUCHI, L. M.; LOVO-MARTINS, M. I. Aspirin modulates innate inflammatory response and inhibits the entry of *Trypanosoma cruzi* in mouse peritoneal macrophages. v. 2014, p. 580919, 2014. ISSN 0962-9351.

MANNE-GOEHLER, J.; UMEH, C. A.; MONTGOMERY, S. P.; WIRTZ, V. J. Estimating the Burden of Chagas Disease in the United States. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 11, p. e0005033, Nov 2016. ISSN 1935-2727.

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. **J Extracell Vesicles**, v. 3, p. 25040, 2014. ISSN 2001-3078 (Print).

MARCINKIEWICZ, J.; GRABOWSKA, A.; BRYNIARSKI, K.; CHAIN, B. M. Enhancement of CD4+ T-cell-dependent interleukin-2 production *in vitro* by murine alveolar macrophages: the role of leukotriene B4. **Immunology**, v. 91, n. 3, p. 369-74, Jul 1997. ISSN 0019-2805 (Print).

MARIM, F. M.; SILVEIRA, T. N.; LIMA, D. S., JR.; ZAMBONI, D. S. A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. e15263, Dec 17 2010. ISSN 1932-6203.

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. 1109-23, Mar 06 2007. ISSN 0009-7322.

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 Microbiol**, v. 13, n. 7, p. 943-54, Jul 2011. ISSN 1462-5814.

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. **Clin Chem**, v. 58, n. 10, p. 1476-84, Oct 2012. ISSN 0009-9147.

MASSAD, E. The elimination of Chagas' disease from Brazil. **Epidemiol Infect**, v. 136, n. 9, p. 1153-64, Sep 2008. ISSN 0950-2688 (Print).

MATHIVANAN, S.; JI, H.; SIMPSON, R. J. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. **J Proteomics**, v. 73, n. 10, p. 1907-20, Sep 10 2010. ISSN 1874-3919.

MAYER, B.; HEMMENS, B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. **Trends Biochem Sci**, v. 22, n. 12, p. 477-81, Dec 1997. ISSN 0968-0004 (Print).

MELO, R. C.; D'AVILA, H.; FABRINO, D. L.; ALMEIDA, P. E.; BOZZA, P. T. Macrophage lipid body induction by Chagas disease *in vivo*: putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection. **Tissue Cell**, v. 35, n. 1, p. 59-67, Feb 2003. ISSN 0040-8166 (Print).



MEYLAN, E.; TSCHOPP, J.; KARIN, M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. **Nature**, v. 442, n. 7098, p. 39-44, Jul 06 2006. ISSN 0028-0836.

MICHELIN, M. A.; SILVA, J. S.; CUNHA, F. Q. Inducible cyclooxygenase released prostaglandin mediates immunosuppression in acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Exp Parasitol**, v. 111, n. 2, p. 71-9, Oct 2005. ISSN 0014-4894 (Print).

MIDDLETON, S. J.; NAYLOR, S.; WOOLNER, J.; HUNTER, J. O. A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of essential fatty acid supplementation in the maintenance of remission of ulcerative colitis. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 16, n. 6, p. 1131-5, Jun 2002. ISSN 0269-2813 (Print).

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. **Br J Nutr**, v. 107 Suppl 2, p. S171-84, Jun 2012. ISSN 0007-1145.

MOMEN, H. Taxonomy of *Trypanosoma cruzi*: a commentary on characterization and nomenclature. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 181-184, 1999. ISSN 0074-0276. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02761999000700025&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761999000700025&nrm=iso)>.

MONTEON, V. M.; FURUZAWA-CARBALLEDA, J.; ALEJANDRE-AGUILAR, R.; ARANDA-FRAUSTRO, A.; ROSALES-ENCINA, J. L.; REYES, P. A. American trypanosomiasis: in situ and generalized features of parasitism and inflammation kinetics in a murine model. **Exp Parasitol**, v. 83, n. 3, p. 267-74, Aug 1996. ISSN 0014-4894 (Print).

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 Lett**, v. 470, n. 3, p. 305-8, Mar 31 2000. ISSN 0014-5793 (Print).

MOREL, O.; TOTI, F.; HUGEL, B.; FREYSSINET, J. M. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. **Curr Opin Hematol**, v. 11, n. 3, p. 156-64, May 2004. ISSN 1065-6251 (Print).

MORILLO, C. A.; MARIN-NETO, J. A.; AVEZUM, A.; SOSA-ESTANI, S.; RASSI, A., JR.; ROSAS, F.; VILLENA, E.; QUIROZ, R.; BONILLA, R.; BRITTO, C.; GUHL, F.; VELAZQUEZ, E.; BONILLA, L.; MEEKS, B.; RAO-MELACINI, P.; POGUE, J.; MATTOS, A.; LAZDINS, J.; RASSI, A.; CONNOLLY, S. J.; YUSUF, S. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. **N Engl J Med**, v. 373, n. 14, p. 1295-306, Oct 2015. ISSN 0028-4793.

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 Biochem**, v. 47, p. 101-9, 2008. ISSN 0306-0225 (Print).

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. **An Acad Bras Cienc**, v. 77, n. 1, p. 77-94, Mar 2005. ISSN 0001-3765 (Print).

MUKHERJEE, S.; SADEKAR, N.; ASHTON, A. W.; HUANG, H.; SPRAY, D. C.; LISANTI, M. P.; MACHADO, F. S.; WEISS, L. M.; TANOWITZ, H. B. Identification of a functional prostanoid-like receptor in the protozoan parasite, *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol Res**, v. 112, n. 4, p. 1417-25, Apr 2013. ISSN 0932-0113.

NAGAJYOTHI, F.; WEISS, L. M.; SILVER, D. L.; DESRUISSEAU, M. S.; SCHERER, P. E.; HERZ, J.; TANOWITZ, H. B. *Trypanosoma cruzi* utilizes the host low density lipoprotein receptor in invasion. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 2, p. e953, Feb 01 2011. ISSN 1935-2727.

NAVARRO-GONZALVEZ, J. A.; GARCIA-BENAYAS, C.; ARENAS, J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. **Clin Chem**, v. 44, n. 3, p. 679-81, Mar 1998. ISSN 0009-9147 (Print)

NAVILIAT, M.; GUALCO, G.; CAYOTA, A.; RADI, R. Protein 3-nitrotyrosine formation during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Braz J Med Biol Res**, v. 38, n. 12, p. 1825-34, Dec 2005. ISSN 0100-879X (Print).

NEVES, R. F.; FERNANDES, A. C.; MEYER-FERNANDES, J. R.; SOUTO-PADRON, T. *Trypanosoma cruzi*-secreted vesicles have acid and alkaline phosphatase activities capable of increasing parasite adhesion and infection. **Parasitol Res**, v. 113, n. 8, p. 2961-72, Aug 2014. ISSN 0932-0113.

NOGUEIRA, N.; COHN, Z. *Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. **J Exp Med**, v. 143, n. 6, p. 1402-20, Jun 01 1976. ISSN 0022-1007 (Print).

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. Vesicles from different *Trypanosoma cruzi* strains trigger differential innate and chronic immune responses. **J Extracell Vesicles**, v. 4, p. 28734, 2015. ISSN 2001-3078 (Print).

NORRIS, K. A. Stable transfection of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes with the trypomastigote-specific complement regulatory protein cDNA confers complement resistance. **Infect Immun**, v. 66, n. 6, p. 2460-5, Jun 1998. ISSN 0019-9567 (Print).

NORRIS, K. A.; BRADT, B.; COOPER, N. R.; SO, M. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-accelerating factor. **J Immunol**, v. 147, n. 7, p. 2240-7, Oct 01 1991. ISSN 0022-1767 (Print).

NOVAK, T. E.; BABCOCK, T. A.; JHO, D. H.; HELTON, W. S.; ESPAT, N. J. NF-kappa B inhibition by omega-3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF-alpha transcription. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 284, n. 1, p. L84-9, Jan 2003. ISSN 1040-0605 (Print).

OLIVE, A. P.; DUDLEY, M.; HARARI, Y.; DUDLEY, A.; CASTRO, G. A.; LIFSCHITZ, C. H. Fish oil supplementation does not impair the gut immune response to *Trichinella spiralis* infection in rats. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 28, n. 3, p. 276-81, Mar 1999. ISSN 0277-2116 (Print).

OSTROWSKI, M.; CARMO, N. B.; KRUMEICH, S.; FANGET, I.; RAPOSO, G.; SAVINA, A.; MOITA, C. F.; SCHAUER, K.; HUME, A. N.; FREITAS, R. P.; GOUD, B.; BENARROCH, P.; HACOEN, N.; FUKUDA, M.; DESNOS, C.; SEABRA, M. C.; DARCHEN, F.; AMIGORENA, S.; MOITA, L. F.; THERY, C. Rab27a and Rab27b

- control different steps of the exosome secretion pathway. **Nat Cell Biol**, v. 12, n. 1, p. 19-30; sup pp 1-13, Jan 2010. ISSN 1465-7392.
- OUAISSI, M. A.; CORNETTE, J.; AFCHAIN, D.; CAPRON, A.; GRAS-MASSE, H.; TARTAR, A. *Trypanosoma cruzi* infection inhibited by peptides modeled from a fibronectin cell attachment domain. **Science**, v. 234, n. 4776, p. 603-7, Oct 31 1986. ISSN 0036-8075 (Print).
- OUAISSI, M. A.; DUBREMETZ, J. F.; KUSNIERZ, J. P.; CORNETTE, J.; LOYENS, M.; TAIBI, A.; MARTY, B.; VELGE, P.; RIZVI, F.; CAPRON, A. *Trypanosoma cruzi*: differential expression and distribution of an 85-kDa polypeptide epitope by *in vitro* developmental stages. **Exp Parasitol**, v. 71, n. 2, p. 207-17, Aug 1990. ISSN 0014-4894 (Print).
- 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. Oxidative stress fuels *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **J Clin Invest**, v. 122, n. 7, p. 2531-42, Jul 2012. ISSN 0021-9738.
- PAKIANATHAN, D. R.; KUHN, R. E. Interleukin-2 receptors in experimental Chagas' disease. **Infect Immun**, v. 60, n. 9, p. 3904-8, Sep 1992. ISSN 0019-9567 (Print).
- PANIS, C.; MAZZUCO, T. L.; COSTA, C. Z.; VICTORINO, V. J.; TATAKIHARA, V. L.; YAMAUCHI, L. M.; YAMADA-OGATTA, S. F.; CECCHINI, R.; RIZZO, L. V.; PINGE-FILHO, P. *Trypanosoma cruzi*: effect of the absence of 5-lipoxygenase (5-LO)-derived leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice. **Exp Parasitol**, v. 127, n. 1, p. 58-65, Jan 2011. ISSN 0014-4894.
- PANZER, U.; UGUCCIONI, M. Prostaglandin E2 modulates the functional responsiveness of human monocytes to chemokines. **Eur J Immunol**, v. 34, n. 12, p. 3682-9, Dec 2004. ISSN 0014-2980 (Print).
- 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 Infect**, v. 12, n. 8-9, p. 587-97, Aug 2010. ISSN 1286-4579.
- PELLEGRINI, A.; GUINAZU, N.; GIORDANENGO, L.; CANO, R. C.; GEA, S. The role of Toll-like receptors and adaptive immunity in the development of protective or pathological immune response triggered by the *Trypanosoma cruzi* protozoan. **Future Microbiol**, v. 6, n. 12, p. 1521-33, Dec 2011. ISSN 1746-0913.
- 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. 3884-92, Sep 1996. ISSN 0019-9567 (Print).
- PERLMANN, P.; TROYE-BLOMBERG, M. Malaria blood-stage infection and its control by the immune system. **Folia Biol (Praha)**, v. 46, n. 6, p. 210-8, 2000. ISSN 0015-5500 (Print).

PETERS-GOLDEN, M.; CANETTI, C.; MANCUSO, P.; COFFEY, M. J. Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses. **J Immunol**, v. 174, n. 2, p. 589-94, Jan 15 2005. ISSN 0022-1767 (Print).

PETERSEN, C. A.; BURLEIGH, B. A. Role for interleukin-1 beta in *Trypanosoma cruzi*-induced cardiomyocyte hypertrophy. **Infect Immun**, v. 71, n. 8, p. 4441-7, Aug 2003. ISSN 0019-9567 (Print).

PETERSON, L. D.; JEFFERY, N. M.; THIES, F.; SANDERSON, P.; NEWSHOLME, E. A.; CALDER, P. C. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids alter rat spleen leukocyte fatty acid composition and prostaglandin E2 production but have different effects on lymphocyte functions and cell-mediated immunity. **Lipids**, v. 33, n. 2, p. 171-80, Feb 1998. ISSN 0024-4201 (Print).

PETRAY, P.; ROTTENBERG, M. E.; GRINSTEIN, S.; ORN, A. Release of nitric oxide during the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunol**, v. 16, n. 4, p. 193-9, Apr 1994. ISSN 0141-9838 (Print).

PIACENZA, L.; PELUFFO, G.; ALVAREZ, M. N.; KELLY, J. M.; WILKINSON, S. R.; RADI, R. Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. **Biochem J**, v. 410, n. 2, p. 359-68, Mar 01 2008. ISSN 0264-6021.

PIACENZA, L.; PELUFFO, G.; ALVAREZ, M. N.; MARTINEZ, A.; RADI, R. *Trypanosoma cruzi* antioxidant enzymes as virulence factors in Chagas disease. **Antioxid Redox Signal**, v. 19, n. 7, p. 723-34, Sep 01 2013. ISSN 1523-0864.

PIACENZA, L.; ZAGO, M. P.; PELUFFO, G.; ALVAREZ, M. N.; BASOMBRIO, M. A.; RADI, R. Enzymes of the antioxidant network as novel determiners of *Trypanosoma cruzi* virulence. **Int J Parasitol**, v. 39, n. 13, p. 1455-64, Nov 2009. ISSN 0020-7519.

