



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUCAS FELIPE DOS SANTOS

**EFEITO DA ASPIRINA SOBRE A RESPOSTA
INFLAMATÓRIA E INTERAÇÃO DE CÉLULAS RAW 264.7
COM VESÍCULAS EXTRACELULARES SECRETADAS POR
*TRYPANOSOMA CRUZI***

Londrina
2022

LUCAS FELIPE DOS SANTOS

**EFEITO DA ASPIRINA SOBRE A RESPOSTA
INFLAMATÓRIA E INTERAÇÃO DE CÉLULAS RAW 264.7
COM VESÍCULAS EXTRACELULARES SECRETADAS POR
*TRYPANOSOMA CRUZI***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Phileno Pinge Filho
Coorientadora: Prof. Dra. Maria Isabel Lovo
Martins Bush Pereira

Londrina
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

S237p Santos, Lucas Felipe dos.
Efeito da Aspirina sobre a Resposta Inflamatória e a Interação de Células RAW 264.7 com Vesículas Extracelulares secretadas por Trypanosoma cruzi / Lucas Felipe dos Santos. - Londrina, 2022.
85 f. : il.

Orientador: Phileno Pinge Filho.
Coorientador: Maria Isabel Lovo Martins Bush Pereira.
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2022.
Inclui bibliografia.

1. Doença de Chagas - Tese. 2. Vesículas Extracelulares - Tese. 3. Aspirina - Tese. 4. Ciclooxigenase - Tese. I. Pinge Filho, Phileno. II. Lovo Martins Bush Pereira, Maria Isabel. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IV. Título.

CDU 579

LUCAS FELIPE DOS SANTOS

**EFEITO DA ASPIRINA SOBRE A RESPOSTA
INFLAMATÓRIA E INTERAÇÃO DE CÉLULAS RAW 264.7
COM VESÍCULAS EXTRACELULARES SECRETADAS POR
*TRYPANOSOMA CRUZI***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Phileno Pinge Filho
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Renata Takayama Kobayashi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Karina Alves de Toledo
Universidade Estadual Paulista – Campus
Assis - UNESP

Londrina, 24 de junho de 2022.

“O caminho para o progresso não é rápido nem fácil”.

Marie Curie

A minha mãe, meu irmão

E toda minha família, dedico...

AGRADECIMENTOS

A Deus por toda sabedoria, discernimento e força tornando esse grande sonho uma realidade.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Phileno Pinge Filho e Prof. Dra. Maria Isabel Lovo Martins Bush Pereira por todo aprendizado, dedicação e confiança. A vocês minha imensa gratidão!

A minha querida e maravilhosa Mãe Fatima que sem ela eu jamais teria chegado até esse momento. Foi quem me deu a vida, me criou, me incentiva e me apoia em todas as decisões. Meu alicerce!

Aos meus avós Rosa e Aparecido por tudo que fizeram desde o meu nascimento até hoje. Meus exemplos! A minha família, meu irmão João Gabriel; minhas tias Maria Célia, Ana Paula, Maria Rosa, Rosemary; meus tios João Carlos, Carlos, José, Marcos Paulo e Mauro, minhas primas Adrieli, Karla, Bárbara, Bianca, Maria Clara, Gabriela, Débora; aos meus primos Vitor, Douglas, Diego e Heitor. Obrigado por participarem ativamente da minha vida

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, Ana Paula, Lucas, Mariana e em especial Raquel. Agradeço por ter estado cada dia com vocês. Por toda ajuda, por sempre me escutarem e me aconselharem durante períodos complicados, mas também pelas risadas e por serem tão incríveis. Minha eterna amizade!

A Cidinha por toda ajuda por discutir metodologias e resultados.

A Gabriella por toda contribuição nesse trabalho.

Aos meus amigos de departamento, Maria Isabel, Fabricio, Barbara, Natalia e Paulo, obrigado por fazerem parte dessa jornada.

Ao meu Pai Benedito, meus avós Maria (*in memorium*) e Gilson, minha tia Elizangela e primos Laís e Matheus, obrigado!

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Microbiologia por todo conhecimento compartilhado. Em especial as professoras Lucy e Ligia. Obrigado por participarem dessa jornada!

Aos professores do Colégio Estadual Tomé de Souza, em especial professores Andreia, Rosemary, Mariza, Bruno, Paula e Adriana. Obrigado pelo incentivo e companheirismo.

A CAPES pelo suporte financeiro.

A todos, MUITO OBRIGADO!

RESUMO

DOS SANTOS, Lucas Felipe. **Efeito da aspirina sobre a resposta inflamatória e a interação de células RAW 264.7 com vesículas extracelulares secretadas por *Trypanosoma cruzi***. 2022. 82 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

Durante a infecção por *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, a resposta imunológica é importante para o controle do parasitismo e sobrevivência do hospedeiro. Macrófagos são células com reconhecida ação tripanocida e que produzem diversos mediadores inflamatórios, como o óxido nítrico (NO) e eicosanóides que atuam no controle da carga parasitária e no desenvolvimento da infecção. Contudo, o parasito apresenta mecanismos de evasão, como a liberação de vesículas extracelulares, que ao carregarem moléculas funcionais, sinalizam para células do hospedeiro, modulando a resposta inflamatória favorecendo o parasito. Os processos de invasão celular e controle da carga parasitária estão sob forte influência de mediadores lipídicos, especialmente aqueles derivados das vias das ciclooxigenases 1 e 2 (COX-1/COX2). A aspirina (ASA) é classificada como um anti-inflamatório não esteroideal que atua no bloqueio de COX-1/COX2 responsáveis pela conversão do ácido araquidônico em eicosanóides. Assim sendo, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da ASA sobre a ação exercida pelas vesículas extracelulares de *T. cruzi* cepa Y (EVs-Y). Foram realizados ensaios de viabilidade celular em macrófagos RAW 264.7 tratados com as concentrações de 0,625mM, 1,25mM e 2,5mM de ASA. Após a infecção dessas células foi determinado o índice de internalização do parasito e quantificado a produção de nitrito como estimativa da produção de NO. Análises estatísticas foram realizadas no programa “*GraphPad Prism 8*”, One-Way ANOVA seguida de teste de *Turkey* de comparações múltiplas. As concentrações de ASA utilizadas não apresentaram citotoxicidade. Macrófagos expostos à EVs-Y e posteriormente infectados com formas tripomastigotas de *T. cruzi* apresentaram menor produção de NO e aumento no número de formas amastigotas no citoplasma, demonstrando a modulação exercida pelas EVs-Y em favor do parasito. Surpreendentemente, quando os macrófagos foram tratados com ASA antes da exposição às EVs-Y e subsequente infecção com tripomastigotas, houve maior produção de NO, assim como menor internalização de parasitos e consequente menor presença de formas amastigotas no citoplasma das células, em comparação com os controles. Esses resultados sugerem que EVs-Y modula a resposta de macrófagos em favor do *T. cruzi* e indicam um papel para COX na modulação imune exercida por EVs-Y.

Palavras-chave: aspirina; vesículas extracelulares; ciclooxigenases; *trypanosoma cruzi*; doença de Chagas.

ABSTRACT

DOS SANTOS, Lucas Felipe. **Effect of aspirin on the inflammatory response and interaction of RAW 264.7 cells with extracellular vesicles secreted by *Trypanosoma cruzi***. 2022. 82 p. Dissertation (Master in Microbiology) - State University of Londrina, Londrina, 2022.

During infection by *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease, the immune response is important for parasitism control and host survival. Macrophages are cells with recognized trypanocidal action and that produce several inflammatory mediators, such as nitric oxide (NO) and eicosanoids that act in the control of the parasite load and in the development of the infection. However, the parasite has evasion mechanisms, such as the release of extracellular vesicles, which, when carrying functional molecules, signal to host cells, modulating the most favorable inflammatory response to the parasite. The processes of cellular invasion and control of the parasite load are under strong influence of lipid mediators, especially those derived from the cyclooxygenase 1 and 2 pathways (COX-1/COX2). Aspirin (ASA) is classified as a non-steroidal anti-inflammatory that acts by blocking COX-1/COX2 responsible for the conversion of arachidonic acid into eicosanoids. Therefore, this study aimed to evaluate the effects of ASA on the action exerted by the extracellular vesicles of *T. cruzi* strain Y (EVs-Y). Cell viability assays were performed on RAW 264.7 macrophages treated with concentrations of 0.625mM, 1.25mM and 2.5mM ASA. After infection of these cells, the parasite internalization index was determined and nitrite production was quantified as an estimate of NO production. Statistical analyzes were performed using the "GraphPad Prism 8" program, One-Way ANOVA followed by Tukey's test of multiple comparisons. The ASA concentrations used did not show cytotoxicity. Macrophages exposed to EVs-Y and later infected with trypomastigote forms of *T. cruzi* showed lower production of NO and an increase in the number of amastigote forms in the cytoplasm, demonstrating the modulation exerted by EVs-Y in favor of the parasite. Surprisingly, when macrophages were treated with ASA before exposure to EVs-Y and subsequent infection with trypomastigotes, there was a higher production of NO, as well as lower parasite internalization and consequent lower presence of amastigote forms in the cytoplasm of cells, compared to controls. These results suggest that EVs-Y modulate the macrophage response in favor of *T. cruzi* and indicate a role for COX in the immune modulation exerted by EVs-Y.