PINGE-FILHO, P.; TADOKORO, C. E.; ABRAHAMSOHN, I. A. Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Cell Immunol**, v. 193, n. 1, p. 90-8, Apr 10 1999. ISSN 0008-8749 (Print).

PITCOVSKY, T. A.; BUSCAGLIA, C. A.; MUCCI, J.; CAMPETELLA, O. A functional network of intramolecular cross-reacting epitopes delays the elicitation of neutralizing antibodies to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **J Infect Dis**, v. 186, n. 3, p. 397-404, Aug 01 2002. ISSN 0022-1899 (Print).

PREVIATO, J. O.; ANDRADE, A. F.; PESSOLANI, M. C.; MENDONCA-PREVIATO, L. Incorporation of sialic acid into *Trypanosoma cruzi* macromolecules. A proposal for a new metabolic route. **Mol Biochem Parasitol**, v. 16, n. 1, p. 85-96, Jun 1985. ISSN 0166-6851 (Print).

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. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 12, n. 9, p. 1098-103, Sep 2005. ISSN 1071-412X (Print).

RAIBORG, C.; STENMARK, H. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. **Nature**, v. 458, n. 7237, p. 445-52, Mar 26 2009. ISSN 0028-0836.

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. **Glob J Health Sci**, v. 8, n. 7, p. 18-25, Nov 03 2015. ISSN 1916-9736 (Print).

RAMIREZ, G.; VALCK, C.; MOLINA, M. C.; RIBEIRO, C. H.; LOPEZ, N.; SANCHEZ, G.; FERREIRA, V. P.; BILLETTA, R.; AGUILAR, L.; MALDONADO, I.; CATTAN, P.; SCHWAEBLE, W.; FERREIRA, A. *Trypanosoma cruzi* calreticulin: a novel virulence factor that binds complement C1 on the parasite surface and promotes infectivity. **Immunobiology**, v. 216, n. 1-2, p. 265-73, Jan-Feb 2011. ISSN 0171-2985.

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 Microbiol**, v. 19, n. 4, p. e12672, Apr 2017. ISSN 1462-5814.

RANGEL MORENO, J.; ESTRADA GARCIA, I.; DE LA LUZ GARCIA HERNANDEZ, M.; AGUILAR LEON, D.; MARQUEZ, R.; HERNANDEZ PANDO, R. The role of prostaglandin E2 in the immunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis. **Immunology**, v. 106, n. 2, p. 257-66, Jun 2002. ISSN 0019-2805 (Print).

RAPOSO, G.; STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. **J Cell Biol**, v. 200, n. 4, p. 373-83, Feb 18 2013. ISSN 0021-9525.

RASSI, A., JR.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infect Dis Clin North Am**, v. 26, n. 2, p. 275-91, Jun 2012. ISSN 0891-5520.

RASSI, A., JR.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-402, Apr 17 2010. ISSN 0140-6736.

RATNAYAKE, W. M.; GALLI, C. Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: a background review paper. **Ann Nutr Metab**, v. 55, n. 1-3, p. 8-43, 2009. ISSN 0250-6807.

Recommendations from a satellite meeting. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 429-432, 1999. ISSN 0074-0276. Disponível em: <  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02761999000700085&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761999000700085&nrm=iso)>.

REES, D.; MILES, E. A.; BANERJEE, T.; WELLS, S. J.; ROYNETTE, C. E.; WAHLE, K. W.; CALDER, P. C. Dose-related effects of eicosapentaenoic acid on innate immune function in healthy humans: a comparison of young and older men. **Am J Clin Nutr**, v. 83, n. 2, p. 331-42, Feb 2006. ISSN 0002-9165 (Print).

REIS, D. D.; JONES, E. M.; TOSTES, S., JR.; LOPES, E. R.; GAZZINELLI, G.; COLLEY, D. G.; MCCURLEY, T. L. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. **Am J Trop Med Hyg**, v. 48, n. 5, p. 637-44, May 1993. ISSN 0002-9637 (Print).

ROBBINS, P. D.; MORELLI, A. E. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. **Nat Rev Immunol**, v. 14, n. 3, p. 195-208, Mar 2014. ISSN 1474-1733.

RODRIGUES, M. M.; OLIVEIRA, A. C.; BELLIO, M. The Immune Response to *Trypanosoma cruzi*: Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development. **J Parasitol Res**, v. 2012, p. 507874, 2012. ISSN 2090-0023.

RODRIGUEZ, A.; MARTINEZ, I.; CHUNG, A.; BERLOT, C. H.; ANDREWS, N. W. cAMP regulates Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis of lysosomes and lysosome-mediated cell invasion by trypanosomes. **J Biol Chem**, v. 274, n. 24, p. 16754-9, Jun 11 1999. ISSN 0021-9258 (Print).

RODRIGUEZ, A.; SAMOFF, E.; RIOULT, M. G.; CHUNG, A.; ANDREWS, N. W. Host cell invasion by trypanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport. **J Cell Biol**, v. 134, n. 2, p. 349-62, Jul 1996. ISSN 0021-9525 (Print).

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. ISSN 1554-8627.

ROPERT, C.; ALMEIDA, I. C.; CLOSEL, M.; TRAVASSOS, L. R.; FERGUSON, M. A.; COHEN, P.; GAZZINELLI, R. T. Requirement of mitogen-activated protein kinases and I kappa B phosphorylation for induction of proinflammatory cytokines synthesis by macrophages indicates functional similarity of receptors triggered by glycosylphosphatidylinositol anchors from parasitic protozoa and bacterial lipopolysaccharide. **J Immunol**, v. 166, n. 5, p. 3423-31, Mar 01 2001. ISSN 0022-1767 (Print).

SANTANA, J. M.; GRELLIER, P.; SCHREVEL, J.; TEIXEIRA, A. R. A *Trypanosoma cruzi*-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. **Biochem J**, v. 325 ( Pt 1), p. 129-37, Jul 01 1997. ISSN 0264-6021 (Print).

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 B(2) receptors. **J Exp Med**, v. 192, n. 9, p. 1289-300, Nov 06 2000. ISSN 0022-1007 (Print)

SCHENKMAN, S.; DIAZ, C.; NUSSENZWEIG, V. Attachment of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to receptors at restricted cell surface domains. **Exp Parasitol**, v. 72, n. 1, p. 76-86, Jan 1991. ISSN 0014-4894 (Print).

SCHOFIELD, C. J.; DIAS, J. C. The Southern Cone Initiative against Chagas disease. **Adv Parasitol**, v. 42, p. 1-27, 1999. ISSN 0065-308X (Print).

SCHOREY, J. S.; HARDING, C. V. Extracellular vesicles and infectious diseases: new complexity to an old story. **J Clin Invest**, v. 126, n. 4, p. 1181-9, Apr 01 2016. ISSN 0021-9738.

SERHAN, C. N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. **Nature**, v. 510, n. 7503, p. 92-101, Jun 05 2014. ISSN 0028-0836.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral transmission of Chagas disease. **Clin Infect Dis**, v. 54, n. 6, p. 845-52, Mar 2012. ISSN 1058-4838.

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. **Braz J Med Biol Res**, v. 31, n. 1, p. 111-5, Jan 1998. ISSN 0100-879X (Print).

SILVA, J. S.; VESPA, G. N.; CARDOSO, M. A.; ALIBERTI, J. C.; CUNHA, F. Q. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. **Infect Immun**, v. 63, n. 12, p. 4862-7, Dec 1995. ISSN 0019-9567 (Print).

SILVA, P. S.; SPERANDIO DA SILVA, G. M.; DE SOUZA, A. P.; CARDOSO, C. S.; FONSECA, C. A.; BRITO, P. D.; SARAIVA, R. M.; BRASIL, P. E.; PINHEIRO, R. O.; HASSLOCHER-MORENO, A. M.; XAVIER, S. S.; SOUSA, A. S. Effects of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation in patients with chronic chagasic cardiomyopathy: study protocol for a randomized controlled trial. **Trials**, v. 14, p. 379, Nov 11 2013. ISSN 1745-6215.

SILVA, P. S. D.; MEDIANO, M. F. F.; SILVA, G.; BRITO, P. D.; CARDOSO, C. S. A.; ALMEIDA, C. F.; SANGENIS, L. H. C.; PINHEIRO, R. O.; HASSLOCHER-MORENO, A. M.; BRASIL, P.; SOUSA, A. S. Omega-3 supplementation on inflammatory markers in patients with chronic Chagas cardiomyopathy: a randomized clinical study. **Nutr J**, v. 16, n. 1, p. 36, Jun 9 2017. ISSN 1475-2891.

SIMOPOULOS, A. P. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. **J Am Coll Nutr**, v. 21, n. 6, p. 495-505, Dec 2002. ISSN 0731-5724 (Print).

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. **J Immunol**, v. 194, n. 11, p. 5472-5487, Jun 1 2015. ISSN 0022-1767.

SOSONIUK, E.; VALLEJOS, G.; KENAWY, H.; GABORIAUD, C.; THIELENS, N.; FUJITA, T.; SCHWAEBLE, W.; FERREIRA, A.; VALCK, C. *Trypanosoma cruzi* calreticulin inhibits the complement lectin pathway activation by direct interaction with L-Ficolin. **Mol Immunol**, v. 60, n. 1, p. 80-5, Jul 2014. ISSN 0161-5890.

SOUTO-PADRON, T.; CAMPETELLA, O. E.; CAZZULO, J. J.; DE SOUZA, W. Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. **J Cell Sci**, v. 96 ( Pt 3), p. 485-90, Jul 1990. ISSN 0021-9533 (Print).

SOUZA, W. **O parasita e sua interaçãõ com os hospedeiros**. 2. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 37.

SREEKUMAR, P. G.; KANNAN, R.; KITAMURA, M.; SPEE, C.; BARRON, E.; RYAN, S. J.; HINTON, D. R. alphaB crystallin is apically secreted within exosomes by polarized human retinal pigment epithelium

and provides neuroprotection to adjacent cells. **PLoS One**, v. 5, n. 10, p. e12578, Oct 08 2010. ISSN 1932-6203.

STAMLER, J. S. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. **Cell**, v. 78, n. 6, p. 931-6, Sep 23 1994. ISSN 0092-8674 (Print).

STERIN-BORDA, L.; GORELIK, G.; GOREN, N.; CAPPA, S. G.; CELENTANO, A. M.; BORDA, E. Lymphocyte muscarinic cholinergic activity and PGE2 involvement in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 81, n. 2, p. 122-8, Nov 1996. ISSN 0090-1229 (Print).

STUFFERS, S.; SEM WEGNER, C.; STENMARK, H.; BRECH, A. Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. **Traffic**, v. 10, n. 7, p. 925-37, Jul 2009. ISSN 1398-9219.

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. 678-81, Feb 04 1994. ISSN 0036-8075 (Print).

SZANTO, A.; NAGY, L. The many faces of PPARgamma: anti-inflammatory by any means? **Immunobiology**, v. 213, n. 9-10, p. 789-803, 2008. ISSN 0171-2985 (Print).

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 Trop**, v. 60, n. 3, p. 215-9, Dec 1995. ISSN 0001-706X (Print).

TALVANI, A.; MACHADO, F. S.; SANTANA, G. C.; KLEIN, A.; BARCELOS, L.; SILVA, J. S.; TEIXEIRA, M. M. Leukotriene B(4) induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma cruzi*-infected murine macrophages and mediates resistance to infection. **Infect Immun**, v. 70, n. 8, p. 4247-53, Aug 2002. ISSN 0019-9567 (Print).

TANOWITZ, H.; WITTNER, M.; KRESS, Y.; BLOOM, B. Studies of *in vitro* infection by *Trypanosoma cruzi*. I. Ultrastructural studies on the invasion of macrophages and L-cells. **Am J Trop Med Hyg**, v. 24, n. 1, p. 25-33, Jan 1975. ISSN 0002-9637 (Print).

TARDIEUX, I.; WEBSTER, P.; RAVESLOOT, J.; BORON, W.; LUNN, J. A.; HEUSER, J. E.; ANDREWS, N. W. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. **Cell**, v. 71, n. 7, p. 1117-30, Dec 24 1992. ISSN 0092-8674 (Print).

TARLETON, R. L. Tumour necrosis factor (cachectin) production during experimental Chagas' disease. **Clin Exp Immunol**, v. 73, n. 2, p. 186-90, Aug 1988. ISSN 0009-9104 (Print).

TARLETON, R. L. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. **Curr Opin Immunol**, v. 19, n. 4, p. 430-4, Aug 2007. ISSN 0952-7915 (Print).

TARLETON, R. L. CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **Semin Immunopathol**, v. 37, n. 3, p. 233-8, May 2015. ISSN 1863-2297.



TARLETON, R. L.; KOLLER, B. H.; LATOUR, A.; POSTAN, M. Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Nature**, v. 356, n. 6367, p. 338-40, Mar 26 1992. ISSN 0028-0836 (Print).

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. 433-42, Apr 2006. ISSN 0019-2805 (Print).

TEIXEIRA, A. R.; MONTEIRO, P. S.; REBELO, J. M.; ARGANARAZ, E. R.; VIEIRA, D.; LAURIA-PIRES, L.; NASCIMENTO, R.; VEXENAT, C. A.; SILVA, A. R.; AULT, S. K.; COSTA, J. M. Emerging Chagas disease: trophic network and cycle of transmission of *Trypanosoma cruzi* from palm trees in the Amazon. **Emerg Infect Dis**, v. 7, n. 1, p. 100-12, Jan-Feb 2001. ISSN 1080-6040 (Print).

TEIXEIRA, M. M.; YOSHIDA, N. Stage-specific surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* identified by monoclonal antibodies. **Mol Biochem Parasitol**, v. 18, n. 3, p. 271-82, Mar 1986. ISSN 0166-6851 (Print).

THORS, V. S.; THORISDOTTIR, A.; ERLENDSDOTTIR, H.; EINARSSON, I.; GUDMUNDSSON, S.; GUNNARSSON, E.; HARALDSSON, A. The effect of dietary fish oil on survival after infection with *Klebsiella pneumoniae* or *Streptococcus pneumoniae*. **Scand J Infect Dis**, v. 36, n. 2, p. 102-5, 2004. ISSN 0036-5548 (Print).

TIAN, T.; ZHU, Y. L.; ZHOU, Y. Y.; LIANG, G. F.; WANG, Y. Y.; HU, F. H.; XIAO, Z. D. Exosome uptake through clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis and mediating miR-21 delivery. **J Biol Chem**, v. 289, n. 32, p. 22258-67, Aug 08 2014. ISSN 0021-9258.

TIBAYRENC, M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. **Int J Parasitol**, v. 28, n. 1, p. 85-104, Jan 1998. ISSN 0020-7519 (Print).

TOLEDO, M. J. D. O.; KÜHL, J. B.; SILVA, S. V. D.; GASPERI, V. D.; ARAÚJO, S. M. D. Estudo sobre triatomíneos e reservatórios silvestres de *Trypanosoma cruzi* no estado do Paraná, Sul do Brasil. Resultados preliminares. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, p. 197-203, 1997. ISSN 0037-8682. Disponível em: <  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0037-86821997000300005&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86821997000300005&nrm=iso) >.

TOMLINSON, S.; PONTES DE CARVALHO, L. C.; VANDEKERCKHOVE, F.; NUSSENZWEIG, V. Role of sialic acid in the resistance of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to complement. **J Immunol**, v. 153, n. 7, p. 3141-7, Oct 01 1994. ISSN 0022-1767 (Print).

TREBBLE, T. M.; WOOTTON, S. A.; MILES, E. A.; MULLEE, M.; ARDEN, N. K.; BALLINGER, A. B.; STROUD, M. A.; BURDGE, G. C.; CALDER, P. C. Prostaglandin E2 production and T cell function after fish-oil supplementation: response to antioxidant cosupplementation. **Am J Clin Nutr**, v. 78, n. 3, p. 376-82, Sep 2003. ISSN 0002-9165 (Print).

TROCOLI TORRECILHAS, A. C.; TONELLI, R. R.; PAVANELLI, W. R.; DA SILVA, J. S.; SCHUMACHER, R. I.; DE SOUZA, W.; NC, E. S.; DE ALMEIDA ABRAHAMSOHN, I.; COLLI, W.; MANSO ALVES, M. J. *Trypanosoma*

- cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. **Microbes Infect**, v. 11, n. 1, p. 29-39, Jan 2009. ISSN 1286-4579 (Print).
- 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. **Infect Immun**, v. 62, n. 2, p. 692-6, Feb 1994. ISSN 0019-9567 (Print).
- TSUTSUMI, R.; HORIKAWA, Y. T.; KUME, K.; TANAKA, K.; KASAI, A.; KADOTA, T.; TSUTSUMI, Y. M. Whey Peptide-Based Formulas With omega-3 Fatty Acids Are Protective in Lipopolysaccharide-Mediated Sepsis. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v. 39, n. 5, p. 552-61, Jul 2015. ISSN 0148-6071.
- TURCHINI, G. M.; NICHOLS, P. D.; BARROW, C.; SINCLAIR, A. J. Jumping on the omega-3 bandwagon: distinguishing the role of long-chain and short-chain omega-3 fatty acids. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 52, n. 9, p. 795-803, 2012. ISSN 1040-8398.
- TURTURICI, G.; TINNIRELLO, R.; SCONZO, G.; GERACI, F. Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 306, n. 7, p. C621-33, Apr 01 2014. ISSN 0363-6143.
- TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **Int J Parasitol**, v. 31, n. 5-6, p. 472-81, May 01 2001. ISSN 0020-7519 (Print).
- VAN DEN BERG, T. K.; KRAAL, G. A function for the macrophage F4/80 molecule in tolerance induction. **Trends Immunol**, v. 26, n. 10, p. 506-9, Oct 2005. ISSN 1471-4906 (Print).
- VAN DER POUW KRAAN, T. C.; BOEIJE, L. C.; SMEENK, R. J.; WIJDENES, J.; AARDEN, L. A. Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production. **J Exp Med**, v. 181, n. 2, p. 775-9, Feb 01 1995. ISSN 0022-1007 (Print).
- VANDEN BERGHE, W.; VERMEULEN, L.; DELERIVE, P.; DE BOSSCHER, K.; STAELS, B.; HAEGEMAN, G. A paradigm for gene regulation: inflammation, NF-kappaB and PPAR. **Adv Exp Med Biol**, v. 544, p. 181-96, 2003. ISSN 0065-2598 (Print).
- VESPA, G. N.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite *in vitro*. **Infect Immun**, v. 62, n. 11, p. 5177-82, Nov 1994. ISSN 0019-9567 (Print).
- VIEIRA, M. C.; DE CARVALHO, T. U.; DE SOUZA, W. Effect of protein kinase inhibitors on the invasion process of macrophages by *Trypanosoma cruzi*. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 203, n. 2, p. 967-71, Sep 15 1994. ISSN 0006-291X (Print).
- VILLALTA, F.; KIERSZENBAUM, F. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: role of cell surface galactose residues. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 119, n. 1, p. 228-35, Feb 29 1984. ISSN 0006-291X (Print).

VRAY, B.; CAMBY, I.; VERCRUYSE, V.; MIJATOVIC, T.; BOVIN, N. V.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; KALTNER, H.; SALMON, I.; GABIUS, H. J.; KISS, R. Up-regulation of galectin-3 and its ligands by *Trypanosoma cruzi* infection with modulation of adhesion and migration of murine dendritic cells. **Glycobiology**, v. 14, n. 7, p. 647-57, Jul 2004. ISSN 0959-6658 (Print).

WAN, F.; LENARDO, M. J. The nuclear signaling of NF-kappaB: current knowledge, new insights, and future perspectives. **Cell Res**, v. 20, n. 1, p. 24-33, Jan 2010. ISSN 1001-0602.

WHO, W. H. O. Why are some tropical diseases called "neglected"? , January 2012. Disponível em: < <http://www.who.int/features/qa/58/en/> >. Acesso em: 31/03/2018.

WHO, W. H. O. Chagas disease (American trypanosomiasis). March 2017 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. **J Biol Chem**, v. 284, n. 40, p. 27384-92, Oct 02 2009. ISSN 0021-9258.

WOO, S. J.; LIM, K.; PARK, S. Y.; JUNG, M. Y.; LIM, H. S.; JEON, M. G.; LEE, S. I.; PARK, B. H. Endogenous conversion of n-6 to n-3 polyunsaturated fatty acids attenuates K/BxN serum-transfer arthritis in fat-1 mice. **J Nutr Biochem**, v. 26, n. 7, p. 713-20, Jul 2015. ISSN 0955-2863.

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. **J Cell Sci**, v. 116, n. Pt 17, p. 3611-22, Sep 01 2003. ISSN 0021-9533 (Print).

WYLLIE, M. P.; RAMIREZ, M. I. Microvesicles released during the interaction between *Trypanosoma cruzi* TcI and TcII strains and host blood cells inhibit complement system and increase the infectivity of metacyclic forms of host cells in a strain-independent process. **Pathog Dis**, v. 75, n. 7, p. 1-12, Sep 29 2017. ISSN 2049-632x.

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. **J Exp Med**, v. 177, n. 6, p. 1779-84, Jun 01 1993. ISSN 0022-1007 (Print).

YANCY, C. W.; JESSUP, M.; BOZKURT, B.; BUTLER, J.; CASEY, D. E., JR.; DRAZNER, M. H.; FONAROW, G. C.; GERACI, S. A.; HORWICH, T.; JANUZZI, J. L.; JOHNSON, M. R.; KASPER, E. K.; LEVY, W. C.; MASOUDI, F. A.; MCBRIDE, P. E.; MCMURRAY, J. J.; MITCHELL, J. E.; PETERSON, P. N.; RIEGEL, B.; SAM, F.; STEVENSON, L. W.; TANG, W. H.; TSAI, E. J.; WILKOFF, B. L. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. **J Am Coll Cardiol**, v. 62, n. 16, p. e147-239, Oct 15 2013. ISSN 0735-1097.

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. **Eur J Clin Invest**, v. 30, n. 3, p. 260-74, Mar 2000. ISSN 0014-2972 (Print).

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **An Acad Bras Cienc**, v. 78, n. 1, p. 87-111, Mar 2006. ISSN 0001-3765 (Print).

YOSHIDA, N. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. **Parasitol Int**, v. 57, n. 2, p. 105-9, Jun 2008. ISSN 1383-5769 (Print).

YOSHIDA, N.; MORTARA, R. A.; ARAGUTH, M. F.; GONZALEZ, J. C.; RUSSO, M. Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. **Infect Immun**, v. 57, n. 6, p. 1663-7, Jun 1989. ISSN 0019-9567 (Print).

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. **Am J Pathol**, v. 184, n. 1, p. 28-41, Jan 2014. ISSN 0002-9440.

ZHANG, M.; FRITSCHKE, K. L. Fatty acid-mediated inhibition of IL-12 production by murine macrophages is independent of PPARgamma. **Br J Nutr**, v. 91, n. 5, p. 733-9, May 2004. ISSN 0007-1145 (Print).

ZHAO, Y.; JOSHI-BARVE, S.; BARVE, S.; CHEN, L. H. Eicosapentaenoic acid prevents LPS-induced TNF-alpha expression by preventing NF-kappaB activation. **J Am Coll Nutr**, v. 23, n. 1, p. 71-8, Feb 2004. ISSN 0731-5724 (Print).

ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; BRIONES, M. R.; CAMPBELL, D. A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A. M.; MACHADO, C. R.; MILES, M. A.; ROMANHA, A. J.; STURM, N. R.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, A. G. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051-4, Nov 2009. ISSN 0074-0276.

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. **Infect Genet Evol**, v. 12, n. 2, p. 240-53, Mar 2012. ISSN 1567-1348.

## ANEXO I- Carta de aprovação da Comissão de ética no uso de animais

Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) –  
Universidade Estadual de Londrina.



Universidade  
Estadual de Londrina

### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 111/2015

Londrina, 19 de Junho de 2015.

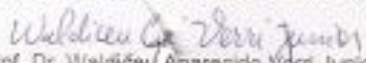
Prezado Pesquisador,

A CEUA/UEL reunida em 19 de Maio de 2015 avaliou o projeto de pesquisa intitulado "Avaliação das microvesículas secretadas como um dos mecanismos alvo da imunomodulação por PUFAs n-3 durante a infecção por *Trypanosoma cruzi* *in vivo* e *in vitro*", registrado sob o processo CEUA nº7045.2015.06, pesquisa do Centro de Ciências Biológicas, desenvolvido sob sua responsabilidade. Esclarecidos os aspectos metodológicos solicitados, o projeto está **aprovado** para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 240 camundongos C57BL/6 machos e fêmeas, com idade de 8 a 12 semanas, pesando aproximadamente 20 g e provenientes do Biotério da Fiocruz em Curitiba (200 animais) e do CEMIB-Unicamp (40 animais). O projeto tem como objetivo avaliar se as microvesículas secretadas por *Trypanosoma cruzi* e/ou por células infectadas constituem um dos mecanismos alvo da imunomodulação por PUFAs n-3. Para tanto, os animais serão divididos em grupos e receberão, durante 15 dias, óleo de peixe e milho ou PBS via oral para posterior infecção com  $5 \times 10^3$  tripomastigotas sanguíneas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) intraperitonealmente. Serão inoculadas microvesículas derivadas de *T. cruzi* ou de células infectadas 7 dias antes da infecção para avaliação do papel das mesmas. No 12º dia após a infecção, os camundongos serão anestesiados, seguida por coleta de sangue por punção cardíaca e posterior eutanásia por deslocamento cervical e laparotomia para retirada do coração, baço e fêmur. O coração será dividido em duas seções para dosagem de óxido nítrico e análise histológica e o baço, removido assepticamente, será utilizado para cultura de esplenócitos e dosagem de citocinas. Será realizada parasitemia pela técnica de Brenner nos grupos infectados por *Trypanosoma cruzi* em dias intercalados até o 30º dia após a infecção. Os protocolos experimentais estão aprovados com previsão para execução em 36 meses.

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à aprovação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subcrevo, cordialmente,

  
Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verrini Junior  
Coordenador da CEUA/UEL

Ilmo. Sr.  
**Prof. Dr. Phlleno Pinge Filho**  
Coordenador do Projeto  
Departamento de Patologia Experimental  
Centro de Ciências Biológicas  
Com cópia para Sra. Edilamar dos Anjos (Chefe da DCA/PROPPG), Chefe do Departamento de Patologia Experimental e Diretor(a) do Centro de Ciências Biológicas.

Campus Universidade Estadual de Londrina - Caixa Postal 609 - Fone: (51) 3371-4000 FAX: (51) 3371-4000 - Caixa Postal 609 - CEP 84031-910 - Site: www.uel.br

LOD/0015 - PUG/15 - BUAL

## ANEXO II- Artigo publicado em 2017 na revista *Nutrition Research*.

Artigo publicado em 2017 pelo nosso grupo de pesquisa na revista *Nutrition Research* que aborda a suplementação com óleo de peixe na infecção murina por *Trypanosoma cruzi*.