Key words: aspirin; extracellular vesicles; cyclooxygenases; *trypanosoma cruzi*; Chagas disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Transmissão e ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	16
Figura 2 -	Origem de vesículas extracelulares de <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
Figura 3 -	Imunidade inata e adquirida durante a infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
Figura 4 -	Biossíntese de eicosanóides a partir de ácido araquidônico (AA)..	26
Figura 5 -	Exposição de células RAW 264.7 a vesículas extracelulares em associação ao tratamento com aspirina	31
Figura 6 -	Análise do rastreamento de nanopartículas de vesículas extracelulares isolados de <i>T. cruzi</i> Y.....	38
Figura 7 -	Viabilidade de células RAW 264.7 após tratamento com aspirina e com EVs-Y	38
Figura 8 -	Efeito da aspirina na invasão celular pelo <i>T. cruzi</i>	39
Figura 9 -	Efeito da aspirina na invasão celular por <i>T. cruzi</i> mediada por EVs-Y	40
Figura 10 -	Níveis de infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> em células RAW 264.7	40
Figura 11 -	Células RAW 264.7 expostas as EVs-Y e posteriormente infectadas apresentaram menor produção de nitrito	42
Figura 12 -	Células RAW 264.7 ativadas por IFN- γ expostas às EVs-Y e posteriormente infectadas apresentaram menor produção de nitrito	42
Figura 13 -	Resumo dos efeitos do bloqueio da COX na patogênese exercida por EV-Y em macrófagos infectados por <i>T. cruzi</i>	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos tratados para ensaio de viabilidade celular	34
Tabela 2 - Grupos para ensaio de internalização	35
Tabela 3 - Grupos para dosagem de NO	36

LISTA DE SIGLAS

µL	Microlitro
µm	Micrômetro
AA	Ácido Araquidônico
AINES	Anti-inflamatório não-esteroidal
APCs	Células apresentadoras de antígenos
ASA	Aspirina
BOC-2	Butoxycarbonyl-Phe-Leu-Phe-Leu-Phe
Células NK	Células <i>natural killer</i>
CEUA	Comitê de Ética do Uso de Animais
cm	Centímetro
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX	Ciclooxigenase
DAMPs	Padrões moleculares associados a dano
DC	Doença de Chagas
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
EVs	Vesículas extracelulares - <i>Extracellular vesicles</i>
EVs-Y	Vesículas extracelulares de <i>Trypanosoma cruzi</i> Y
IFN-γ	Interferon gama
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
ISEV	Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares - <i>International Society of Extracellular Vesicles</i>
LO	Lipooxigenase
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leucotrieno
mg	Miligrama
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di- fenil brometo de tetrazolina

MVs	Microvesículas
MyD/88	Fator de diferenciação mielóide 88
NEED	Naftil-etilenodiamino dihidroclorídrico
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
NTA	<i>Nanosigth tracking analysis</i>
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PARP1	ADP-ribose-polimerase 1
PBS	<i>Phosphate buffured saline</i>
PG	Prostaglandina
PRRs	Receptores de reconhecimento padrão
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RNIs	Reativos intermediários de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SBF	Soro bovino fetal
TGF- β	Fator de crescimento transformador
TLR ₄	<i>Toll like-receptor 4</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TX	Tromboxanos
WHO	Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	DOENÇA DE CHAGAS	14
1.2	CICLO BIOLÓGICO DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> E SINTOMATOLOGIA DA DOENÇA	15
1.3	<i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> E VESÍCULAS EXTRACELULARES	18
1.4	RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA DOENÇA DE CHAGAS	22
1.5	EICOSANÓIDES	25
1.6	ASPIRINA	27
1.7	CÉLULA RAW 264.7	29
2	OBJETIVOS	30
2.1	OBJETIVO GERAL	30
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3	MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	31
3.2	MANUTENÇÃO CELULAR	32
3.3	TRATAMENTO COM ASPIRINA	32
3.4	PURIFICAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES	33
3.5	NANOSIGTH TRACKING ANALYSIS	34
3.6	MTT - ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR	34
3.7	ENSAIO DE INTERNALIZAÇÃO	35
3.8	QUANTIFICAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	36
4	RESULTADOS	37
4.1	CARACTERIZAÇÃO DE EVs LIBERADAS POR TRIPOMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i> CEPA Y	37
4.2	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR PELO TESTE DE MTT	38
4.3	A ASPIRINA DIMINUI A INTERNALIZAÇÃO DO PARASITA EM CÉLULAS RAW 264.7	39
4.4	O AUMENTO DA INVASÃO CELULAR PELA AÇÃO DE EVs-Y FOI REDUZIDO PELA ASPIRINA	39

4.5	EVS-Y ANTES DA INFECÇÃO POR <i>T. CRUZI</i> DIMINUI OS NÍVEIS DE PRODUÇÃO DE NO PELAS CÉLULAS RAW 264.7	41
4.6	O TRATAMENTO PRÉVIO COM ASPIRINA RESTAURA A PRODUÇÃO DE NITRITO PELAS CÉLULAS RAW INFECTADAS APÓS EXPOSIÇÃO AS EVs-Y	41
4.7	EVS-Y INIBE A GERAÇÃO DE NO INDUZIDA POR IFN- γ	42
5	DISCUSSÃO	44
6	CONCLUSÃO	50
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
	ANEXO	61
	Beneficial Effects Of Aspirin On The Actions Of Extracellular Vesicles Shed By Trypanosoma cruzi In Macrophages	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

O protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da tripanossomíase americana conhecida também como doença de Chagas (DC), descoberta há 113 anos pelo médico epidemiologista Carlos Chagas (STEVERDING, 2014), que caracterizou o agente causador, ciclo de vida, formas evolutivas, manifestações clínicas e sua epidemiologia. Em homenagem ao seu mentor Oswaldo Cruz, Carlos Chagas nomeou o parasito como *Trypanosoma cruzi* e em sua homenagem, essa tripanossomíase passou a ser nomeada doença de Chagas (CHAGAS, 1909).

A transmissão para o ser humano e para mais de 140 espécies de mamíferos domésticos e selvagens ocorre principalmente por insetos hematófagos do Filo Arthropoda, Subfilo Hexapoda, Ordem Hemiptera, Família Reduviidae e Subfamília Triatominae (GORLA; NOIREAU, 2017). Segundo DIAS; RAMOS; GONTIJO; LUQUETTI *et al.* (2016), o Brasil apresenta mais de 62 espécies de triatomíneos distribuídas nos espaços intradomicílio e peridomicílio, sendo *Triatoma infestans* comumente encontrada em diversas regiões do país (MARTINS-MELO; CASTRO; WERNECK, 2021).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) cerca de 6 a 7 milhões de pessoas são afetadas pela doença de Chagas, ocasionando cerca doze mil mortes anualmente além de integrar uma lista de 20 doenças tropicais (WHO, 2022). No Brasil já foi demonstrado que a infecção pelo protozoário a longo prazo gera sequelas aumentando o número de pessoas incapacitadas (MARTINS-MELO; CARNEIRO; RAMOS; HEUKELBACH *et al.*, 2018). Apesar de ser endêmica na América Latina, a doença de Chagas está presente em continentes não endêmicos, como na América Norte e Europa. Nesse caso, a disseminação ocorre pela migração de pessoas infectadas, já que nesses locais há ausência de insetos vetores (LIDANI; ANDRADE; BAVIA; DAMASCENO *et al.*, 2019).

A transmissão pode ocorrer por mecanismos não dependentes do vetor, como em transfusões de hemocomponentes, transplante de órgãos, transmissão congênita e acidentes de laboratórios (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

1.2 Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi* e sintomatologia da doença

O *T. cruzi* é um parasito hemoflagelado da ordem Kinetoplastida, pertencente à família Trypanosomatidae e possui diferentes formas evolutivas (CHAGAS, 1909; (RASSI; RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012) que são classificadas de acordo com a forma celular, a posição do núcleo e cinetoplasto e o local emergente do flagelo (DE SOUZA, 1984). Elas apresentam formas esféricas, piriformes ou alongadas, e são denominadas: tripomastigotas metacíclicos, amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas sanguíneos (SIQUEIRA-BATISTA; GOMES; RÔÇAS; COTTA *et al.*, 2011). As diferentes morfologias estão relacionadas ao ciclo heteroxênico que o parasita possui alternando entre um hospedeiro intermediário (hospedeiro invertebrado) onde ocorre multiplicação extracelular e o hospedeiro definitivo (hospedeiro vertebrado) onde a multiplicação é intracelular (MORETTI; MORTARA; SCHENKMAN, 2020).

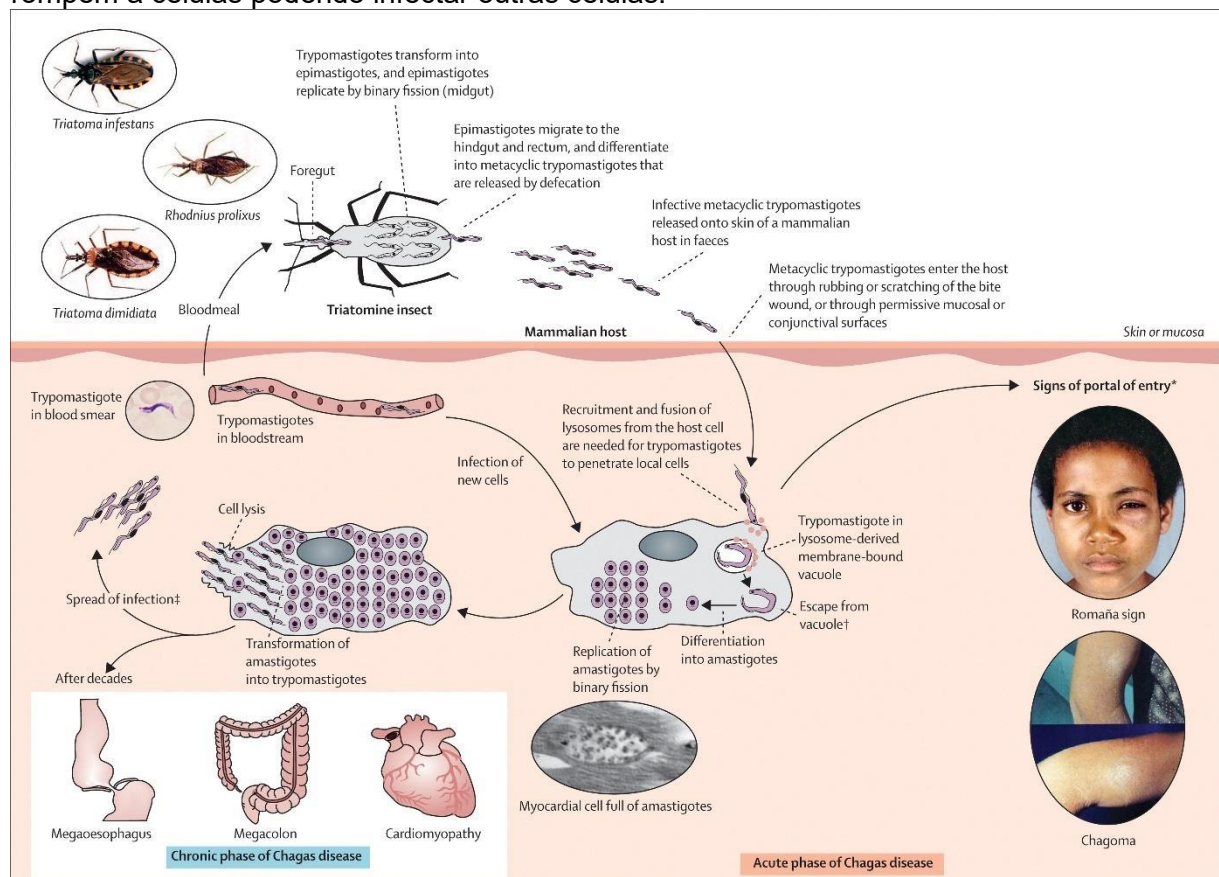
As formas tripomastigotas (sanguíneos e metacíclicos) apresentam flagelo e cinetoplasto anterior ao núcleo, sendo que essas formas infectantes estão presentes nos hospedeiros intermediários e definitivos, respectivamente (GONÇALVES; ÁVILA; DE SOUZA; MOTTA *et al.*, 2018). As formas amastigotas possuem pequeno flagelo e apresentam formas proliferativas presentes no interior da célula do hospedeiro vertebrado ou em cultura de células. Já a forma epimastigota apresenta flagelo e cinetoplasto posterior ao núcleo celular, sendo que essas formas estão presentes apenas na porção média do intestino do inseto vetor e em meio de cultivo axênico (BRENER, 1973; MELO; GUARNERI; SILBER, 2020; TYLER; ENGMAN, 2001).