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ScienceDirect

[www.nrjournal.com](http://www.nrjournal.com)



Original Research

### Fish oil supplementation benefits the murine host during the acute phase of a parasitic infection from *Trypanosoma cruzi*



Maria I. Lovo-Martins<sup>a</sup>, Aparecida D. Malvezi<sup>a</sup>, Rosiane V. da Silva<sup>a</sup>, Nágela G. Zanluqui<sup>a</sup>, Vera L.H. Tatakihara<sup>a</sup>, Niels O.S. Câmara<sup>b</sup>, Ana Paula L. de Oliveira<sup>b</sup>, Jean P.S. Peron<sup>b</sup>, Marli C. Martins-Pinge<sup>c</sup>, Kevin L. Fritsche<sup>d</sup>, Phileno Pinge-Filho<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Pathological Sciences, Laboratory of Experimental Immunopathology, Biological Sciences Center, State University of Londrina, 86051-970, Londrina, Paraná, Brazil

<sup>b</sup> Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, 05508-900, São Paulo, Brazil

<sup>c</sup> Department of Physiological Sciences, Biological Sciences Center, State University of Londrina, 86051-970, Londrina, Paraná, Brazil

<sup>d</sup> Department of Nutrition and Exercise Physiology, University of Missouri, Columbia, 65211, MO, USA

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 5 October 2016

Revised 16 March 2017

Accepted 11 April 2017

##### Keywords:

Omega-3 fatty acids

Mice

Nitric oxide

Infection

Chagas disease

#### ABSTRACT

Long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids (LC n-3 PUFA) are known to modulate a variety of immune cell functions. On occasion, this has led to diminished host resistance to certain viral and bacterial infections. Little is known about the impact of n-3 PUFA on host resistance to parasitic infection, however, based on results from a small study conducted more than two decades ago, we hypothesized that providing mice LC n-3 PUFA will diminish host resistance to *Trypanosoma cruzi*, the parasitic pathogen responsible for Chagas disease. To investigate this, C57BL/6 mice were supplemented by gavage (0.6% v/w) with phosphate-buffered saline, corn oil (CO), or menhaden fish oil (FO, a fat source rich in LC n-3 PUFA) for 15 days prior to *T. cruzi* (Y strain) challenge and throughout the acute phase of infection. FO supplementation was associated with a transient 2-fold greater peak of blood parasitemia at 7 days postinfection (dpi), whereas subsequent cardiac parasitemia was ~60% lower at 12 dpi. FO treatment also ameliorated the leukopenia and thrombocytopenia observed in the early stages of a *T. cruzi* infection. FO supplementation reduced circulating and cardiac nitric oxide at 7 and 12 dpi, respectively. FO supplementation altered ex vivo prostaglandin E<sub>2</sub> and cytokine and chemokine production by splenocytes isolated from uninfected and infected mice. Overall, our results suggest that oral administration of LC n-3 PUFA from FO can have beneficial effects on the host in the early course of a *T. cruzi* infection.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; CD, Chagas disease; CO, corn oil; dpi, days postinfection; EPA, eicosapentaenoic acid; FO, fish oil; IFN $\gamma$ , interferon-gamma; IL, interleukin; KC, keratinocyte chemoattractant; LC n-3 PUFA, long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; MIP, macrophage inflammatory protein; NO, nitric oxide; PBS, phosphate-buffered saline; PGE<sub>2</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub>; PUFA, polyunsaturated fatty acid; RANTES, regulated upon activation normal T cell expressed and secreted; Tc-Ag, *Trypanosoma cruzi* antigen; TNF $\alpha$ , tumor necrosis factor alpha.

\* Corresponding author at: Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, CEP: 86051-970, Londrina, Paraná, Brazil. Tel.: +55 43 3371 4267; fax: +55 43 3371 4465.

E-mail address: [pingefilho@uel.br](mailto:pingefilho@uel.br) (P. Pinge-Filho).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2017.04.007>

0271-5317/© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Chagas disease (CD) is caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* and represents an important health problem with current estimates of its worldwide prevalence exceeding 5 million people, with the majority of cases occurring in Latin America [1]. At present, the vast majority of *T. cruzi*-infected individuals fail to receive adequate treatment during the acute phase and become chronically infected. A majority of those chronically infected will remain asymptomatic, yet 20%-30% will develop Chagas cardiomyopathy or gastrointestinal Chagas or both. During the past few decades, greater travel and migration of individuals from *T. cruzi*-endemic to nonendemic countries have significantly increased the number of confirmed cases of CD in the United States, Canada, Europe, Japan, and Australia [2]. More than a century after its first description by Carlos Chagas, many questions about the pathophysiology of CD remain unanswered [3].

Acute *T. cruzi* infection in humans [4] and mice results in a microscopically detectable parasitemia, anemia, hepatosplenomegaly, and atypical lymphocytosis [5,6]. Although the vast majority of acute infections are not detected, the timely administration of trypanocidal drugs is generally effective at ameliorating these symptoms [7]. Mortality in acute *T. cruzi* infection is uncommon, but when it occurs, it is associated with a sharp decline in circulating platelets and leukocytes as well as bone marrow hypoplasia [7,8]. Survival during the acute infection depends on a robust innate immune response, particularly from macrophages that have been activated by cytokines, such as interferon-gamma (IFN $\gamma$ ) and tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) [8–10]. Eventually, pathogen-specific T-cell-mediated immunity develops and is responsible for keeping parasite replication in check, resulting in a chronic, low-grade parasitemia. Anything that compromises host immunity (eg, aging, HIV infection, chemotherapy, antirejection treatment following organ transplantation) can promote a reemergence of this latent infection with subsequent morbidity.

Nutrition, in general, and dietary fats more specifically are known to have an impact on the functioning of the immune system [11–13]. Evidence indicates that consumption of fish oil (FO), rich in long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids (LC n-3 PUFA), affects selective aspects of innate and cellular immunity [14,15]. In some circumstances, FO feeding has led to impairment in host resistance to certain infectious agents [16,17]. Much of the research in this area has focused on bacterial and viral agents, with less attention paid to parasitic diseases. To our knowledge, only a single study, reported more than 2 decades ago, has investigated the impact of oral administration LC n-3 PUFA on host survival of mice following an experimental *T. cruzi* infection [18]. In this experiment, the authors administered eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3), one of the predominate LC n-3 PUFA in FO, to mice prior to and following *T. cruzi* challenge to healthy mice. EPA administration did not affect tissue parasitemia on either the 15th or 30th day postinfection (dpi), but EPA-supplemented mice suffered 3-fold higher mortality than mice not receiving this treatment. The authors did note that both weight loss and circulating TNF $\alpha$  activity following a lipopolysaccharide challenge correlated with the higher mortality reported in the EPA-supplemented

mice. This outcome is consistent with what is known about the activity of LC n-3 PUFA on host inflammatory responses, in general, and macrophage activation, more specifically. Based on this single study as well as the present understanding of LC n-3 PUFA modulation of immune functions, we hypothesized that daily consumption of FO, containing multiple LC n-3 PUFA, prior to and during a *T. cruzi* challenge would adversely impact (ie, elevate) morbidity and mortality. To test this hypothesis, we used a well-characterized mouse model to investigate the effects of LC n-3 PUFA supplementation on key in vivo hematological and immunological responses to an acute *T. cruzi* infection [8,19–21].

## 2. Methods and materials

### 2.1. Animals

C57BL/6 male and female mice were obtained from CEMIB/UNICAMP (Campinas, São Paulo, Brazil). Swiss male mice were obtained from the breeding colonies at the animal facility of the Center for Biological Sciences, Londrina State University (Londrina, Paraná, Brazil). All mice used in these experiments were 7 to 12 weeks in age. All mice were maintained under standard housing conditions in an animal facility in the Department of Pathological Sciences, Center for Biological Sciences, Londrina State University. Sterilized water and a commercial rodent diet (Nuvilab-CR1; Nuvital, Campo Mourão, Brazil) which provided 3.49 kcal/g [14.611 kJ] (25en% from protein, 12en% from fat, and 63en% from carbohydrates) were available ad libitum. The manufacturer was unwilling to provide us with a list of ingredients used to produce this commercial rodent diet but did provide the following proximate analyses information (g/kg): protein, 220; fat, 40; carbohydrate, 660; and fiber, 70. All additional nutrient information the manufacturer provided for these rodent diets is provided here (in order of decreasing concentration): calcium, 10–14 g/kg (min-max); lysine, 12 g/kg; phosphorus, 8 g/kg; methionine, 4 g/kg; sodium, 2.7 g/kg; choline, 1.9 g/kg; vitamin A, 13 000 IU/kg; vitamin D3, 2000 IU/kg; vitamin E, 34 IU/kg; fluorine, 80 mg/kg; niacin, 60 mg/kg; manganese, 60 mg/kg; zinc, 60 mg/kg; iron, 50 mg/kg; calcium pantothenate, 20 mg/kg; copper, 10 mg/kg; vitamin B6, 7 mg/kg; vitamin B2, 6 mg/kg; vitamin B1, 5 mg/kg; vitamin K3, 3 mg/kg; iodine, 2 mg/kg; cobalt, 1.5 mg/kg; folic acid, 1 mg/kg; biotin, 0.05 mg/kg; and selenium, 0.05 mg/kg.

This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* of the Brazilian National Council of Animal Experimentation (<http://www.cobea.org.br/>). The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments at Londrina State University (CEEA, process number 89/10-35135.2010.85). Every effort was made to minimize pain and suffering experienced by the mice used in these experiments.

### 2.2. Treatment groups

Starting at 15 days before *T. cruzi* challenge, C57BL/6 mice (all with body weights between 18 and 24 g) were randomly

assigned to 1 of 3 treatment groups: (1) phosphate-buffered saline (PBS), (2) corn oil (CO), or (3) menhaden FO. Administration of each of these treatments occurred between 12:00 and 2:00 PM daily using a standard gastric gavage needle attached to a 0.5-mL tuberculin syringe. The PBS treatment group was included as a control for the potential impact of the stress of daily handling associated with gavaging mice. The CO treatment group helps us account for the potential impact on host immunity of daily administration of fat equivalent to ~5%-6% of daily energy intake, but in this case, the fat source was devoid of LC n-3 PUFA.

Food-grade menhaden FO purchased from Sigma Chemical Co (product #C8627) was used as a source of LC n-3 PUFA for this study. To serve as an energy-equivalent "control" for FO treatment, we purchased food-grade CO (product #F8020), which is devoid of LC n-3 PUFA, from the same supplier as the FO. The fatty acid profiles of these 2 fat sources was determined according to the method of Sukhija and Palmquist [22]. The FO contained slightly more than 30%, by weight, LC n-3 PUFA. The complete fatty acid profile for the FO was as follows: 14:0, 9.6%; 16:0, 19.7%; 16:1n-7, 13.5%; 18:0, 5.1%; 18:1n-9&7, 12.8%; 18:2n-6, 1.6%; 18:3n-6, 0.7%; 18:3n-3, 1.3%; 18:4n-3, 3.0%; 20:4n-6, 1.7%; 20:5n-3, 16.8%; 22:5n-3, 2.8%; 22:6n-3, 11.2%. The use of this source of LC n-3 PUFA at 0.6% (v/w) would result in providing a 20-g mouse a daily dose of ~18 µg and 11 µg of EPA and docosahexaenoic acid, respectively, comparable with the amount of EPA administered daily (16 µg) to the mice in the Takeda et al (1995) [18] study.

The fatty acid profile of the CO used in this study was as follows: 16:0, 11.9%; 18:0, 1.7%; 18:1n-9, 28.7%; 18:2n-6, 56.5%; 18:3n3, 0.9%. Values shown represent the means from 3 independent analyses. Variance in these values was quite low (eg, SEM = 0.1% or less) and thus were not shown for individual fatty acids. Also, fatty acids that accounted for 0.5% or less of the total were not reported.

### 2.3. Parasites and infection

*T. cruzi*, Y strain was maintained by weekly intraperitoneal inoculations of trypomastigotes into Swiss mice. When needed, parasite-rich blood was collected from these inoculated Swiss mice and then appropriately diluted into 0.01 mol/L PBS. C57BL/6 mice were infected by administering an intraperitoneal injection with  $5 \times 10^3$  blood-derived trypomastigotes. Parasitemia was monitored by counting the number of blood-borne trypomastigotes in 5 µL of fresh blood collected from the tail vein [23].

### 2.4. *T. cruzi* antigen preparation

*T. cruzi* antigen (Tc-Ag) was prepared from parasites harvested from infected monolayers of LLC-MK2 cells obtained from American Type Culture Collection as previously described [24]. Briefly, parasite-infected cell monolayers were detached from the dishes they were grown in with a sterile Teflon scraper and then submitted to 10 cycles of freezing and thawing. Aliquots of this crude Tc-Ag-rich preparation were stored at -20°C until thawed immediately prior to use in vivo Ag-specific recall stimulation as described later.

### 2.5. Overall health assessment following *T. cruzi* challenge

Following the challenge with *T. cruzi*, signs of illness (eg, hackle hair, diarrhea, lethargy, rapid/shallow breathing, paralysis of 1 or more limbs) as well as changes in body weight were recorded daily as described previously [23]. Mice showing signs of serious illness and/or distress were immediately euthanized. Euthanasia was carried out in accordance with Committee on the Ethics of Animal Experiments at Londrina State University. Briefly, mice were anesthetized with an intramuscular injection of ketamine (80 mg/kg body weight) and xylazine (5 mg/kg body weight), and once fully anesthetized, death was assured by cervical dislocation.

Blood parasitemia, expressed as parasites per milliliter of blood, was assessed under standardized conditions by direct microscopic observation at 400× magnification of 50 fields in 5 µL of heparinized tail venous blood on alternate days from the third day after *T. cruzi* infection [23].

### 2.6. Hematological assessment

The effects of LC n-3 PUFA supplementation on blood cell profiles and cellularity in the bone marrow were determined in uninfected and infected C57BL/6 mice at 5, 7, and 12 days post-*T. cruzi* infection. Whole blood was collected from mice under anesthesia by intracardiac puncture using sodium-ethylenediaminetetraacetic acid as the anticoagulant at a final concentration of 1 mg/mL. Leukocytes, platelets, and reticulocytes were counted by standard methods [7]. Hematocrits were determined by spinning down capillary tubes filled with blood using a microcentrifuge. Bone marrow was obtained by flushing each femur shaft with 3 mL of ice-cold PBS, as previously described [25]. The total number of nucleated cells collected was quantified by manual hemacytometer count.