A doença de Chagas pode ser transmitida por acidentes laboratoriais, transplantes de hemocomponentes, transplantes de órgãos, pela forma congênita e transmissão sexual (BERN; MESSENGER; WHITMAN; MAGUIRE, 2019), sendo a forma oral e vetorial mais prevalentes. A infecção oral está associada ao consumo de alimentos como carnes, caldo de cana e açaí não pasteurizados contendo o triatomíneo infectado ou suas fezes, sendo uma via de infecção comumente encontrada nas regiões norte e nordeste do Brasil (DOS SANTOS; DA SILVA RAMOS; BRUM; GAIA *et al.*, 2019; SANGENIS; NIELEBOCK; SANTOS; SILVA *et al.*, 2016).

A transmissão vetorial se inicia quando o inseto ingere as formas tripomastigotas presentes no sangue do mamífero infectado por hematofagia (Figura

1). Após este repasto sanguíneo, os tripomastigotas se aderem em diversas partes do intestino do triatomíneo, diferenciam-se em epimastigotas que por sua vez sofrem multiplicação por cissiparidade. As formas epimastigotas migram até a porção terminal do intestino (reto), se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas que são liberadas nas fezes e na urina do inseto vetor durante uma nova hematofagia (BERN, 2011; CHAGAS-LIMA; PEREIRA; FAMPA; LIMA *et al.*, 2019; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Figura 1. Transmissão e ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Após o hematofagismo as formas tripomastigotas sanguíneas ingeridas migram para a porção média do intestino do triatomíneo onde se diferenciam em formas epimastigotas que se replicam por cissiparidade, em seguida elas se deslocam para a porção final do intestino do inseto onde se diferenciam novamente em formas tripomastigotas metacíclicas sendo liberadas junto com fezes e urina. Durante o repasto sanguíneo, o inseto introduz a proboscídea no tecido do hospedeiro até encontrar um vaso, isso causa sensação de prurido levando as fezes do inseto para dentro da lesão. Ao entrar, as formas metacíclicas infectam quaisquer células nucleadas próximas ao local da picada e, após internalizarem, as formas metacíclicas se diferenciam em formas amastigotas e novamente sofrem replicação por divisão binária. Após preencher todo citoplasma as formas amastigotas se diferenciam em formas tripomastigotas sanguíneas, rompem a células podendo infectar outras células.



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

O hematofagismo ocorre no período noturno. O inseto realiza a ruptura da pele e penetra o tecido até um vaso sanguíneo, no local da picada ocorre a formação

de uma resposta inflamatória devido a presença da saliva do inseto. A resposta inflamatória gerada pela picada do inseto causa a sensação de prurido no local, o que induz o indivíduo a coçar e com isso o parasito é levado para dentro da lesão, permitindo assim a entrada e a infecção por *T. cruzi* (DE SOUZA, 2000; GUARNER, 2019). As formas tripomastigotas infectam primeiramente qualquer célula nucleada localizada próxima ao local da picada, evadem para o citoplasma celular onde se diferenciam em amastigotas. Estas se replicam por fissão binária até preencherem o todo citoplasma (PAIVA; FEIJÓ; DUTRA; CARNEIRO *et al.*, 2012). Uma vez preenchido o citoplasma, as amastigotas se diferenciam novamente em tripomastigotas sanguíneas rompem a célula e se disseminam pelo organismo do hospedeiro tornando a infecção sistêmica (ANDREWS; ABRAMS; SLATIN; GRIFFITHS, 1990; DVORAK; HYDE, 1973; HEMMIGE; TANOWITZ; SETHI, 2012; KAHN; WLEKLINSKI; EZEKOWITZ; CODER *et al.*, 1996; MONTEÓN; FURUZAWA-CARBALLEDA; ALEJANDRE-AGUILAR; ARANDA-FRAUSTRO *et al.*, 1996).

A DC apresenta sintomatologia e patogenicidade diversificada de acordo com cada indivíduo infectado. Após contato com as formas infectantes através de umas ou mais formas de transmissão, o hospedeiro pode se apresentar assintomático ou demonstrar sinais e sintomas inespecíficos como mal-estar, febre, chagoma de inoculação e o sinal de Romaña (BENZIGER; DO CARMO; RIBEIRO, 2017). A doença apresenta fase aguda, intermediária e crônica. Nos estágios iniciais da infecção (fase aguda) os pacientes desenvolvem febre e outras reações inflamatórias e geralmente estes sintomas de fase aguda se resolvem espontaneamente (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Após os sintomas de fase aguda cessarem, cerca de 30% dos indivíduos infectados passam para fase indeterminada que é caracterizada pela fase crônica assintomática (STANAWAY; ROTH, 2015). Cerca de 5% a 10% dos pacientes evoluem para a fase crônica sintomática que é marcada pelo desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica apresentando disfunção ventricular e sistólica, desenvolvimento de arritmias, insuficiência cardíaca e eventos tromboembólicos (GUERRERO; CAMACHO; VILA; ÍÑIGUEZ *et al.*, 2015; TANOWITZ; MACHADO; SPRAY; FRIEDMAN *et al.*, 2015). Além disso, durante a fase crônica podem ocorrer manifestações gastrointestinais, caracterizada pelo desenvolvimento das megasíndromes como megaesôfago e megacólon (LOPEZ; TANOWITZ; GARG,

2018).

O *T. cruzi* está integrado em uma família de cepas ou isolados de uma única espécie heterogênea. Esta característica poderia explicar as diferentes respostas imunológicas e, conseqüentemente, os diferentes sintomas (MACEDO; MACHADO; OLIVEIRA; PENA, 2004). Desde 1999 existe uma consonância sobre as cepas do parasito *T. cruzi* e duas linhagens de grande importância, *T. cruzi I* e *T. cruzi II* (BALOUZ; AGÜERO; BUSCAGLIA, 2017). O *T. cruzi I* está relacionada com a doença em seres humanos em países endêmicos que estão localizados no norte da América do Sul, essa linhagem é predominante na transmissão no ciclo silvestre. A linhagem *T. cruzi II* está relacionada com lesões teciduais causada pela DC em indivíduos residentes no Brasil e na Argentina, pois a transmissão acontece predominante no ciclo doméstico (DI NOIA; BUSCAGLIA; DE MARCHI; ALMEIDA *et al.*, 2002; JANSEN; XAVIER; ROQUE, 2020).

A resposta imunológica desencadeada na fase aguda tanto pelas células do sistema imunológico inato (macrófagos, células dendríticas e NK) que é necessária para sobrevivência do hospedeiro, pois ela mantém controlada a replicação do parasito (MACHADO, FABIANA S; DUTRA, WALDEREZ O; ESPER, LISIA; GOLLOB, KENNETH J *et al.*, 2012). Estudos mostraram que a resposta inflamatória acentuada do hospedeiro é um dos fatores que determinam a progressão da DC, além da virulência e do tropismo da cepa (DUTRA; MENEZES; MAGALHÃES; GOLLOB, 2014; MARIN-NETO; CUNHA-NETO; MACIEL; SIMÕES, 2007). No entanto, quando a resposta imunológica ocorre de forma exacerbada pode ocorrer simultaneamente o surgimento de lesões teciduais (ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014; JUNQUEIRA; CAETANO; BARTHOLOMEU; MELO *et al.*, 2010).

Apesar dos mecanismos imunológicos e inflamatórios do hospedeiro serem, em grande maioria, satisfatórios, o *T. cruzi* possui mecanismos de escape do sistema imune, permitindo a sobrevivência do parasito dentro das células hospedeiras (CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2015).

1.3 *Trypanosoma cruzi* e Vesículas Extracelulares

Células nucleadas em sua maioria secretam vesículas extracelulares (EVs, do inglês *extracellular vesicles*) ou seja, estruturas compostas por proteínas, glicídios, lipídeos e ácidos nucleicos que participam na comunicação entre células sem que haja

contato entre elas (BARTENEVA; MALTSEV; VOROBYEV, 2013; DEOLINDO; EVANS-OSES; RAMIREZ, 2013; HASSANPOUR; REZAIE; NOURI; PANAHI, 2020). Essa composição das EVs depende da ativação celular, do estado de ativação (homeostasia ou estado patológico) e do local de liberação (SREEKUMAR; KANNAN; KITAMURA; SPEE *et al.*, 2010; VAN NIEL; D'ANGELO; RAPOSO, 2018). Estudos demonstram que a participação das EVs durante processos infecciosos parasitários atua na comunicação entre parasitos, como na comunicação parasito-célula hospedeira (BARTENEVA; MALTSEV; VOROBYEV, 2013; MARCILLA; MARTIN-JAULAR; TRELIS; DE MENEZES-NETO *et al.*, 2014). Além de atuar durante infecções, as EVs também participam da comunicação entre células durante processos fisiológicos (KIM; LEE; YANG; PARK *et al.*, 2015).

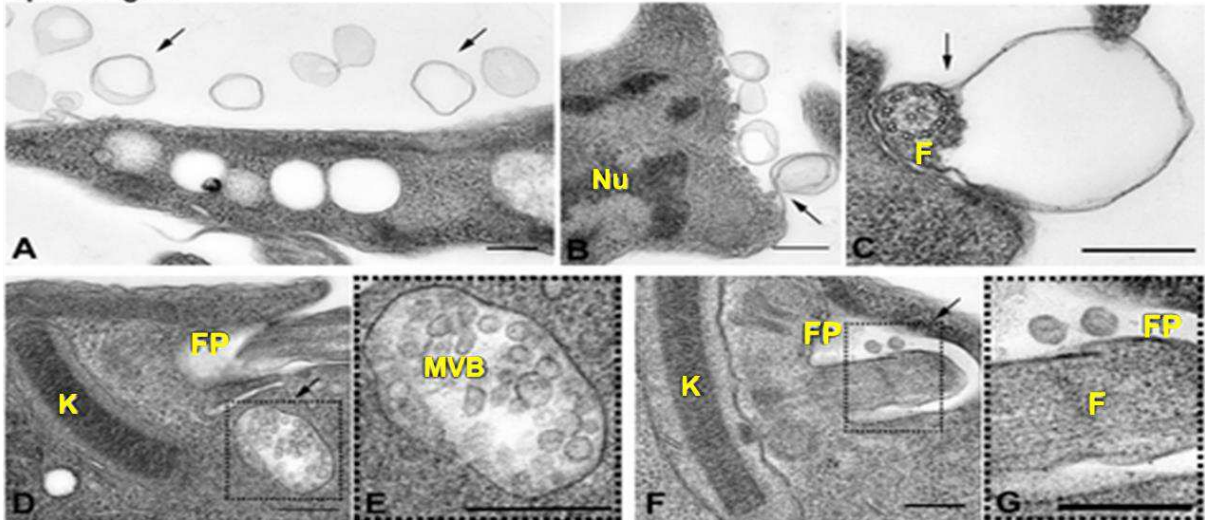
As células apresentadoras de antígenos (APCs) secretam EVs que participam na resposta imunológica (RAPOSO; NIJMAN; STOORVOGEL; LIEJENDEKKER *et al.*, 1996). Em seu interior foi revelado a presença de moléculas de RNAm e microRNAs, evidenciando um possível papel na transferência de informação genética entre células (HASSANPOUR; REZAIE; NOURI; PANAHI, 2020; VALADI; EKSTRÖM; BOSSIOS; SJÖSTRAND *et al.*, 2007). EVs provenientes de células apresentadoras de antígenos podem conter tanto moléculas antigênicas quanto peptídeos complexados às moléculas de MHC. Foi demonstrado que macrófagos infectados com *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium bovis* (GIRI; SCHOREY, 2008) ou com citomegalovírus (WALKER; MAIER; POBER, 2009) podem secretar EVs contendo antígenos derivados de seus patógenos. Por esse motivo, as EVs também podem ser usadas como marcadores de doenças (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013; SCHOREY; HARDING, 2016).

O termo vesículas extracelulares (EVs) 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 (Figura 2) (ABELS; BREAKFIELD, 2016). Portanto as EVs são divididas em três grupos pela Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV- *International Society of Extracellular*): corpos apoptóticos, microvesículas e exossomos (ARALDI; KRÄMER-ALBERS; HOEN; PEINADO *et al.*, 2012) (KUBO, 2018) e sua classificação depende do tamanho, biogênese e composição (MARCILLA; MARTIN-JAULAR; TRELIS; DE MENEZES-NETO *et al.*, 2014).

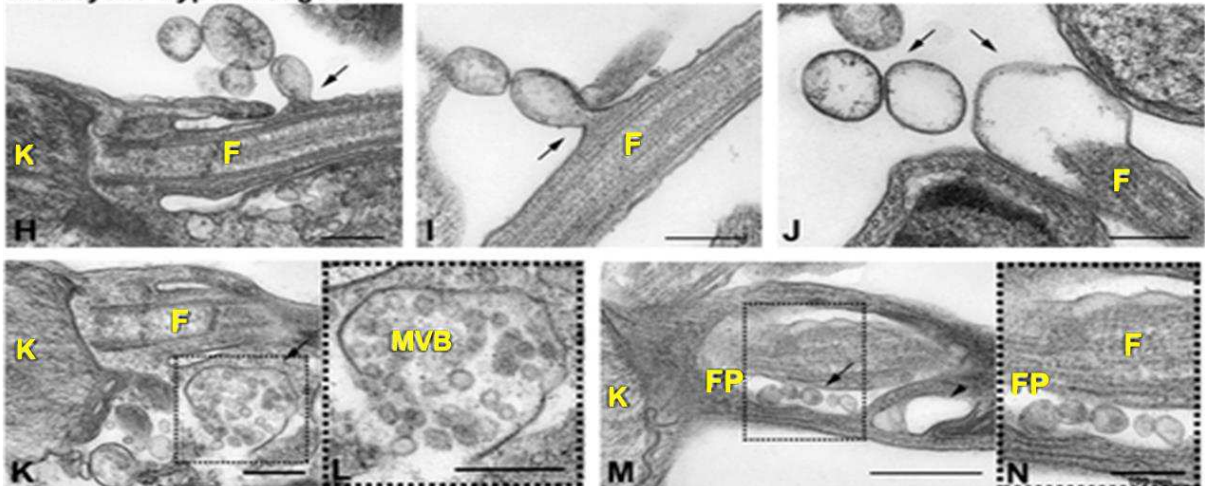
Os corpos apoptóticos (maiores que 1000nm) formam-se a partir da morte celular programada, ativando macrófagos para fagocitose (AKERS; GONDA; KIM; CARTER *et al.*, 2013).

Figura 2. Origem de vesículas extracelulares de *Trypanosoma cruzi*. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos. 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 metacíclicos liberando vesículas a partir da membrana plasmática (H - J) e MVBs próximos a bolsa flagelar (K e L), contendo pequenas vesículas (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.

Epimastigote



Metacyclic trypomastigote



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. Adaptado.

Já as microvesículas (MVs, entre 100 e 1000nm) são constituídas por uma bicamada fosfolipídica e originam-se do brotamento da membrana plasmática a partir de um processo dependente de Ca^{2+} intracelular. Podem apresentar proteínas e

receptores de membrana, além de conteúdo citoplasmático. Os exossomos apresentam tamanho (entre 20 e 100nm) e possuem proteínas transmembranares inseridas e protegidas em seu interior hidrofílico (CHAPUT; THÉRY, 2011). Eles se originam da membrana do endossomo, por brotamento interno que origina corpos multivesiculares que possuem bicamada fosfolipídica de origem endossomal e conteúdo citoplasmático (ABELS; BREAKFIELD, 2016) (ROBBINS; MORELLI, 2014). A fusão dos corpos multivesiculares com a membrana celular promove a liberação dos exossomos no meio extracelular (DEOLINDO; EVANS-OSES; RAMIREZ, 2013).

As EVs transportam diversas substâncias derivadas das células, como proteínas e ácidos nucleicos. Durante a infecção por *T. cruzi*, tanto o parasito quanto as células do hospedeiro infectadas liberam EVs (CESTARI; ANSA-ADDO; DEOLINDO; INAL *et al.*, 2012; RAMIREZ; DEOLINDO; DE MESSIAS-REASON; ARIGI *et al.*, 2017), elas contêm proteínas que estão relacionadas com a sinalização, fusão da membrana, transporte e diminuição da oxidação (BAYER-SANTOS; AGUILAR-BONAVIDES; RODRIGUES; CORDERO *et al.*, 2013), além de se ligarem ao parasito e conferirem proteção contra o ataque do complemento, estimulando a invasão do *T. cruzi* em células de mamíferos (CESTARI; ANSA-ADDO; DEOLINDO; INAL *et al.*, 2012).

Quando secretadas, elas entram em contato tanto com a matriz extracelular como com outras células, podendo assim interagir com as células-alvo através de diferentes vias. Sinais intracelulares são induzidos por transdução quando as EVs contendo citocinas e receptores de morte se ligam a receptores específicos. Também pode ocorrer a transferência do conteúdo das EVs para as células-alvo através da adesão à superfície celular via receptores (CHAPUT; THÉRY, 2011). Estudos anteriores demonstraram que o *T. cruzi* libera EVs que podem interferir na resposta imunológica modulando a favor do parasito (GONÇALVES; UMEZAWA; KATZIN; DE SOUZA *et al.*, 1991; LOVO-MARTINS; MALVEZI; ZANLUQUI; LUCCHETTI *et al.*, 2018; WU; WANG; LI; WANG *et al.*, 2018).

O estudo dos efeitos *in vivo* das EVs liberadas pelo *T. cruzi* durante a infecção murina foi publicado pela primeira vez por TROCOLI TORRECILHAS; TONELLI; PAVANELLI; DA SILVA *et al.* (2009), eles demonstraram que a inoculação de EVs provenientes de tripomastigotas de *T. cruzi* em camundongos Balb/c (modelo

murino suscetível a infecção por *T. cruzi* cepa Y) antes da infecção com o parasito aumentou a taxa de mortalidade dos animais. Esse aumento da mortalidade foi associado a redução dos níveis de iNOS (Óxido Nítrico Sintase) no tecido cardíaco, lesões cardíacas severas, além da indução da expressão de IL-4 e IL-10 no tecido cardíaco.

Nosso grupo de pesquisa ratificou o papel das EVs de *T. cruzi* Y na patogênese da infecção experimental, contribuindo para uma melhor compreensão dos mecanismos que envolvem a imunomodulação exercida pelas EVs de *T. cruzi* na interação parasito-hospedeiro (LOVO-MARTINS; MALVEZI; ZANLUQUI; LUCCHETTI *et al.*, 2018). Foi demonstrado que as EVs de *T. cruzi* favorecem a infecção de células hospedeiras pelo parasito, além de induzirem a formação de corpos lipídicos e de PGE₂ em macrófagos mesmo antes do contato dessas células com o *T. cruzi*.

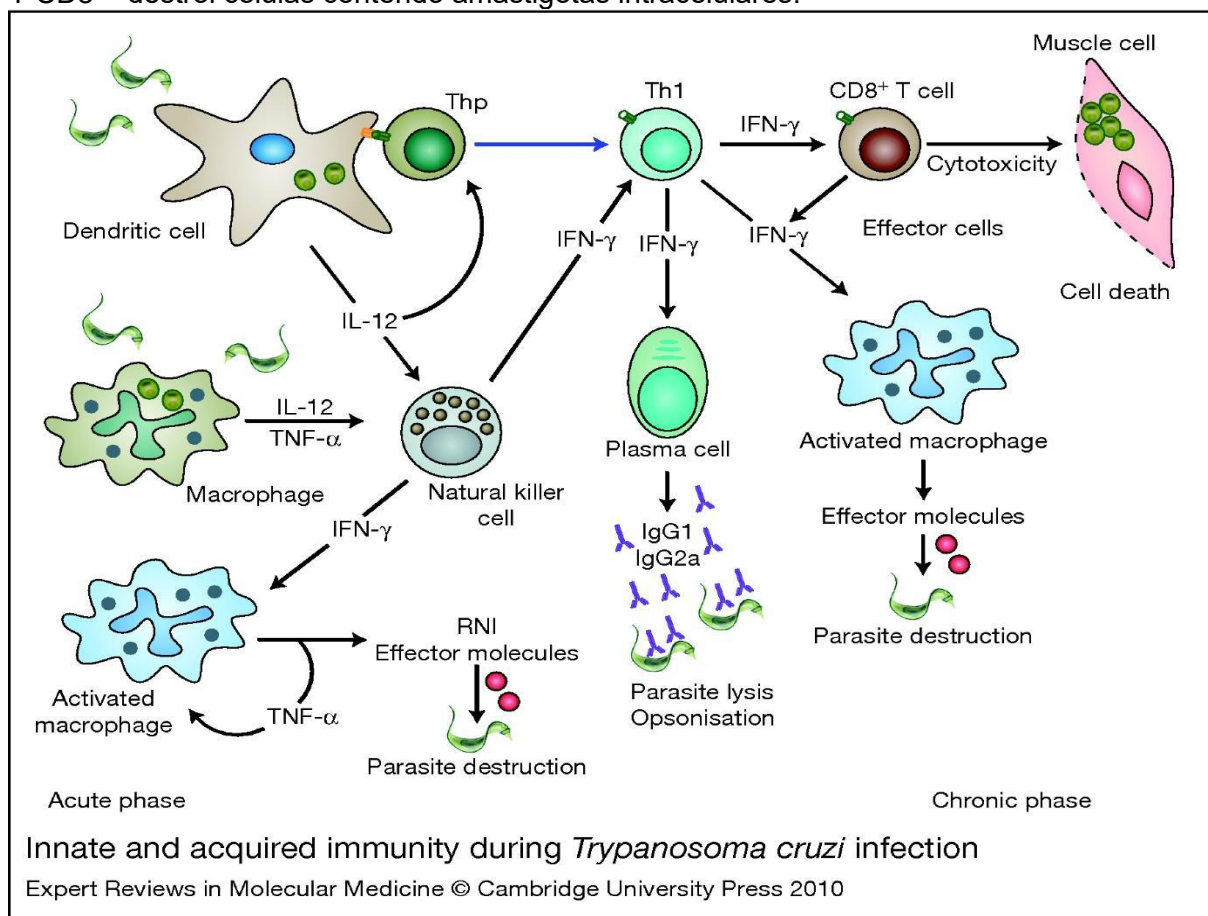
1.4 Resposta imunológica na doença de Chagas

A imunidade inata é composta por barreiras físicas e químicas que tem por função proteger e bloquear a entrada da maioria dos microrganismos. Dentre os componentes celulares presentes no organismo estão as células fagocíticas (macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células NK) e citocinas que são formadas por proteínas que atuam na emissão de sinais entre células desencadeando resposta imunológica (CRUVINEL; MESQUITA JÚNIOR; ARAÚJO; CATELAN *et al.*, 2010).