### 2.7. Histological analysis of heart

On day 12 postinfection, representative mice in each treatment group were killed under anesthesia, as previously described, so that hearts could be removed for histological examination of parasitemia. Following removal, each heart was sliced transversally into 2 halves. One half was immediately stored at -20°C for later analysis of nitric oxide (NO) content. The remaining tissue section was fixed in 10% buffered formalin. Paraffin-embedded 5-µm-thick sections were stained with hematoxylin-eosin and analyzed by light microscopy. Cardiac parasitism was evaluated by counting the number of amastigote nests that were visualized at 400× magnification for 3 of the 5-µm-thick cross sections of the whole heart per animal as previously described [26]. The results of cardiac parasitism were reported as the number of amastigote nests in all 3 heart tissue sections.

### 2.8. NO quantification

NO concentration in plasma and heart tissue obtained from uninfected and *T. cruzi*-infected mice on 5, 7, and 12 dpi was quantified as described previously [27,28] with some minor modifications. Briefly, frozen heart halves were rapidly thawed, immediately homogenized in PBS (100 mg of tissue wet weight



per milliliter of saline), and then centrifuged (5590g) for 5 minutes. Aliquots (60  $\mu$ L) of cardiac supernatant or plasma were deproteinated by adding 50  $\mu$ L of a 75-mmol/L ZnSO<sub>4</sub> solution (Merck) followed by vigorous mixing with a vortex; then, samples were spun down as described previously. Following this, supernatants were transferred to new tubes, and then 70  $\mu$ L of a 55-mmol/L NaOH solution (Merck) was added to each tube. Samples were immediately mixed and spun down as before. The final supernatants were diluted in a glycine-buffered solution (45 g/L, pH 9.7, Merck) at a ratio of 5:1.

Cadmium granules (Fluka) stored in a 100-mmol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution (Merck) were rinsed 3 times in distilled sterile water and then placed in a 5-mmol/L CuSO<sub>4</sub> solution in glycine-NaOH buffer (15 g/L, pH 9.7, Merck). Importantly, copper-coated cadmium granules were used within 10 minutes. Cadmium treatment is used to convert all nitrate in biological samples into nitrite, thus providing a more accurate estimation of total NO in the original samples. Activated granules (1-2 granules per tube, ~600-1000 mg) were added to glycine-buffered, diluted supernatants and gently stirred for 10 minutes. Aliquots (50  $\mu$ L) from each sample tube were added to duplicate wells on a 96-well microplate for subsequent nitrite determination. To determine sample nitrite concentration, a calibration curve was prepared using dilutions of NaNO<sub>2</sub> (Merck) in distilled sterile water to create concentrations ranging from 0 to 125  $\mu$ mol/L. To each well, the same volume of Griess reagent was added (reagent I: 50 mg of N-naphthylethylenediamine in 250 mL of distilled water; reagent II: 5 g of sulfanilic acid in 500 mL of 3 mol/L HCl, Sigma). The absorbance was read at 550 nm using a standard microplate reader (Gen 5; BioTek, Winooski, VT, USA). The results of this assay are expressed as micromoles per liter of nitrite for plasma and micromoles per gram wet weight of cardiac tissue.

### 2.9. Ex vivo immune cell stimulation

When spleens of uninfected or infected mice were collected, immune cells (ie, splenocytes) were isolated to examine the impact of infection and treatment on ex vivo cytokine production. Splenocytes were depleted of erythrocytes by hypotonic lysis with distilled water and then immediately resuspended in RPMI-1640 medium supplemented with the following: 10 mmol/L HEPES, 2.0 mmol/L L-glutamine, 0.55 mmol/L arginine, 1 mmol/L pyruvate, 43 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, penicillin and streptomycin (100 U/mL and 100  $\mu$ g/mL, respectively) (Sigma Chemical Co), tylosin (1 mg/mL, Sigma Chemical Co), and 10% fetal calf serum (Invitrogen), herein referred to as *complete medium*. Splenocytes were cultured for 8 or 72 hours in 48-well flat-bottom plates (5  $\times$  10<sup>6</sup>/well) in complete medium with and without the addition of a crude preparation of Tc-Ag at a concentration equivalent to 5  $\times$  10<sup>6</sup> parasites/well, as previously described [29].

### 2.10. Flow cytometry analysis of splenocytes

Red blood cell-depleted splenocytes (2  $\times$  10<sup>5</sup>/well) were incubated with blocking buffer (5% fetal calf sera and 1% mouse serum in PBS) for 30 minutes to block Fc receptors followed by the addition of a single phenotyping antibody in replicate wells: anti-CD4-PE, CD8-PerCP, CD11b-FITC, or CD11c-FITC

(eBioscience, San Diego, CA, USA). After staining, immune cell subpopulations within each splenocyte preparation were quantified by flow cytometry (Accuri C5, BD Bioscience). Data are expressed as percentage of cells expressing a given cell surface marker relative to all cells present in the sample.

### 2.11. Multiplex bead-based cytokine and chemokine analysis

Spleen cells from uninfected and infected mice treated with PBS, CO, or FO from the 12th day of infection were cultured (5  $\times$  10<sup>6</sup>/well) in 48-well flat-bottom plates in complete RPMI medium and stimulated with Tc-Ag (5  $\times$  10<sup>6</sup> parasites/well). After 8 hours of culture, the medium was collected, and the ex vivo production of various cytokines and chemokines was quantified as described below. Concentrations of granulocyte macrophage colony-stimulating factor, IFN-gamma-inducible protein 10, keratinocyte chemoattractant (KC), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), regulated upon activation normal T cell expressed and secreted (RANTES), TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , interleukin (IL)-10, IL-6, and IL-1 $\alpha$  were measured by a bead-based multiplexing kit (EMD Millipore Corp, Billerica, MA, USA).

Just prior to analyses, samples were thawed, mixed, and then diluted 1:2 in the assay buffer provided in the kit. Following dilution, samples were centrifuged (3000g, 5 minutes) to remove debris. Aliquots of each sample were combined with premixed magnetic beads provided in the kit. Additional washing and sample preparation were conducted as described by the manufacturer. For magnetic bead assays, our instrument (Luminex MAGPIX with exponent software) was calibrated with the MAGPIX Calibration Kit (Millipore cat# 40-049), and performance was verified with the MAGPIX Performance Verification Kit (Millipore cat# 40-050). There was no or negligible cross-reactivity between the antibodies for an analyze and any of the other analytes in this panel, except for macrophage inflammatory protein (MIP)-1 $\alpha$ / $\beta$ . MIP-1 $\beta$  cross-reacts with MIP-1 $\alpha$  beads 27%. Intraassay precision averaged ~5% for most analytes, with a range of 2.3% to 12.5%. Accuracy of the kit averaged more than 90% recovery of a spike, with a range of 74.4% to 101.5%.

### 2.12. Measurement of prostaglandin E<sub>2</sub> concentrations

Spleen cells from uninfected and infected mice treated with PBS, CO, or FO from the 12th day of infection were cultured (5  $\times$  10<sup>6</sup>/well) in 48-well flat-bottom plates in complete RPMI medium and stimulated with Tc-Ag (5  $\times$  10<sup>6</sup> parasites/well). After 8 hours of culture, the medium was collected, and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) concentrations were determined by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay kit obtained from Cayman Chemical Co (Ann Arbor, MI, USA). The test was performed according to the instructions of the manufacturers of the kits; samples from infected mice were diluted before analysis. The sensitivity of this assay was 15.6 to 2000 pg/mL.

### 2.13. Statistical analyses

A power analysis conducted prior to the experiment showed that with a minimum of 5 mice/group at an  $\alpha$  = .05, there was

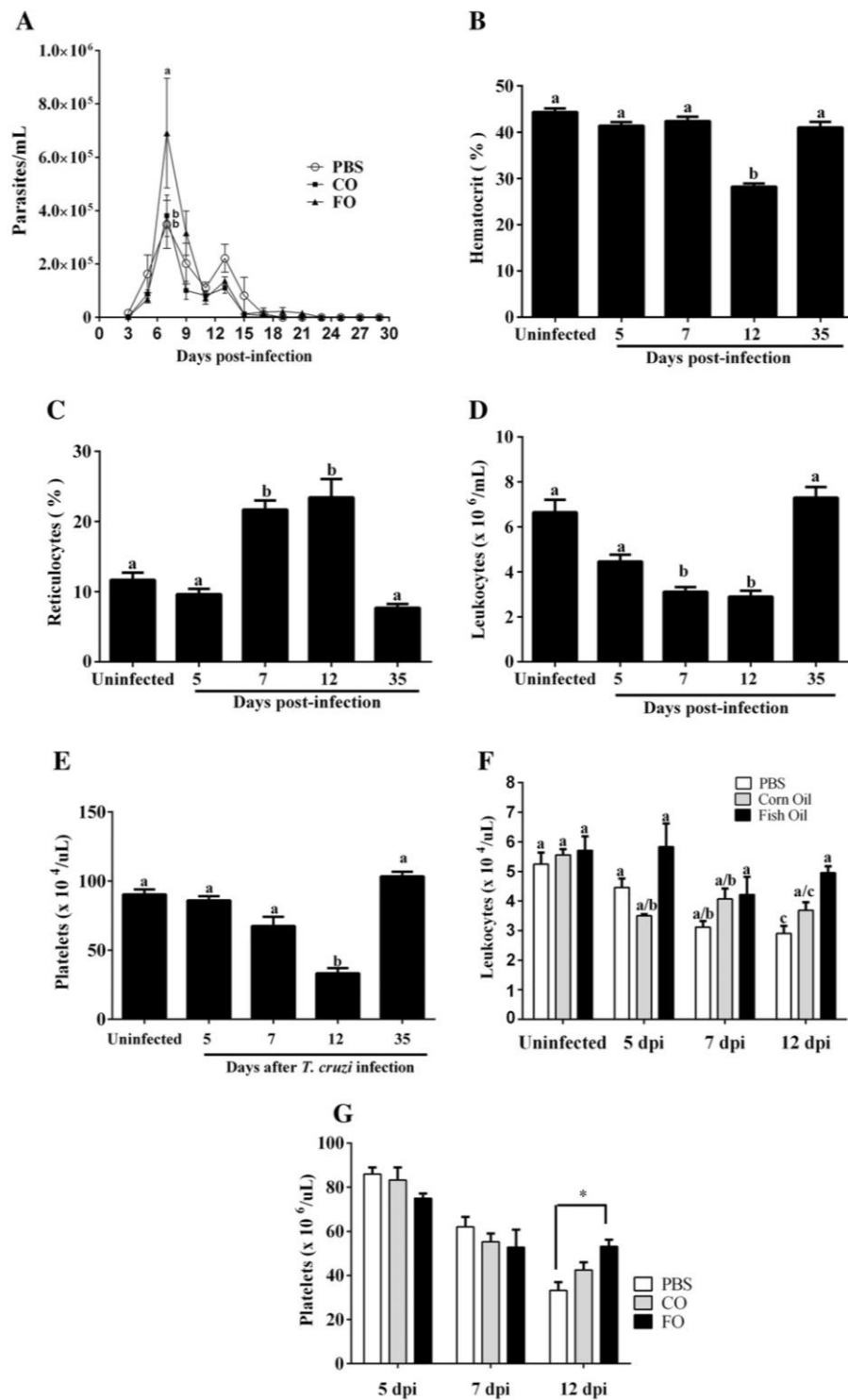


Fig. 1 - Effects of FO supplementation on the course of *T. cruzi* infection. From 15 days before *T. cruzi* infection to the 30th dpi, C57BL/6 mice were supplemented by gavage with 0.6% (v/w) (1) PBS, (2) CO, or (3) FO. C57BL/6 mice were infected with  $5 \times 10^3$  blood trypomastigotes *T. cruzi* (Y strain). Parasitemia (A), hematological values in uninfected and *T. cruzi*-infected mice at 5, 7, 12, and 35 dpi, for hematocrit (B), reticulocytes (C), leukocytes (D), and platelets (E) are shown. The treatment of mice with FO prior to and during the *T. cruzi* infection ameliorated the leukopenia (F) and thrombocytopenia (G) observed on 12 dpi. Values represent the means  $\pm$  standard error and are representative of 2 independent experiments using 4-5 mice per group. Means not sharing letter are significantly different ( $P < .05$ , 2-way ANOVA with Bonferroni post test).