A ativação da imunidade inata é seguida pela imunidade adaptativa, por meio da liberação de IFN- γ e IL-12, que atuam na diferenciação de linfócitos T específicos para *T. cruzi*. Essas células T específicas migram em resposta a quimiocinas que são liberadas localmente e que também participam da resposta imunológica contra o parasito (Figura 3). De modo contrário, a produção de IL-10 e TGF- β auxiliam a replicação do parasito por inibição da atividade tripanocida dos macrófagos. Outros mecanismos celulares envolvidos na imunidade adaptativa incluem a indução de células Th1 MyD88/IL-12-dependentes, resposta humoral mediada por células B específicas ao *T. cruzi*, células T CD8+ e mecanismos mediados por IFN- γ (BRYAN; GUYACH; NORRIS, 2010; JUNQUEIRA; CAETANO; BARTHOLOMEU; MELO *et al.*, 2010). O processo de inflamação é caracterizado pelo recrutamento de células de defesa e de proteínas presentes no sangue que irão se

acumular no tecido sinalizado e então destruir o microrganismo.

Figura 3. Imunidade inata e adquirida durante a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Na fase inicial da invasão do *T. cruzi*, a imunidade inata desempenha um papel crucial na resistência do hospedeiro à infecção: atuando como primeira barreira, as células do sistema imunológico inato (macrófagos, células NK e células dendríticas) produzem citocinas (IL-12, TNF- α e IFN- γ) e moléculas efetoras [intermediários de nitrogênio reativos (RNIs)] e GTPases induzíveis por IFN- γ que controlam a replicação do parasita. Ao mesmo tempo, as células da imunidade inata, particularmente as células dendríticas, fazem a ponte entre a imunidade inata e adquirida, produzindo citocinas (IL-12) necessárias para a diferenciação e expansão clonal de T *helper* 1 (Th1) CD4+ e CD8+, células T e células B do plasma. O IFN- γ produzido por células T CD4+ Th1 ou CD8+ ativa mecanismos efetores em macrófagos para destruir amastigotas e tripomastigotas fagocitados, enquanto a atividade citotóxica exibida por células T CD8+ destrói células contendo amastigotas intracelulares.



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.

Os macrófagos são células mononucleares que estão distribuídas por todo o organismo, seja na circulação sanguínea (como monócitos) ou residentes no tecidos, sendo um dos principais tipos celulares fagocíticos que irão produzir citocinas para a sinalização e recrutamento celular, através de um processo denominado fagocitose, irão ingerir microrganismos e restos celulares para que estes sejam destruídos dentro de vacúolos intracelulares (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI; KOOGAN et al., 2019).

Durante o contato inicial do hospedeiro com o parasito *T. cruzi*, na fase aguda da infecção, a resposta imunológica precisa exercer papéis cruciais para a sobrevivência do hospedeiro. Estes papéis se iniciam com a resposta inflamatória nas células ou tecido infectado, e tem como função controlar a replicação do parasito e a sua disseminação. Embora essa resposta seja essencial para controle da infecção, o parasito não é completamente eliminado levando a cronificação da DC. As lesões teciduais acontecem quando a resposta inflamatória não é equilibrada e acontece de forma exacerbada (ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014; JUNQUEIRA; CAETANO; BARTHOLOMEU; MELO *et al.*, 2010). O reconhecimento dos microrganismos pelas células hospedeiras acontece através do reconhecimento dos PAMPs (Padrões Moleculares Associados ao Patógeno), pelos receptores PRRs (Receptores de Reconhecimento de Padrões) presente nas células hospedeiras (RODRIGUES; OLIVEIRA; BELLIO, 2012). PINGE-FILHO (2021) apresentou a hipótese que as EVs podem agir como DAMPS de acordo com sua via geração liberadas por células infectadas e composição celular, associada a ativação via PARP1-cGAS.

Durante a infecção por *T. cruzi* a imunidade humoral desempenha um papel importante na resposta imunológica, produzindo anticorpos pelos plasmócitos que induzem a fagocitose do parasito devido à opsonização, porém, estes anticorpos produzidos mostram-se relacionados com autoimunidade já observado na DC (BONNEY; ENGMAN, 2015; JUNQUEIRA; CAETANO; BARTHOLOMEU; MELO *et al.*, 2010; KRETTLI; BRENER, 1976). A citocina IL-6 desempenha propriedades que são indutoras para a produção de anticorpos, e induzem a ativação de linfócitos T CD8+ (TRUYENS; ANGELO-BARRIOS; TORRICO; VAN DAMME *et al.*, 1994).

Os macrófagos e as células dendríticas reconhecem o parasito nas primeiras horas de infecção, o que estimula a produção de citocinas como IL-12 e TNF- α . Estas citocinas estimulam a liberação de IFN- γ pelas células NK, que por sua vez, ativam ainda mais os macrófagos, aumentando a produção de citocinas pró-inflamatórias e potencializando a ação tripanocida (ALIBERTI; CARDOSO; MARTINS; GAZZINELLI *et al.*, 1996; CARDILLO; CUNHA; TAMASHIRO; RUSSO *et al.*, 2002).

O IFN- γ também é secretado pelos linfócitos Th1 que são ativados na resposta imunológica adquirida (LANNES-VIEIRA, 2003), e a secreção desta citocina, tanto pelas células Th1, quanto pelos macrófagos, estimulam a ação tripanocida dos próprios macrófagos induzindo a produção de moléculas de NO (óxido nítrico)

(VESPA; CUNHA; SILVA, 1994).

Nos macrófagos, a enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) origina espécies reativas de nitrogênio, como o NO. O óxido nítrico reage com o ânion superóxido (O_2^-) formando peroxinitrito ($ONOO^-$), que é, por sua vez, a molécula efetora citotóxica contra o parasito *T. cruzi* (VESPA; CUNHA; SILVA, 1994). Entretanto, o *T. cruzi* possui mecanismos antioxidantes que são rigidamente reguladas e capazes de lidar com o *bursts* oxidativos que ocorre nas células do sistema imunológico, e, por esta razão, o parasito não é eliminado completamente (HAMILTON; TEIXEIRA; STEVENS, 2012).

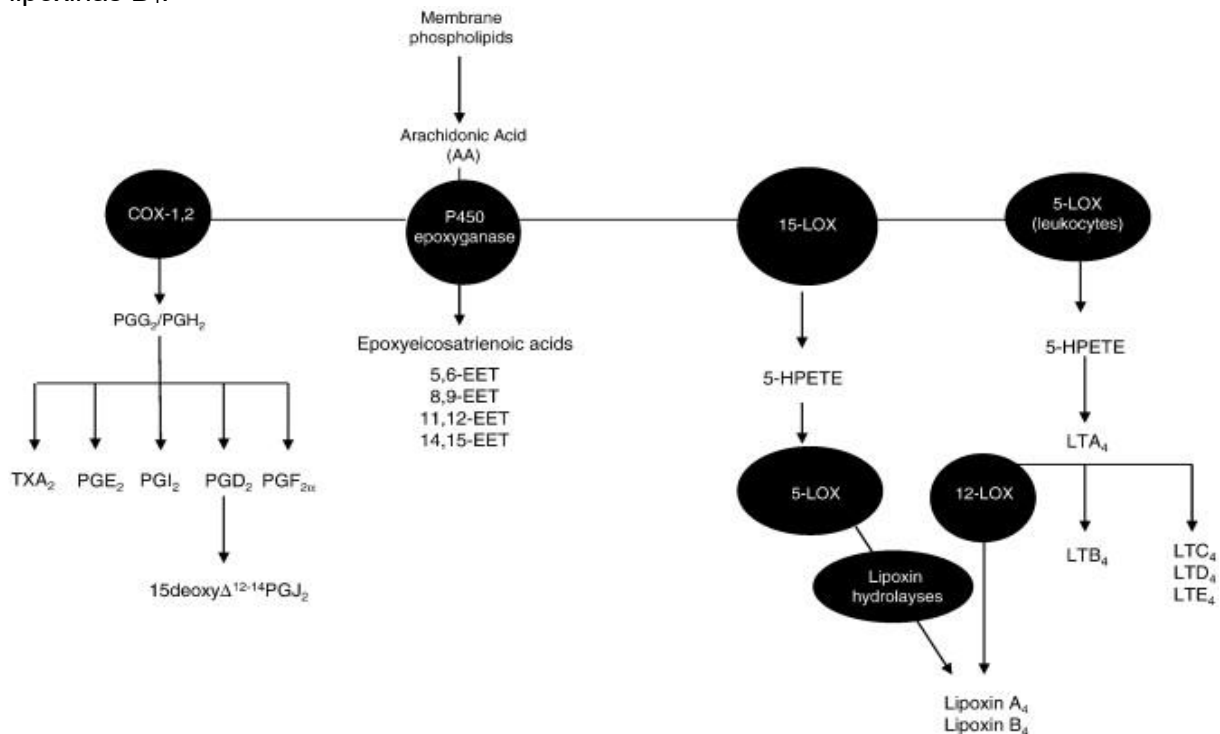
1.5 Eicosanóides

Os Eicosanóides pertencem a família de metabólitos oxigenados do ácido araquidônico (AA) presentes nas membranas celulares, e que reagem a diferentes estímulos podendo tornar-se moléculas bioativas (SMITH; MARNETT; DEWITT, 1991). Durante a resposta à infecção por *T. cruzi*, existe uma intensa produção de eicosanóides, como leucotrienos (LT) e prostaglandinas (PG) (MACHADO, F. S.; DUTRA, W. O.; ESPER, L.; GOLLOB, K. J. *et al.*, 2012).

Por ação da fosfolipase A, o ácido araquidônico (AA), constituinte normal dos fosfolipídios das membranas celulares das células do sistema imunológico, é liberado dos fosfolipídios da membrana (SMITH, 1992), ficando disponível como substrato para duas vias enzimáticas, a via das ciclooxigenases (COX), que desencadeiam a síntese de prostaglandinas (PG) e tromboxanos (TX), e a via das lipoxigenases (LO), responsável pela síntese de leucotrienos (LT) e lipoxinas (LX) (Figura 4) (NARABA; MURAKAMI; MATSUMOTO; SHIMBARA *et al.*, 1998; TAKAHASHI; ZHU; YOSHIMOTO, 2005). Duas formas de COX estão mais bem caracterizadas, sendo elas, a COX-1 constitutivamente expressa em quase todos os tecidos; e a COX-2 induzida localmente por citocinas produzidas por leucócitos em resposta a danos ou invasão microbiana. Tem sido observado que a liberação de eicosanóides durante a infecção com *T. cruzi* regula a resposta do hospedeiro e controla a progressão da doença (ASHTON; MUKHERJEE; NAGAJYOTHI; HUANG *et al.*, 2007). PINGE-FILHO; TADOKORO e ABRAHAMSOHN (1999) mostrou que a liberação de PG também está relacionada com a diminuição da produção de TNF- α ,

redução da proliferação de linfócitos e imunossupressão em animais infectados. Portanto, está claro que os eicosanóides apresentam papéis essenciais na patogênese da DC experimental (SANTOS; SILVA; SILVA; SILVA *et al.*, 1992).

Figura 4. Biossíntese de eicosanóides a partir de ácido araquidônico (AA). As enzimas ciclooxigenases 1-2 (COX 1/2) metaboliza o AA em eicosanoides como as prostaglandinas e tromboxanos por reações sequenciais de ciclooxigenação e hidroperoxidação. PGH_2 é convertido por sintases gerando tromboxanos A_2 e as prostaglandinas PGE_2 , PGI_2 , PGD_2 , $PGF_{2\alpha}$. Esses produtos podem ser convertidos não enzimaticamente em outros metabolitos incluindo 15-desoxidelta12, 14- PGJ_2 . A 5-lipoxigenase (LOX) liga-se a proteína ativadora 5-lipoxigenase (FLAP) após a ativação celular, convertendo AA em 5-HPETE, que é posteriormente metabolizado em LTA_4 . O LTA_4 também pode ser convertido em LTB_4 pela LTA_4 hidrolase ou pelos cistenil leucotrienos (CysLTs) LTC_4 , LTD_4 ou LTE_4 . O LTA_4 pode ser metabolizado pela 12-LOX plaquetária em lipoxinas A_4 e lipoxinas B_4 . A 15-LOX metaboliza AA para gerar 5-HEPTE que é convertido por 5-LOX e lipoxinas hidrolases em lipoxinas A_4 e lipoxinas B_4 .



Yates CM, Calder PC, Ed Rainger G. Pharmacology and therapeutics of omega-3 polyunsaturated fatty acids in chronic inflammatory disease. *Pharmacol Ther.* 2014.

Durante a fase aguda da infecção experimental por *T. cruzi*, há um alto nível de expressão da enzima iNOS, produção de citocinas pró-inflamatórias e lipídios derivados do AA, que estão inicialmente atribuídos à resistência, e posteriormente, ao dano tecidual causado na DC. Tanto a COX-1, como a COX-2 são inibidas de forma não seletiva por anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES), como aspirina e ibuprofeno, enquanto a atividade da COX-2 é seletivamente bloqueada pelos inibidores da COX-2 chamados coxibes (como o celecoxibe). A relevância dessas enzimas e dos lipídios bioativos que eles produzem não são bem compreendidos na

doença parasitária, embora o papel dos eicosanóides na patogênese da DC esteja cada vez mais definido (MALVEZI; DA SILVA; PANIS; YAMAUCHI; LOVO-MARTINS *et al.*, 2014).

A produção de NO em macrófagos ativados através da via da enzima iNOS representa um importante mecanismo de ação microbicida contra patógenos intracelulares, atuando contra o *T. cruzi*, além de outros parasitos como *Plasmodium falciparum*, *Leishmania major* e *Toxoplasma gondii* (COLASANTI; GRADONI; MATTU; PERSICHINI *et al.*, 2002). Ao mesmo tempo, o NO exerce efeitos modulatórios na indução da expressão de iNOS, inibindo o efeito do fator de transcrição NF- κ B (COLASANTI; PERSICHINI; MENEGAZZI; MARIOTTO *et al.*, 1995). A atuação de fármacos que inibem a enzima COX nas células imunes, como os macrófagos peritoneais de camundongos mostrou a diminuição da internalização das formas tripomastigotas nas células e o aumento da secreção de NO (MALVEZI; DA SILVA; PANIS; YAMAUCHI; LOVO-MARTINS *et al.*, 2014).

O papel dos eicosanóides na infecção por *T. cruzi* tem sido amplamente estudado, buscando entender o efeito da inibição da síntese de prostaglandinas com fármacos sobre a resposta inflamatória e a invasão celular por *T. cruzi*. MALVEZI; PANIS; DA SILVA; DE FREITAS *et al.* (2014) demonstraram *in vitro* que a internalização do parasito foi reduzida quando células cardíacas foram tratadas com aspirina. Esta redução foi associada com um aumento na produção de NO e IL-1 e redução de TGF- β , indicando que a COX-1 está envolvida na regulação da atividade anti-*T. cruzi*. A aspirina também diminuiu a liberação de tripomastigotas *in vitro* no sobrenadante de macrófagos infectados por *T. cruzi*, e inibiu a entrada do *T. cruzi* nos macrófagos pela via das lipoxinas (MALVEZI; DA SILVA; PANIS; YAMAUCHI; LOVO-MARTINS *et al.*, 2014).

1.6 Aspirina

O médico grego Hipócrates considerado o pai da medicina moderna durante o século V a.C descreveu que o pó retirado da casca do salgueiro branco ou chorão diminuía dores e febre devido a apresentar salicatos na sua composição. Em 1828 o farmacêutico francês Henri Leroux e o químico italiano Raffaele Piria, isolaram o composto bioativo da casca do salgueiro, a salicina ou ácido salicílico

(MALDONADO, 2009).

Em 1897 o laboratório farmacêutico alemão Bayer visualizando o enorme sucesso desse fármaco, descobriu uma maneira de torná-lo menos tóxico na forma medicamentosa conjugando quimicamente com acetato originando ácido acetilsalicílico (aspirina), sendo o primeiro fármaco sintético produzido na história (MALDONADO, 2009). Posterior a demonstração dos seus efeitos anti-inflamatórios desse composto, ela foi introduzida na medicina em 1899. A origem do nome Aspirina é demonstrada da seguinte forma: A vem de acetil, *Spir* se refere a planta que fornece a salicina e o sufixo *in* era uma terminação comum utilizada na época para se referir a medicamentos e em português ganhou o sufixo *a*, e se tornou Aspirina (LOPES, 2011).

Entretanto Bayer perdeu a marca registrada *Aspirina* em diversos países após a Primeira Guerra Mundial. Em 1971 John Vane, do *Royal College of Surgeons* demonstrou o mecanismo de ação do ácido acetilsalicílico, recebendo em 1982 o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia (MALDONADO, 2009). O ácido acetilsalicílico é considerado uma droga do tipo AINEs (anti-inflamatório não esteroidal) e é indicado como agente antiplaquetário, analgésico, antipirético e anti-inflamatório. A aspirina atua como inibidor inespecífico que acetila irreversivelmente a enzima ciclooxigenase (COX) (RANG; DALE; RITTER; FLOWER *et al.*, 2007).

Presente na bicamada fosfolipídica da membrana localizam-se duas proteínas integrais denominadas COX-1 e COX-2. São consideradas isoenzimas por apresentarem variação no número de aminoácidos que as compõe, porém realizam a catálise da mesma reação química (JOUZEAU; TERLAIN; ABID; NÉDÉLEC *et al.*, 1997). As ciclooxigenases apresentam três sítios distintos: Um sítio amino terminal, seguido pelo sítio de ligação da membrana e o sítio de catalítico carboxílico, que apresenta locais de atividade da ciclooxigenase e peroxidase. As COX apresentam duas atividades distintas. A primeira está relacionada ao endoperóxido redutase que realiza a oxidação e ciclização do ácido graxo para formar a prostaglandina G, e uma outra atividade é a conversão de PGG em PGH (prostaglandina H) através da ação da peroxidase (CARVALHO; CARVALHO; RIOS-SANTOS, 2004; CRYER; DUBOIS, 1998; HINZ; BRUNE, 2002).

As fosfolipases transformam fosfolipídios presentes nas membranas das células em ácido araquidônico (AA) presentes no citosol, a partir do AA se formam mediadores lipídicos inflamatórios. A COX modifica o ácido araquidônico em prostaglandinas. Existem 3 tipos dessa enzima: A COX-1 está presente em quase todos os tecidos; a COX-2 é induzida em locais que sofreram danos ou invasão microbiana com citocinas produzidas por leucócitos durante a inflamação, além de induzir a formação de prostaglandinas (RANG; DALE; RITTER; FLOWER *et al.*, 2007). Já COX-3 que está relacionada a uma variação da COX-1 e essa enzima é seletivamente inibida por drogas analgésicas, antipiréticas, assim a ação inibitória causada pelo ácido acetilsalicílico constitui o principal mecanismo dos seus efeitos analgésicos (CHANDRASEKHARAN; DAI; ROOS; EVANSON *et al.*, 2002).

1.7 Célula RAW 264.7

Os macrófagos são células fagocíticas possuem morfologias e nomenclaturas distintas de acordo com a sua localização, denominam-se macrófagos quando presentes no tecido e monócitos quando presente no sangue (HALLIWELL; MEDICINE, 1999). São células mononucleares grandes, com 25-50 μm de diâmetro, possuem o núcleo irregular, com um ou mais nucléolos, cromatina pouco condensada, citoesqueleto desenvolvido, projeções citoplasmáticas, numerosos lisossomos, mitocôndrias e complexo de Golgi (AUGER, 1992). A função destas células no organismo é de defesa, atuando de forma direta ou indireta. Diretamente, os macrófagos atuam no início da resposta imune tanto inata quanto a adaptativa, fagocitando e destruindo patógenos. Indiretamente, atuam através da secreção de citocinas e apresentação de antígeno (DINARELLO, 1996).