**Table 1 – Initial body weight and changes in body weight (expressed in grams) at selected times in response to oral fat supplementation and *T cruzi* infection**

Group	Phase I: fat supplementation				Phase II: dpi		
	Day 0	Day 5	Day 10	Day 15	5 dpi	10 dpi	15 dpi
PBS	22.3 ± 0.6	0.9 ± 0.2	1.8 ± 0.2 <sup>a</sup>	2.1 ± 0.3	1.1 ± 0.2	-1.5 ± 0.8	-1.0 ± 1.1 <sup>a</sup>
CO	20.8 ± 0.5	0.1 ± 0.1	0.8 ± 0.2 <sup>b</sup>	1.2 ± 0.3	1.2 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.3 ± 0.2 <sup>b</sup>
FO	22.7 ± 0.7	0.3 ± 0.1	1.0 ± 0.2 <sup>ab</sup>	1.4 ± 0.2	1.4 ± 0.2	0.4 ± 0.3	0.1 ± 0.5 <sup>b</sup>

From 15 days before *T cruzi* infection until 15 dpi, C57BL/6 mice were supplemented by gavage (0.6% v/w) with (1) PBS, a negative control group; (2) CO; or (3) menhaden FO. All mice were infected with  $5 \times 10^3$  blood trypomastigotes *T cruzi* (Y strain). Values shown represent means ± SEM, n = 20–25 per group. Means within columns that do not share a common superscripted letter are statistically different ( $P < .05$ ) according to ANOVA followed by Bonferroni multiple-comparison adjustment.

an 80% power to detect a difference in parasitemia and hematocrit among the treatment groups. Results are expressed as means ± SEM. A repeated-measures analysis of variance (ANOVA) was used for the parasitemia data shown in Fig. 1A because these data represent blood samples from the same mice over time. In contrast, time (ie, dpi) in all other data presented represents separate cohorts of mice within each treatment group. Therefore, we evaluated possible impact of LC n-3 PUFA supplementation on these parameters by using ANOVA followed by Bonferroni multiple-comparison test. Results were considered significant when  $P < .05$ . All statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 5 software package (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

### 3. Results

#### 3.1. Effect of fat supplementation and *T cruzi* challenge on body weight

Changes in body weight associated with fat supplementation before and after infection are shown in Table 1. The CO-treated mice started out 1.5 g lighter than the PBS-treated control group and by the 10th day of gavaging had gained less than half of the weight of the control mice ( $P < .05$ ). After 15 days of supplementation (before infection), mice supplemented with CO or FO

showed a tendency for a lower weight gain compared with PBS-supplemented mice, but these differences were not statistically significant. During the infection, the supplementation with either fat source (ie, CO or FO) prevented the weight loss observed in PBS-treated mice, with significant differences noted on day 15 postinfection ( $P < .05$ , Table 1).

#### 3.2. Effects of FO supplementation on the course of *T cruzi* infection

On 3 and 5 dpi, parasitemia was similar between the fat-supplemented and PBS-treated mice (Fig. 1A). The parasitic load in the blood peaked on 7 dpi and was significantly higher in FO-supplemented mice than in PBS- and CO-supplemented groups ( $P < .001$ ). Parasitemia declined sharply over the next 4 days (ie, 9 and 11 dpi), and by 17 dpi, parasite burden in the blood appeared to be well controlled regardless of treatment (Fig. 1A). On the 30 dpi, all mice were alive and remained so until the end of the experiment.

#### 3.3. FO supplementation ameliorates leukopenia and thrombocytopenia in the early of *T cruzi* infection

As expected, mice infected with *T cruzi* developed anemia as noted by a significant drop in hematocrit (Fig. 1B) and an elevation in reticulocytes (Fig. 1C). Furthermore, leukopenia (Fig. 1D) and thrombocytopenia (Fig. 1E) were observed. These

**Table 2 – Effect of CO or FO supplementation on peripheral blood cell parameters, spleen weight and cellularity, and bone marrow cellularity in uninfected C57BL/6 mice**

Treatment groups	PBS	CO	FO	P value
<b>Peripheral blood</b>				
Hematocrit (%)	43.4 ± 2.5	43.8 ± 2.2	44.1 ± 1.3	NS
Reticulocytes (%)	11.0 ± 3.1	10.6 ± 1.7	8.9 ± 1.6	NS
Platelets ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	90.2 ± 13.5	96.7 ± 15.2	86.2 ± 13.2	NS
Total Leukocytes ( $\times 10^6/\text{mL}$ )	6.3 ± 1.6	5.7 ± 0.6	6.1 ± 1.7	NS
Lymphocytes ( $\times 10^6/\text{mL}$ )	4.5 ± 1.1	4.2 ± 0.8	4.2 ± 1.2	NS
Neutrophils ( $\times 10^6/\text{mL}$ )	0.9 ± 0.4	0.9 ± 0.3	0.8 ± 0.4	NS
Monocytes ( $\times 10^6/\text{mL}$ )	0.4 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.4 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.1 <sup>b</sup>	<.05
<b>Spleen</b>				
Spleen weight (mg)	73.0 ± 2.2 <sup>a</sup>	76.0 ± 4.7 <sup>a</sup>	90.8 ± 3.7 <sup>b</sup>	<.05
Spleen cellularity ( $\times 10^6$ )	88.5 ± 9.6 <sup>a</sup>	96.0 ± 10.2 <sup>a</sup>	126.6 ± 6.3 <sup>b</sup>	<.05
<b>Bone marrow</b>				
Cellularity ( $\times 10^9/\text{mL}$ )	5.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	5.4 ± 0.3 <sup>a</sup>	7.8 ± 0.5 <sup>b</sup>	<.05

C57BL6 mice were gavaged daily with 0.6% (v/w) of (1) PBS, (2) CO, or (3) menhaden FO during 30 days. Data represent means ± SE, (n = 5 mice/group). Within each row, means not sharing a superscript letter are significantly different ( $P < .05$ , ANOVA with Bonferroni post test). NS = not significant ( $P > .05$ ).

hematological values returned to normal by 35 dpi (Fig. 1B-E). The treatment of mice with FO prior to and during the *T. cruzi* infection ameliorated the leukopenia (Fig. 1F,  $P < .001$ ) and thrombocytopenia (Fig. 1G,  $P < .05$ ) observed on 12 dpi; however, no significant treatment effects were observed in hematocrit and reticulocyte counts.

### 3.4. Effects of FO supplementation on spleen, peripheral blood, and bone marrow cells from uninfected mice

The effects of LC n-3 PUFA supplementation on the spleen, peripheral blood, and bone marrow from uninfected mice are summarized in Table 2. FO-supplemented mice had spleens that were heavier ( $P < .05$ ) and contained more cells (ie, cellularity,  $P < .05$ ) compared with mice treated with CO or PBS. Bone marrow cellularity was higher and monocytes lower in the FO-supplemented mice compared with mice treated with CO or PBS (Table 2). In contrast, there was no discernable impact of lipid treatments on hematocrit, total reticulocyte, and neutrophil counts in the peripheral blood of infected mice (Table 3). However, we observed a significant increase in circulating lymphocytes and monocytes and spleen parameters in FO-treated mice compared with CO- or PBS-supplemented mice (Table 3).

### 3.5. Effect of FO supplementation on cardiac parasitism

Cardiac parasitism was evaluated by counting amastigote nests in heart collected in the 12th day of infection. FO-supplemented mice had fewer parasites nests in their heart tissue than mice supplemented with CO or PBS (Fig. 2A,  $P < .05$ ). Additionally, the amastigote nests in the heart of PBS- or CO-supplemented mice appeared to be larger and better defined compared with parasite nests found in FO-supplemented mice (Fig. 2B).

### 3.6. NO production

As expected, *T. cruzi* infection triggered an elevation in circulating NO (Fig. 3A) and NO in heart tissue (Fig. 3B). Importantly, compared with PBS- and CO-treated mice, FO-supplemented mice had significantly lower plasma NO on 7 dpi (Fig. 3A,  $P < .05$ ). Similarly, significantly lower NO content

was observed in the cardiac tissue in FO-supplemented mice compared with mice treated with either PBS or CO, but this was only significant on 12 dpi (Fig. 3B,  $P < .05$ ).

### 3.7. PGE<sub>2</sub> production by cultured spleen cells

Compared with splenocytes collected from uninfected mice, those from mice on day 12 postinfection produced ~3-fold higher levels of PGE<sub>2</sub> production in the absence of a stimuli (ie, medium), whereas this difference was ~20-fold by Tc-Ag-stimulated splenocytes (Fig. 4). In both uninfected as well as infected mice, splenocytes from FO-supplemented mice showed significantly lower PGE<sub>2</sub> production compared with PBS- and CO-treated mice (Fig. 4A and B).

### 3.8. Effects of FO supplementation on basal and antigen-specific ex vivo chemokine and cytokine production by spleen cells

As expected, splenocytes isolated from *T. cruzi*-infected mice demonstrated substantial higher basal, as well as antigen-stimulated (ie, Tc-Ag), ex vivo production of chemokines (Fig. 5A) and cytokines (Fig. 5B). The most notable treatment effect involved ex vivo MCP-1 production, where Tc-Ag-stimulated spleen cells from 12-dpi mice were significantly (>2-fold,  $P < .001$ ) higher in FO-supplemented mice compared with PBS- and CO-treated mice. Ex vivo production of IL-10 upon Tc-Ag stimulation was highest from splenocytes isolated from FO-treated, compared with CO- and PBS-treated, mice. However, FO treatment was not always associated with higher ex vivo cytokine/chemokine production. One notable example of this was the production of granulocyte macrophage colony-stimulating factor, which was 10%-15% lower ( $P < .05$ ) in antigen-stimulated splenocytes isolated from 12 dpi FO-treated mice when compared with either PBS- or CO-treated mice (Fig. 5B).

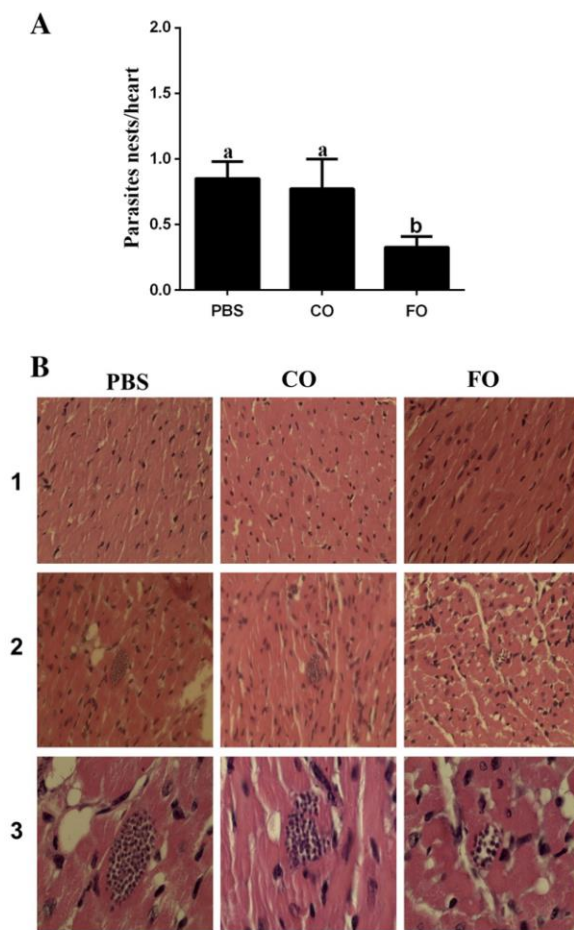
### 3.9. Spleen cell phenotyping

Flow cytometry analyses of spleen cells indicate that LC n-3 PUFA supplementation failed to affect the percentage of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes or CD11b<sup>+</sup> cells in the spleen in uninfected and 12-dpi mice (Fig. 6A, B, and C, respectively).

**Table 3 – Effect of CO or FO supplementation on peripheral blood cell parameters, spleen weight and cellularity, and bone marrow cellularity in *T. cruzi*-infected mice on day 12 postinfection**

	PBS	CO	FO	P
<b>Peripheral blood</b>				
Hematocrit (%)	28.2 ± 0.7	28.1 ± 0.6	28.9 ± 0.9	NS
Reticulocytes (%)	24.9 ± 2.5	28.0 ± 2.6	28.2 ± 2.8	NS
Lymphocytes (×10 <sup>6</sup> /mL)	1.5 ± 0.1	2.6 ± 0.2	3.6 ± 0.2	<.001
Neutrophils (×10 <sup>6</sup> /mL)	0.9 ± 0.08	0.8 ± 0.07	0.9 ± 0.05	NS
Monocytes (×10 <sup>6</sup> /mL)	0.2 ± 0.03	0.2 ± 0.03	0.3 ± 0.02	<.05
<b>Spleen</b>				
Spleen weight (mg)	526 ± 37 <sup>a</sup>	556 ± 42 <sup>a</sup>	669 ± 32 <sup>b</sup>	<.05
Spleen cellularity (×10 <sup>6</sup> )	306 ± 44	351 ± 41	601 ± 1	<.01
<b>Bone marrow</b>				
Cellularity (×10 <sup>9</sup> /mL)	4.3 ± 0.5	4.3 ± 0.4	4.5 ± 0.3	NS

From 15 days before *T. cruzi* infection to the day 12 postinfection, C57BL6 mice were gavaged daily with 0.6% (v/w) of (1) PBS, (2) CO, or (3) menhaden FO. Mice were infected with  $5 \times 10^3$  blood trypomastigotes *T. cruzi* (Y strain). Data represent means ± SEM (n = 5 mice/group). Within each row, means not sharing superscript letter are significantly different ( $P < .05$ , ANOVA with Bonferroni post test).

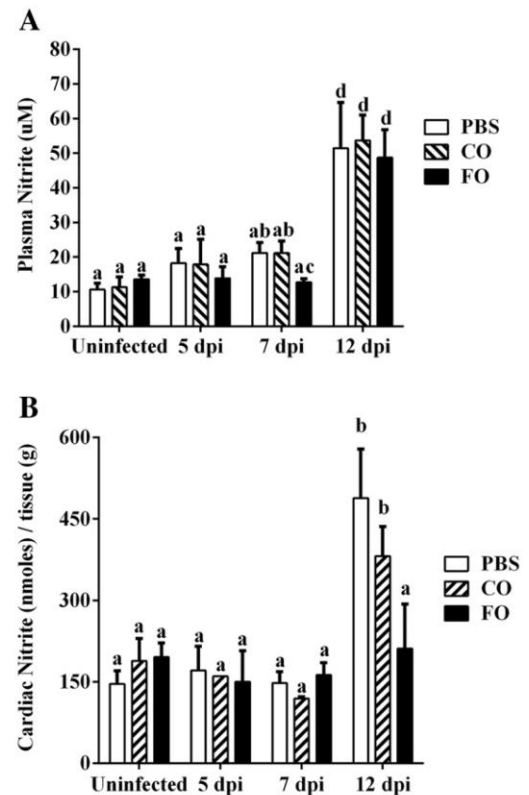


**Fig. 2 – Effects of FO supplementation on cardiac parasitism.** From 15 days before *T cruzi* infection until the 12th dpi, C57BL/6 mice were supplemented by gavage with 0.6% (v/w) (1) PBS, (2) CO, or (3) menhaden FO. C57BL/6 mice were infected with  $5 \times 10^3$  blood trypomastigotes *T cruzi* (Y strain). Cardiac parasitism (A): 3 heart sections were counted for each animal, and the result is expressed as means  $\pm$  SEM of 3 sections from 5 animals per group and are representative of 2 independent experiments. Cardiac tissue (B) were examined by hematoxylin and eosin staining from uninfected mice (1) on day 12 after *T cruzi* infection (2 and 3). Original magnifications were  $\times 400$  (1 and 2) and  $\times 1000$  (3).

Surprisingly, uninfected FO-treated mice had more than twice the percentage of CD11c<sup>+</sup> in their spleen compared with PBS- and CO-supplemented mice (Fig. 6D,  $P < .05$ ).

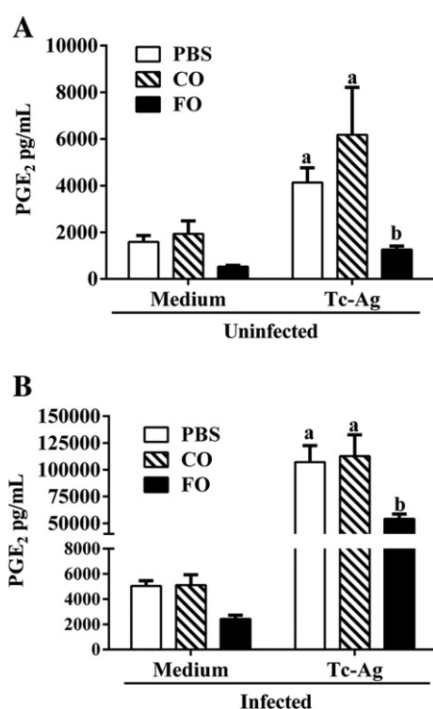
#### 4. Discussion

It is well documented that nutritional deficiency impairs host resistance to a variety of infectious agents, including trypanosomal parasites [30]. Predicting how LC n-3 PUFA-mediated changes in inflammation and immune cell function impact host resistance to infection is challenging. In 1958,



**Fig. 3 – Effects of FO supplementation on NO production in mice infected with *T cruzi*.** From 15 days before *T cruzi* infection to the 12th dpi, C57BL/6 mice were supplemented by gavage with 0.6% (v/w) (1) PBS, (2) CO, or (3) FO. C57BL/6 mice were infected with  $5 \times 10^3$  blood trypomastigotes *T cruzi* (Y strain). NO was determined by measuring nitrite levels in plasma (A) and cardiac tissue (B) using the cadmium-cooper system followed by Griess reaction. The results are expressed as means  $\pm$  SEM from 5 animals per group and are representative of 2 independent experiments. Means not sharing a letter are significantly different ( $P < .05$ , 2-way ANOVA with Bonferroni post test).

Godfrey [31] reported that feeding mice a diet containing cod liver oil, a dietary fat rich in LC n-3 PUFA as well as vitamins A and D, suppressed infections from *T congolense* and *T vivax* but not *T cruzi* or *T brucei*. These adverse effects on host resistance were reversed by supplementation with vitamin E, suggesting that diet-induced oxidative stress and vitamin E deficiency were central to this particular diet-infection relationship. Our research group is particularly interested in the protozoan parasite *T cruzi*, the causative agent of CD. In 1995, Takeda et al [18] reported that daily oral administration of EPA, one of the predominant LC n-3 PUFA in FO, to healthy mice greatly diminished host survival following an experimental challenge with *T cruzi* (ie, mortality rates of 37.5% vs 12.5% for EPA-treated and untreated mice, respectively). These authors included supplemental vitamin E in their EPA treatment to try to avoid the oxidative stress problem implicated in the earlier 1958 study. Additionally, they reported that their EPA treatment failed to impact tissue parasitemia but was associated with



**Fig. 4** – Effects of FO supplementation on production of PGE<sub>2</sub> by spleen cells from mice infected with *T. cruzi*. From 15 days before *T. cruzi* infection to the 7th dpi, C57BL/6 mice were supplemented by gavage with 0.6% (v/w) (1) PBS, (2) CO, or (3) FO. C57BL/6 mice were infected with  $5 \times 10^3$  blood trypomastigotes *T. cruzi* (Y strain). Splenocytes ( $5 \times 10^6$  cells/well) from uninfected (A) or *T. cruzi*-infected mice (B) were cultured with and without Tc-Ag. Supernatants were harvested after 8 hours, and PGE<sub>2</sub> was quantified in supernatants by EIA. The results are expressed as means  $\pm$  SEM from 4 animals per group and are representative of 2 independent experiments. Means not sharing letter are significantly different ( $P < .05$ , 2-way ANOVA with Bonferroni post test).

elevated capacity to produce the inflammatory cytokine TNF $\alpha$ . In contrast, in our study, we found that FO supplementation resulted in no change in mortality, but it did alter the course of parasitemia as well as other potentially important host responses. We noted a transient, but substantial, increase in peak circulating parasitic load at an early stage of the infection (ie, 7 dpi) in FO-treated mice compared with the saline-treated mice. Surprisingly, just a few days later (ie, 12 dpi), FO-treated mice had similar levels of parasitemia in the blood but significantly fewer parasites in their cardiac tissue compared with mice treated with saline or CO, an alternative fat source. Inclusion of the CO treatment group is one of the strengths of our study. Administration of fat to mice by gavage provides energy that can diminish voluntary food intake, resulting in unintended reductions in other macro- and micronutrients, such as protein, vitamins, and minerals. Inclusion of CO-treated mice allowed us to distinguish between the effects of higher LC n-3 PUFA intake over the intake of just any fat or, in our case, of CO, a fat rich in the n-6 PUFA linoleic acid.

*T. cruzi* infection is associated with anemia, thrombocytopenia, leukopenia, and bone marrow hypoplasia [5-8,19,21].

As expected, once infected with *T. cruzi*, our mice experienced a transient anemia that was accompanied by a corresponding increase in circulating reticulocytes (ie, immature erythrocytes). FO supplementation had no effect on the anemia, a finding that is in contrast with malarial-induced anemia for which treatment with LC n-3 PUFA reportedly prevents [32]. In contrast to anemia, FO treatment did significantly diminish the severity of the thrombocytopenia and leukopenia manifested in the early stages of *T. cruzi* infection. A limitation in the approach that we used in this study is that we were not able to distinguish whether the FO treatment reduced cell loss or promoted more rapid replacement from the bone marrow and other hematopoietic tissues.

Although we saw no indication that bone marrow cellularity was affected by FO treatment, we did note that the spleens from these mice were significantly larger and contained greater total cell numbers and specifically more CD11c<sup>+</sup> cells. FO-induced splenomegaly has been reported previously [33-35]. Experiments with T-cell-deficient nude mice and experiments using macrophage depletion through liposomal dichloromethylene-biphosphonate treatment revealed that the increase in spleen cellularity is T-cell independent and largely due to macrophages accumulation in the spleen [36]. Moreover, PGE<sub>2</sub> has an important modulatory effect on hematopoiesis in mice, reducing bone marrow and spleen cellularity, whereas blockade of PGE<sub>2</sub> biosynthesis increases bone marrow and spleen cellularity [37-39]. These data may partly explain our results obtained in the present study because dietary supplementation with LC n-3 PUFA decreases splenic PGE<sub>2</sub> production in our study. Additionally, in our study, we observed greater ex vivo MCP-1 production by splenocytes isolated from FO-treated mice compared with those from PBS- or CO-treated mice. This FO effect was most robust when splenocytes originated from *T. cruzi*-infected mice and they were restimulated in an antigen-specific manner with a crude Tc-Ag preparation. Additional experiments are needed to determine if changes in PGE<sub>2</sub> or MCP-1 production are both necessary and sufficient to explain FO-associated changes in splenic CD11c<sup>+</sup> cells.

During *T. cruzi* infection, NO modulates the effector leukocyte machinery through diverse mechanisms. This process involves trypanocidal effects derived from toxic-free radicals (eg, peroxynitrite) generated after NO biosynthesis, as well as regulation/enhancement of inflammatory response induced during this type of infection [40]. Importantly, we found that FO supplementation was associated with lower circulating NO and diminished NO production in cardiac tissue in an early stage of *T. cruzi* infection. Lower systematic NO production could explain the higher blood parasite burden on day 7 postinfection in FO-supplemented mice. In contrast, lower NO production by cardiac tissue homogenates from FO-supplemented mice may be a consequence of the lower parasite load. Cardiac tissue is an important target of *T. cruzi* infection [1,41]. The functional effects of myocardial iNOS expression are controversial, with poorly understood feedback mechanisms between iNOS expression and NO production in different pathological conditions [42].

Lipids mediators, such as PGE<sub>2</sub>, play an important role in host defense against *T. cruzi* [21,28,43]. Our data indicated that LC n-3 PUFA supplementation was associated with reduced antigen-stimulated production of PGE<sub>2</sub>. Previously, we

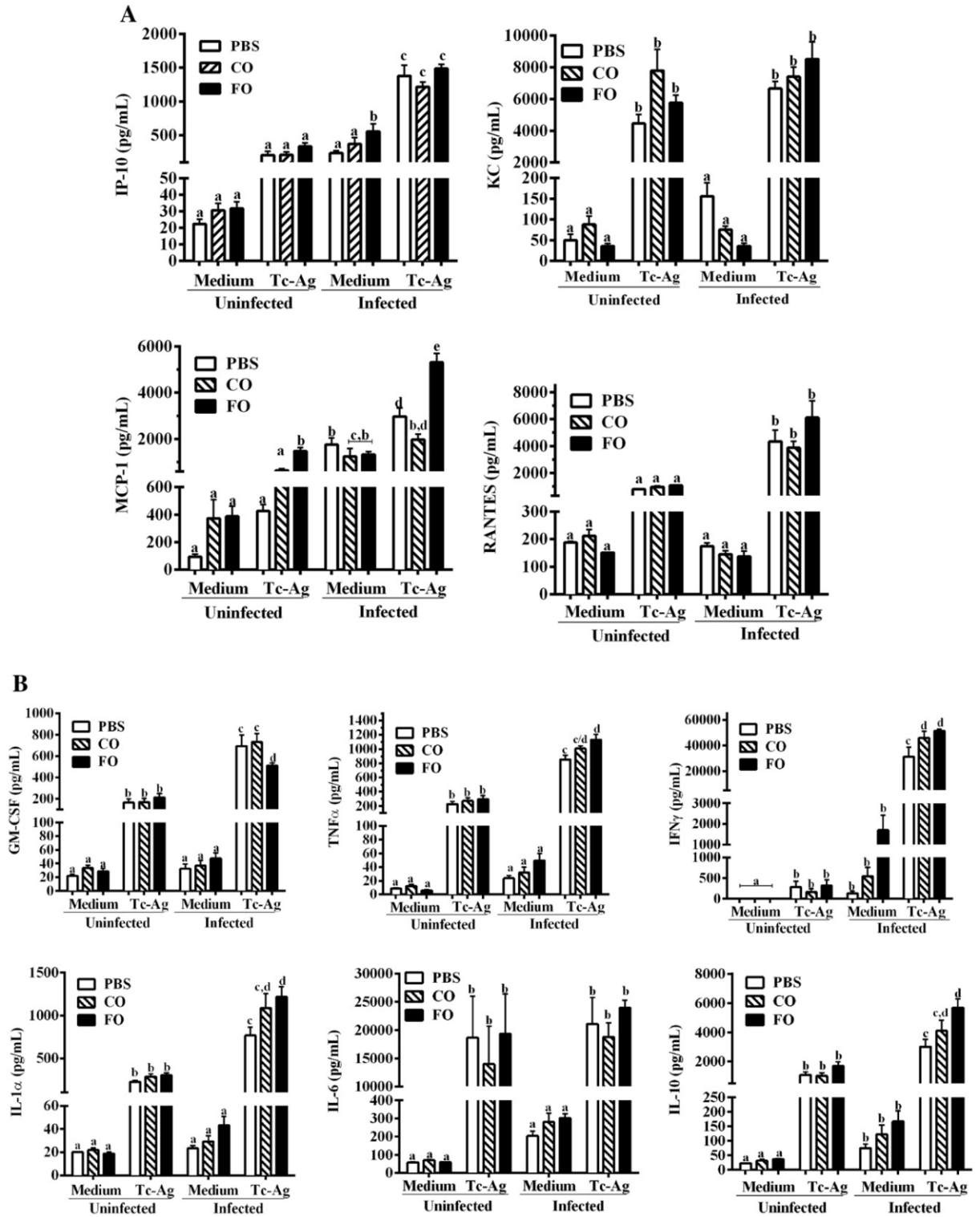
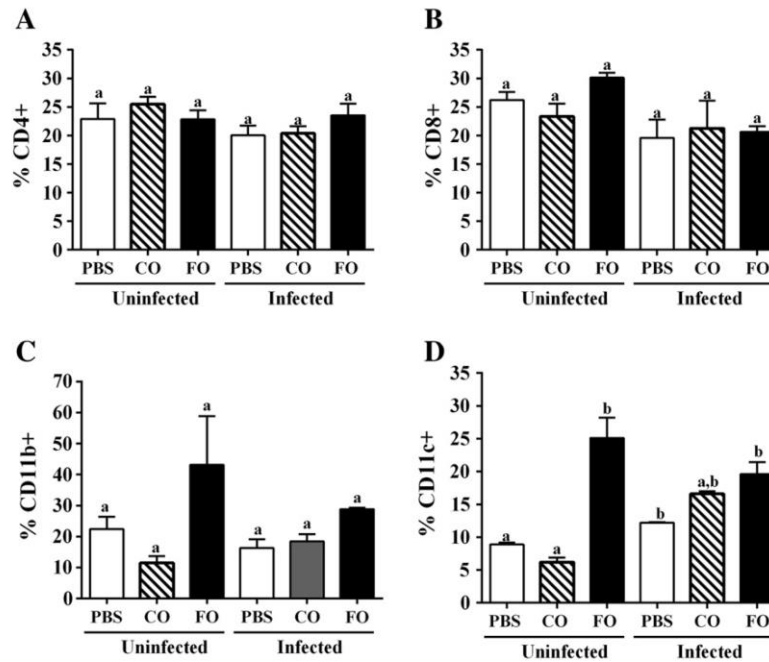


Fig. 5 – Effects of FO supplementation on production of MCP-1, KC, RANTES, IL-10, and TNF- $\alpha$  by Tc-Ag-stimulated spleen cells. From 15 days before *T. cruzi* infection to the 7th dpi, C57BL/6 mice were supplemented by gavage with 0.6% (v/w) (1) PBS, (2) CO, or (3) FO. C57BL/6 mice were infected with  $5 \times 10^3$  blood trypomastigotes *T. cruzi* (Y strain). Splenocytes ( $5 \times 10^6$  cells/well) from uninfected or *T. cruzi*-infected mice were cultured with and without Tc-Ag. Supernatants were harvested after 72 hours; chemokines (A) and cytokines (B) were quantified in supernatants by bead-based multiplexing kit. The results are expressed as means  $\pm$  SEM from 5 to 6 animals per group. Means not sharing letter are significantly different ( $P < .05$ , 2-way ANOVA with Bonferroni post test).