Os macrófagos desempenham papel importante nas reações imunológicas pois são células envolvidas diretamente com respostas inflamatórias. Quando ativados, macrófagos produzem fatores pró-inflamatórios, citocinas e espécies reativas de oxigênio (ROS), os quais estão diretamente envolvidos na progressão da condição inflamatória (GASPARRINI; FORBES-HERNANDEZ; GIAMPIERI; AFRIN *et al.*, 2017).

A linhagem celular *macrophage-like* RAW 264.7 foi estabelecida a partir de um tumor induzido pelo vírus da leucemia murina de Abelson (RASCHKE; BAIRD; RALPH; NAKOINZ, 1978) e apresentam receptores do tipo Toll-4 (TLR₄) (ZHAN; XIA;

SHAO; WANG *et al.*, 2018). Estas células são aderentes e apresentam uma alta taxa de fagocitose e de multiplicação, e são resistentes e fáceis de manter em cultivo. As células RAW 264.7 são interessantes para testes de toxicidade, pois apresentam atividade metabólica que imita macrófagos de culturas primárias, mas não sofrem fase de declínio no seu crescimento, por serem imortalizadas (RAELE, 2013).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos imunomoduladores de vesículas extracelulares de *Trypanosoma cruzi* sobre células RAW 264.7 durante a infecção experimental *in*

vitro e avaliar esses efeitos em macrófagos RAW 264.7 tratados com aspirina previamente à infecção

2.2 Objetivos específicos

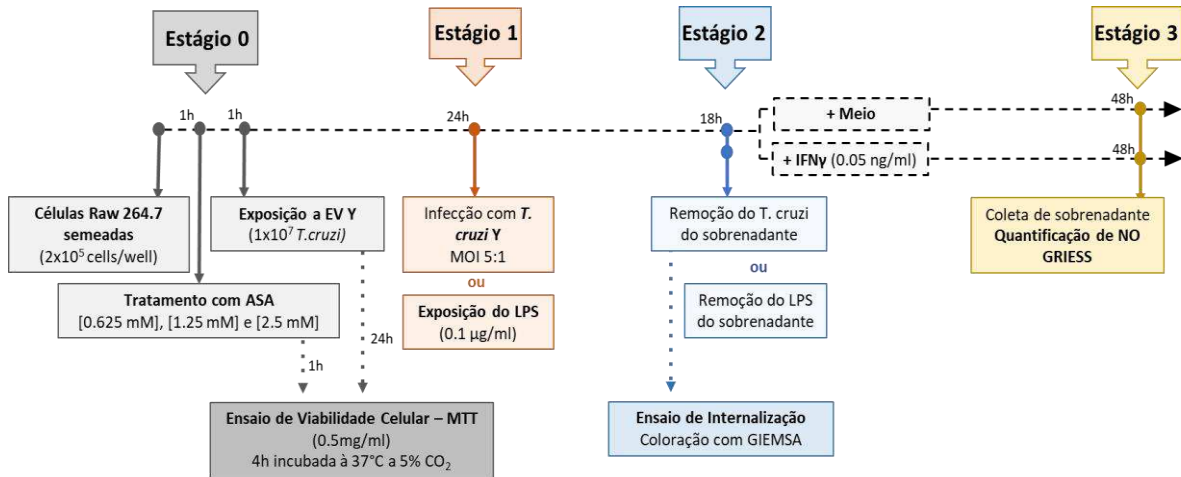
- Obter e isolar vesículas extracelulares liberadas por tripomastigotas de *T. cruzi* cepa Y (EVs-Y).
- Avaliar e validar a viabilidade celular das células RAW 264.7 quando tratadas com diferentes concentrações de aspirina e EVs-Y.
- Executar experimentos *in vitro* em macrófagos RAW 264.7, associando o tratamento de diferentes concentrações de aspirina com EVs-Y, seguido da infecção por *T. cruzi* Y.
- Avaliar o índice de internalização de parasitos através de ensaios de internalização nos diferentes grupos de tratamento.
- Quantificar a produção de óxido nítrico pelos macrófagos dos diferentes grupos de tratamento.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento Experimental

Figura 5. Exposição de células RAW 264.7 a vesículas extracelulares em associação ao tratamento com aspirina. Estagio 0: Células RAW 264.7 foram semeadas na concentração 2×10^5 por poço e incubadas por 1 h. Após aderência as células foram lavadas (PBS) para remoção de células não aderidas e foram tratadas com as diferentes concentrações de aspirina por 1 h. Em seguida as células RAW 264.7 foram lavadas para remoção do fármaco e em seguida foram expostas a vesículas

extracelulares (EVs-Y) de *Trypanosoma cruzi* na concentração 1×10^7 parasitos e incubadas por 24 h. Estágio 1: As células RAW 264.7 foram lavadas para remoção das EVs-Y e foram infectadas com formas tripomastigotas de *T. cruzi* na concentração de 1×10^6 parasitos com MOI 5:1, sendo alguns poços escolhidos para serem expostos ao LPS na concentração 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e incubadas por 18 h. Estágio 2: O sobrenadante foi descartado, as células foram lavadas para remoção das formas tripomastigotas e do LPS. Em seguida as células foram reincubadas sem ou com a adição de IFN- γ na concentração 0,05 ng/mL por 48 h. Estágio 3: O sobrenadante foi coletado após 48 h e foi realizada a quantificação de NO. As incubações foram feitas em estufa de CO₂ 5% a 37 °C e realizados o ensaio de viabilidade celular pelo teste de MTT, ensaio de internalização e quantificação de NO pela técnica de Griess.



3.2 Manutenção Celular

Trypanosoma cruzi cepa Y, pertence a umas das linhagens de *T. cruzi* (Tcl), é mantida a partir de repiques semanais de formas tripomastigotas sanguíneas em camundongos Swiss, aprovado pela Comissão Científica Interna e CEUA da Universidade Estadual de Londrina (Número de Aprovação: CEUA n^o 002.2021 de acordo com o CONCEA. As células VERO-E6 e as células RAW 264.7 são mantidas em estufa 37°C a 5% de CO₂. A manutenção celular é realizada diariamente com troca de meio de cultura RPMI 5% de soro bovino fetal (SBF) e DMEM F12 suplementado com L-arginina e glicose a 10% de SBF.

3.3 Tratamento com aspirina

A aspirina (ASA) (Sigma Aldrich) foi preparada a partir de uma solução mãe com concentração de 50 mM em um microtubo (1,5 mL). Foi diluído 90 mg de ASA em 100 μL de DMSO e levada ao vórtex. Posteriormente o conteúdo foi transferido para um tubo de poliestireno cônico com 10 mL de PBS, e levado ao vórtex. A ASA diluída foi filtrada em filtro com poro 0,22 μm com o auxílio de uma seringa de 10 mL. O filtrado com concentração de 50 mM foi diluído, originando as concentrações de 25

mM, 12,5 mM, 6,25 mM que foram diluídas 10× no poço. As concentrações utilizadas para os tratamentos serão de 0,625 mM, 1,25 mM e 2,5 mM, como previamente estabelecidas por MALVEZI; DA SILVA; PANIS; YAMAUCHI; LOVO-MARTINS *et al.* (2014); ZENG; YANG; LI; FAN *et al.* (2016)

O IFN- γ (Sigma Aldrich) utilizado foi preparado a partir de uma concentração inicial de 10 ng/mL, onde serão adicionados 2 mL de meio RPMI 5%, tornando a solução a 5 ng/mL. Após esta diluição inicial, os 2 mL foram distribuídos em microtubos contendo 100 μ L em cada um, e armazenados em freezer -80°C.

Para uso, 900 μ L de meio RPMI 5% foram adicionados no microtubo contendo o IFN- γ , diluindo-o para 0.5 ng/mL. Esta concentração foi utilizada para os experimentos, uma vez que a concentração final do poço deve ser de 0.05 ng/mL.

3.4 Purificação de Vesículas Extracelulares

Para a obtenção das EVs-Y foram necessárias 5 garrafas de cultura T75 cm² contendo células VERO-E6 infectadas com *T. cruzi* liberando tripomastigotas no sobrenadante (segunda passagem), pois a concentração final de parasitas deve ser superior a 2×10^8 .

Os sobrenadantes das garrafas foram recolhidos em um tubo de poliestireno cônico de 50 mL e centrifugados a $682 \times g$ por 5 minutos a 25°C para baixar os restos celulares. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de 50 mL, sendo centrifugado a $2688 \times g$ por 10 minutos a 25°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de *T. cruzi* foi delicadamente ressuscitado. Foram adicionados 30 mL de meio RPMI sem soro, e a suspensão obtida foi novamente centrifugada a $2688 \times g$ por 10 minutos a 25°C. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi delicadamente ressuscitado em 30 mL de meio RPMI sem soro. O sobrenadante foi centrifugado a $2688 \times g$ por 10 minutos a 25°C, uma alíquota foi retirada e diluída 10× e 100× para contagem dos parasitos em câmara Neubauer. Depois da centrifugação o sobrenadante foi descartado e o *pellet* delicadamente ressuscitado na proporção de 1 mL a cada 1×10^8 tripomastigotas.

O tubo contendo o material ressuscitado com 1×10^8 /mL parasitos, foi incubado em estufa CO₂, 37°C por 2 h. Após a incubação, o sobrenadante foi filtrado em outro tubo com filtro de poro 0,45 μ m.

Após a filtração, foi adicionado $\frac{1}{4}$ do volume total do kit *Total Exosome Isolation* de acordo com as instruções do fabricante. O tubo foi homogeneizado e distribuídos em microtubos de 2 mL e armazenamento em geladeira *overnight*. No dia seguinte, a solução de EVs-Y com kit *Total Exosome Isolation* foi centrifugada a $10.000 \times g$ por 1 h a 4°C. Em seguida, os sobrenadantes dos microtubos foram recolhidos delicadamente e descartados. O *pellet* foi ressuspendido com DPBS estéril, mantendo a proporção de 100 μ L de DPBS para cada 1×10^8 parasitos utilizados inicialmente. As EVs-Y obtidas foram armazenadas em criotubos, identificados e mantidas em geladeira até o momento do uso (máximo em 3 meses) GONÇALVES; UMEZAWA; KATZIN; DE SOUZA *et al.* (1991); TORRECILHAS; SCHUMACHER; ALVES e COLLI (2012).

3.5 Nanosigth tracking analysis

O tamanho, a distribuição e a concentração de EVs-Y (EVs de *T. cruzi* cepa Y) foram caracterizadas utilizando o equipamento *NanoSight* LM10. Os dados obtidos foram analisados pelo software *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA) (versão 3.1) com configurações padrão, de acordo com o protocolo do fabricante. A preparação de EVs-Y foi amostrada duas vezes para gerar duas diluições independentes e reduzir o número de partículas no campo de visão abaixo de 200 faixas detectadas por imagem. De cada amostra, cinco vídeos (30 s cada) foram analisados. Todas as amostras foram medidas usando o mesmo limiar de detecção.