**Fig. 6** – Effects of FO supplementation on spleen cell population of lymphocytes, macrophages, and dendritic cells. From 15 days before *T. cruzi* infection to the 7th dpi, C57BL/6 mice were supplemented by gavage with 0.6% (v/w) (1) PBS, (2) CO, or (3) FO. C57BL/6 mice were infected with  $5 \times 10^3$  blood trypomastigotes *T. cruzi* (Y strain). Splenocytes ( $2 \times 10^5$  cells/well) from uninfected or *T. cruzi*-infected mice were harvested; stained with phenotyping antibodies anti-CD4-PE, CD8-PerCP, CD11b-FITC, and CD11c-FITC (eBioscience, San Diego, CA, USA); and analyzed by flow cytometry (Accuri C5, BD Bioscience, San Diego, CA, USA). The results are expressed as means  $\pm$  SEM from 3 to 4 animals per group. CD4+ (A), CD8+ (B), CD11c+ (C), and CD11b+ (D). Means not sharing letter are significantly different ( $P < .05$ , 2-way ANOVA with Bonferroni post test).

reported that indomethacin, a potent inhibitor of prostaglandin synthesis, reduced NO synthesis and enhanced TNF $\alpha$  production by spleen cells stimulated with Tc-Ag [29]. In the current study, we reported that FO supplementation increased antigen-stimulated TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  production compared with that produced by splenocytes from PBS-treated mice. Enhancement of immune cell TNF $\alpha$  production was found in other studies with mice fed with FO [44,45]. Higher levels of IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  in cardiac tissue are associated with lower levels of IL-4 and IL-10 in both cardiac and more severe forms of CD, and high levels of IL-10 or moderate levels of IFN $\gamma$  are associated with the indeterminate form [46,47]. Recently, it was suggested that omega-3 PUFA supplementation may reduce inflammation within the heart in chronic chagasic cardiomyopathy patients, in part by modifying inflammatory cytokine biosynthesis [48]. It remains to be determined whether similar changes in immune cell cytokine/chemokine production are predictive of the progression and/or resolution of CD in human patients.

In conclusion, using a well-established mouse model of this human disease, we have shown that FO supplementation can have multiple effects on host response to a *T. cruzi* infection. In general, LC n-3 PUFA supplementation was associated with less severe symptoms during the acute phase of this parasitic infection. Whether or not oral supplementation with LC n-3 PUFA could benefit humans diagnosed with CD remains to be tested.

## Acknowledgment

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Edital Universal 14-2014) and Fundação Araucária (grant 419-2009). MILM, NGZ, and RV da Silva received scholarships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. NOSC and PPF received research fellowships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. The authors declare that there are no conflicts of interest.

## REFERENCES

- [1] Bern C. Chagas' disease. *N Engl J Med* 2015;373:1882.
- [2] Coura JR, Vinas PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* 2010;465:S6–7.
- [3] Alvarez JM, Fonseca R, Borges da Silva H, Marinho CR, Bortoluci KR, Sardinha LR, et al. Chagas disease: still many unsolved issues. *Mediat Inflamm* 2014;2014:912965.
- [4] Miguel CE, Bortoluzzi TB, Otaviano AP, Cardinalli-Neto A, Rocha BF, Ferrari SJ, et al. Prognostic significance of anemia in patients with chronic systolic heart failure secondary to Chagas' cardiomyopathy. *Acta Trop* 2011; 120:219–23.
- [5] Cardoso JE, Brener Z. Hematological changes in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1980;75:97–104.



- [6] Repka D, Rangel HA, Atta AM, Gavino VA, Piedrabuena AE. Experimental Chagas' disease in mice infected with one LD50 of parasite. *Rev Bras Biol* 1985;45:309–16.
- [7] Marcondes MC, Borelli P, Yoshida N, Russo M. Acute *Trypanosoma cruzi* infection is associated with anemia, thrombocytopenia, leukopenia, and bone marrow hypoplasia: reversal by nifurtimox treatment. *Microbes Infect* 2000;2:347–52.
- [8] Malvezi AD, Cecchini R, de Souza F, Tadokoro CE, Rizzo LV, Pinge-Filho P. Involvement of nitric oxide (NO) and TNF- $\alpha$  in the oxidative stress associated with anemia in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004;41:69–77.
- [9] Silva JS, Vespa GN, Cardoso MA, Aliberti JC, Cunha FQ. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infect Immun* 1995;63:4862–7.
- [10] Machado FS, Martins GA, Aliberti JC, Mestriner FL, Cunha FQ, Silva JS. *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation* 2000;102:3003–8.
- [11] Scrimshaw NS, SanGiovanni JP. Synergism of nutrition, infection, and immunity: an overview. *Am J Clin Nutr* 1997;66:464S–77S.
- [12] Harbig LS. Nutrition and immunity with emphasis on infection and autoimmune disease. *Nutr Health* 1996;10:285–312.
- [13] Field CJ, Johnson IR, Schley PD. Nutrients and their role in host resistance to infection. *J Leukoc Biol* 2002;71:16–32.
- [14] Fritsche K. Fatty acids as modulators of the immune response. *Annu Rev Nutr* 2006;26:45–73.
- [15] Calder PC. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? *Br J Clin Pharmacol* 2013;75:645–62.
- [16] Klasing KC. Nutritional modulation of resistance to infectious diseases. *Poult Sci* 1998;77:1119–25.
- [17] de Pablo MA, Angeles Puertollano M, Alvarez de Cienfuegos G. Immune cell functions, lipids and host natural resistance. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000;29:323–8.
- [18] Takeda GK, Starobinas N, Marcondes MC, Mello EA, Russo M, Stolf AM. Oral administration of fish-oil induces high levels of seric TNF in *Trypanosoma cruzi* infected C57BL/6 mice. *Acta Trop* 1995;60:215–9.
- [19] Estevam M, Appoloni CR, Malvezi AD, Tatakahara VL, Panis C, Cecchini R, et al. *Trypanosoma cruzi*: in vivo evaluation of iron in skin employing X-ray fluorescence (XRF) in mouse strains that differ in their susceptibility to infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012;64:334–42.
- [20] Trischmann TM. *Trypanosoma cruzi*: early parasite proliferation and host resistance in inbred strains of mice. *Exp Parasitol* 1986;62:194–201.
- [21] Hideko Tatakahara VL, Cecchini R, Borges CL, Malvezi AD, Graca-de Souza VK, Yamada-Ogatta SF, et al. Effects of cyclooxygenase inhibitors on parasite burden, anemia and oxidative stress in murine *Trypanosoma cruzi* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008;52:47–58.
- [22] Sukhija PS, Palmquist DL. Rapid method for determination of total fatty acid content and composition of feedstuffs and feces. *J Agric Food Chem* 1988;36:1202–6.
- [23] Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1962;4:389–96.
- [24] Curotto de Lafaille MA, Barbosa de Oliveira LC, Lima GC, Abrahamssohn IA. *Trypanosoma cruzi*: maintenance of parasite-specific T cell responses in lymph nodes during the acute phase of the infection. *Exp Parasitol* 1990;70:164–74.
- [25] Tadokoro CE, de Almeida Abrahamssohn I. Bone marrow-derived macrophages grown in GM-CSF or M-CSF differ in their ability to produce IL-12 and to induce IFN- $\gamma$  production after stimulation with *Trypanosoma cruzi* antigens. *Immunol Lett* 2001;77:31–8.
- [26] Roggero E, Perez AR, Tamae-Kakazu M, Piazzon I, Nepomnaschy I, Besedovsky HO, et al. Endogenous glucocorticoids cause thymus atrophy but are protective during acute *Trypanosoma cruzi* infection. *J Endocrinol* 2006;190:495–503.
- [27] Navarro-Gonzalez JA, Garcia-Benayas C, Arenas J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin Chem* 1998;44:679–81.
- [28] Panis C, Mazzucco TL, Costa CZ, Victorino VJ, Tatakahara VL, Yamauchi LM, et al. *Trypanosoma cruzi*: effect of the absence of 5-lipoxygenase (5-LO)-derived leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice. *Exp Parasitol* 2011;127:58–65.
- [29] Pinge-Filho P, Tadokoro CE, Abrahamssohn IA. Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Cell Immunol* 1999;193:90–8.
- [30] Igbokwe IO. Nutrition in the pathogenesis of African trypanosomiasis. *Protozool Abstr* 1995;19.
- [31] Godfrey DG. Influence of dietary cod liver oil upon *Trypanosoma congolense*, *T. cruzi*, *T. vivax* and *T. brucei*. *Exp Parasitol* 1958;7:255–68.
- [32] Kumaratilake LM, Robinson BS, Ferrante A, Poulos A. Antimalarial properties of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids: in vitro effects on plasmodium falciparum and in vivo effects on *P. berghei*. *J Clin Invest* 1992;89:961–7.
- [33] Irons R, Pinge-Filho P, Fritsche KL. Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids do not affect the in vivo development and function of listeria-specific CD4+ and CD8+ effector and memory/effector T cells in mice. *J Nutr* 2005;135:1151–6.
- [34] Fritsche KL, Cassidy NA, Huang SC. Dietary (n-3) fatty acid and vitamin E interactions in rats: effects on vitamin E status, immune cell prostaglandin E production and primary antibody response. *J Nutr* 1992;122:1009–18.
- [35] Huang SC, Fritsche KL. Alteration in mouse splenic phospholipid fatty acid composition and lymphoid cell populations by dietary fat. *Lipids* 1992;27:25–32.
- [36] Blok WL, de Bruijn MF, Leenen PJ, Eling WM, van Rooijen N, Stanley ER, et al. Dietary n-3 fatty acids increase spleen size and postendotoxin circulating TNF in mice; role of macrophages, macrophage precursors, and colony-stimulating factor-1. *J Immunol* 1996;157:5569–73.
- [37] Gentile P, Byer D, Pelus LM. In vivo modulation of murine myelopoiesis following intravenous administration of prostaglandin E2. *Blood* 1983;62:1100–7.
- [38] Pelus LM, Gentile PS. In vivo modulation of myelopoiesis by prostaglandin E2. III. Induction of suppressor cells in marrow and spleen capable of mediating inhibition of CFU-GM proliferation. *Blood* 1988;71:1633–40.
- [39] Pelus LM. Blockade of prostaglandin biosynthesis in intact mice dramatically augments the expansion of committed myeloid progenitor cells (colony-forming units-granulocyte, macrophage) after acute administration of recombinant human IL-1  $\alpha$ . *J Immunol* 1989;143:4171–9.
- [40] Gutierrez FR, Mineo TW, Pavanelli WR, Guedes PM, Silva JS. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104(Suppl. 1):236–45.
- [41] Lewis MD, Kelly JM. Putting infection dynamics at the heart of Chagas disease. *Trends Parasitol* 2016;32:899–911.
- [42] Shimojo N, Jesmin S, Zaedi S, Soma M, Kobayashi T, Maeda S, et al. EPA effect on NOS gene expression and on NO level in endothelin-1-induced hypertrophied cardiomyocytes. *Exp Biol Med* 2006;231:913–8.
- [43] Borges CL, Cecchini R, Tatakahara VL, Malvezi AD, Yamada-Ogatta SF, Rizzo LV, et al. 5-lipoxygenase plays a role in the control of parasite burden and contributes to oxidative

- damage of erythrocytes in murine Chagas' disease. *Immunol Lett* 2009;123:38–45.
- [44] Lokesh BR, Sayers TJ, Kinsella JE. Interleukin-1 and tumor necrosis factor synthesis by mouse peritoneal macrophages is enhanced by dietary n-3 polyunsaturated fatty acids. *Immunol Lett* 1990;23:281–5.
- [45] Chang HR, Arsenijevic D, Pechere JC, Piguet PF, Mensi N, Girardier L, et al. Dietary supplementation with fish oil enhances in vivo synthesis of tumor necrosis factor. *Immunol Lett* 1992;34:13–7.
- [46] Correa-Oliveira R, Gomes J, Lemos EM, Cardoso GM, Reis DD, Adad S, et al. The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94(Suppl. 1):253–5.
- [47] Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun* 2003;71: 1185–93.
- [48] Silva PS, Sperandio da Silva GM, de Souza AP, Cardoso CS, Fonseca CA, Brito PD, et al. Effects of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation in patients with chronic chagasic cardiomyopathy: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 2013;14:379.