3.6 MTT - Ensaio de viabilidade celular

O ensaio colorimétrico de MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*) foi realizado para avaliar a viabilidade celular da RAW 264.7. O reagente foi preparado com 5 mg do reagente MTT + 1000 μ L de meio RPMI 5%, agitado por 5 minutos e em seguida diluído em 14 mL de RPMI 5%. O ensaio foi realizado em placa de 24 poços, onde triplicatas de 6 grupos foram avaliados. Os grupos foram:

Tabela 1. Grupos tratados para ensaio de viabilidade celular.

1.RAW	2.RAW+	3.RAW+	4.RAW+	5.RAW+	6.RAW+	7.RAW+
	ASA 0,625mM	ASA 1,25mM	ASA 2,5mM	H ₂ O ₂	DMSO	EVs-Y

O grupo RAW+H₂O₂ foi utilizado como controle positivo de morte celular, e RAW+DMSO como controle do diluente da droga (PBS+0.5% de DMSO). As células foram semeadas na concentração de 2×10^5 células por poço e armazenadas em estufa 5% de CO₂ a 37°C e por 1 h. Depois de 1 h, os poços foram lavados e tratados com aspirina por 1 h e com EVs-Y por 24 h e armazenadas em estufa 5% de CO₂, a 37°C por 1 h. Depois, os poços foram lavados com PBS, e então adicionados 500 µL do reagente de MTT em todos os poços e armazenadas novamente em estufa 5% de CO₂, a 37°C por 4 h. Após este período o sobrenadante foi retirado delicadamente e adicionado 300 µL de DMSO. Em triplicata, 100 µL de cada amostra foi transferido para uma placa de 96 poços. A leitura de absorbância da placa de 96 poços foi feita em um comprimento de onda de 550nm.

3.7 Ensaio de Internalização

O ensaio de invasão de *T. cruzi* em macrófagos foi delineado a partir da metodologia descrita por YOSHIDA; MORTARA; ARAGUTH; GONZALEZ *et al.* (1989). As células RAW 264.7 foram semeadas em placa de 24 poços, onde triplicatas de 8 grupos foram feitas. Os grupos estão listados na tabela a seguir:

Tabela 2. Grupos para ensaio de internalização.

1. RAW + Tc	2. RAW + ASA 0,625mM + Tc	3. RAW + ASA 1,25mM + Tc	4. RAW + ASA 2,5mM + Tc
5. RAW +EVs-Y + Tc	6. RAW + ASA 0,625mM + EVs-Y + Tc	7. RAW + ASA 1,25mM + EVs-Y + Tc	8. RAW + ASA 2,5mM + EVs-Y + Tc

As células foram semeadas em lamínulas de vidro na concentração de 2×10^5 células por poço com volume final de 400 µL, e incubadas em estufa por 1 h. Após a adesão, os poços foram lavados e os grupos tratados com as respectivas concentrações de aspirina por 1 h. Depois do tratamento, os poços foram lavados com PBS, e então os grupos foram tratados com EVs-Y em um volume de 10 µL de EVs-Y (equivalente a 1×10^7 *T. cruzi*) + 390 µL de meio, e incubados por 24 h.

No dia seguinte, os poços foram lavados com PBS, os grupos infectados com 1×10^6 *T. cruzi* (tripomastigotas proveniente da cultura celular em Vero-E6) por poço (MOI de 5:1), mantidos em estufa a 37°C, 5% CO₂, por 18 h. Após a infecção, os poços foram lavados com PBS para retirada dos parasitas não internalizados e as células fixadas com metanol.

Para a preparação do corante, 40 gotas do reagente de Giemsa foi adicionado por mL de tampão de coloração, sendo adicionado 500 μ L do corante de Giemsa por poço por 40 minutos. O excesso de corante foi removido com lavagens utilizando o tampão de coloração. As lamínulas foram retiradas dos poços e deixadas para secar, e então, foram coladas com resina do tipo *Permout* (*Fisher Scientific*) em lâminas para a realização da contagem em microscópio óptico.

3.8 Quantificação de Óxido Nítrico

Em uma placa de 96 poços, amostras de 17 grupos (Tabela 2) foram distribuídas do seguinte modo: uma duplicata para quantificação do NO em um tempo de 24h e uma duplicata para quantificação de NO em um tempo de 48 h.

Tabela 3. Grupos para Dosagem de NO.

Grupo Controle		Grupo Infectado
1.	RAW	10. RAW + Tc
2.	RAW+LPS 0,1 μ M	-
3.	RAW + ASA 0,625mM	11. RAW + ASA 0,625mM + Tc
4.	RAW + ASA 1,25mM	12. RAW + ASA 1,25mM + Tc
5.	RAW + ASA 2,5mM	13. RAW + ASA 2,5mM + Tc
6.	RAW + EVs-Y	14. RAW + EVs-Y + Tc
7.	RAW + ASA 0,625mM + EVs-Y	15. RAW + ASA 0,625mM + EVs-Y + Tc
8.	RAW + ASA 1,25mM + EVs-Y	16. RAW + ASA 1,25mM + EVs-Y + Tc
9.	RAW + ASA 2,5mM + EV-Y	17. RAW + ASA 2,5mM + EVs-Y + Tc

O grupo RAW+LPS 0,1 μ M foi utilizado como controle positivo da produção de NO. As células foram semeadas na concentração de 2×10^5 células por poço em um volume final de 200 μ L por poço, a placa foi armazenada em estufa 5% de CO₂, a 37°C por 1 h. Depois de 1 h, os poços foram lavados e os grupos foram tratados com as respectivas concentrações de aspirina, e mantidos em estufa por 1 h. Após o tratamento, os poços foram lavados com PBS.

Seguiu-se então os tratamentos com EVs-Y nos determinados grupos, onde 10 μ L do criotubo contendo EVs-Y (equivalente a 1×10^7 parasitos) foram adicionados aos poços com 190 μ L de meio RPMI 5%, por 24 h e mantidos em estufa. No dia seguinte, os poços foram lavados com PBS, e os grupos foram infectados com

1×10^6 tripomastigotas de *T. cruzi* Y (de segunda passagem, proveniente da cultura celular em Vero-E6) por poço (*Multiplicity of infection* - MOI de 5:1), e mantidos em estufa por 18h. Após a infecção, os poços foram lavados com PBS, e adicionados 200 μ L de meio RPMI 5%. O sobrenadante foi retirado com 48 h, onde 50 μ L de cada poço foi utilizado para leitura.

Para a quantificação de NO, foi utilizado o reagente de Griess (400mg de Sulfanilamida + 40 mg de NEED + 1 mL de ácido fosfórico + 36 mL de água ultrapura). O resultado foi obtido através da comparação com uma curva de concentração conhecida realizada com nitrito (250 μ M, 125 μ M, 62.5 μ M, 31.25 μ M, 15.62 μ M, 7.81 μ M, 3.90 μ M, e branco).

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização de EVs liberadas por tripomastigotas de *T. cruzi* cepa Y

Análise de nanopartículas de vesículas extracelulares liberadas espontaneamente por formas tripomastigotas cultivadas da cepa Y de *T. cruzi* mostrou uma população de vesículas variando de 50 nm a 250 nm. O tamanho médio dos EVs-Y obtidos sendo a media 126 nm e a moda foi de 95 nm (Figura 6), confirmando que a solução de EVs-Y utilizada neste trabalho compreende uma mistura heterogênea de vesículas extracelulares contendo exossomos e microvesículas (BAYER-SANTOS; AGUILAR-BONAVIDES; RODRIGUES; CORDERO *et al.*, 2013; NOGUEIRA; RIBEIRO; SILVEIRA; CAMPOS *et al.*, 2015).

4.2 Ensaio de viabilidade celular pelo teste de MTT.

O efeito citotóxico da aspirina e EVs-Y em células RAW 264.7 foi avaliado usando o ensaio MTT (Figura 7). Os resultados indicaram que a aspirina não teve efeito citotóxico evidente em células RAW 264.7 em uma concentração de até 2,5 mM (Figura 7A). As células foram incubadas na presença de EVs-Y (liberado para 1×10^7 parasitos) em meio sem soro por 24 h. EVs-Y não teve efeito citotóxico em células RAW 264.7 (Figura 7B) ($p = 0,4688$).

Figura 6. Análise do rastreamento de nanopartículas de vesículas extracelulares isolados de *T. cruzi* Y. Na figura A, a concentração (partículas/ml) e distribuição de tamanho (nm) para vesículas extracelulares liberadas espontaneamente por formas tripomastigotas derivados da cultura de *T. cruzi* Y (EVs-Y) medidos no equipamento *NanoSight* LM10. A figura B mostra um *print* do vídeo liberado pelo equipamento durante a leitura, a mensuração do tamanho e concentração foi avaliado pelo movimento browniano e pela refringência emitida pela EVs-Y. Os dados são representativos em dois experimentos independentes.

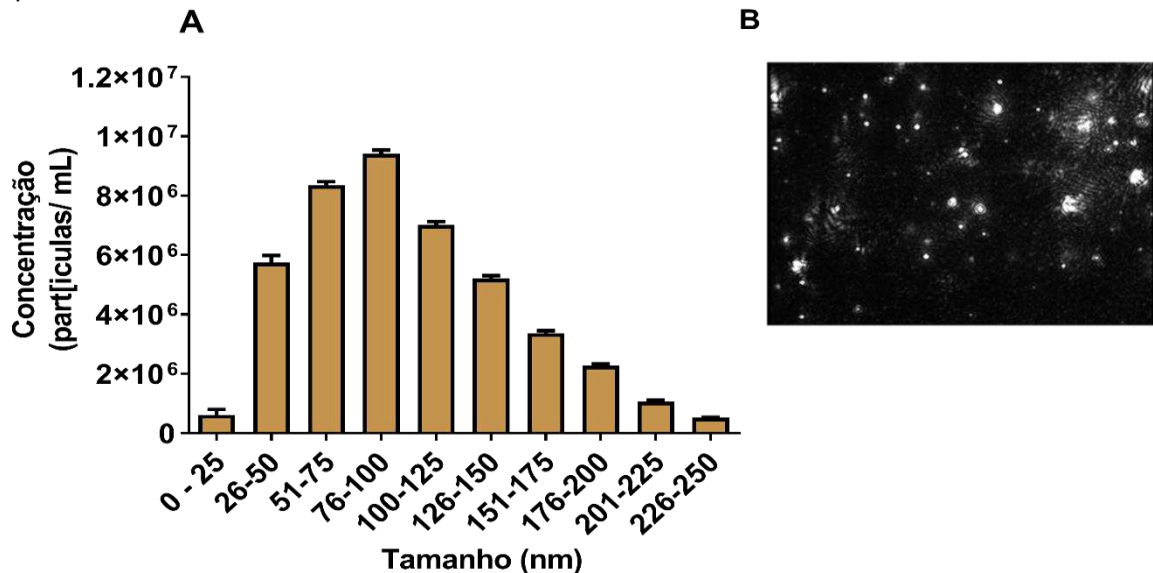
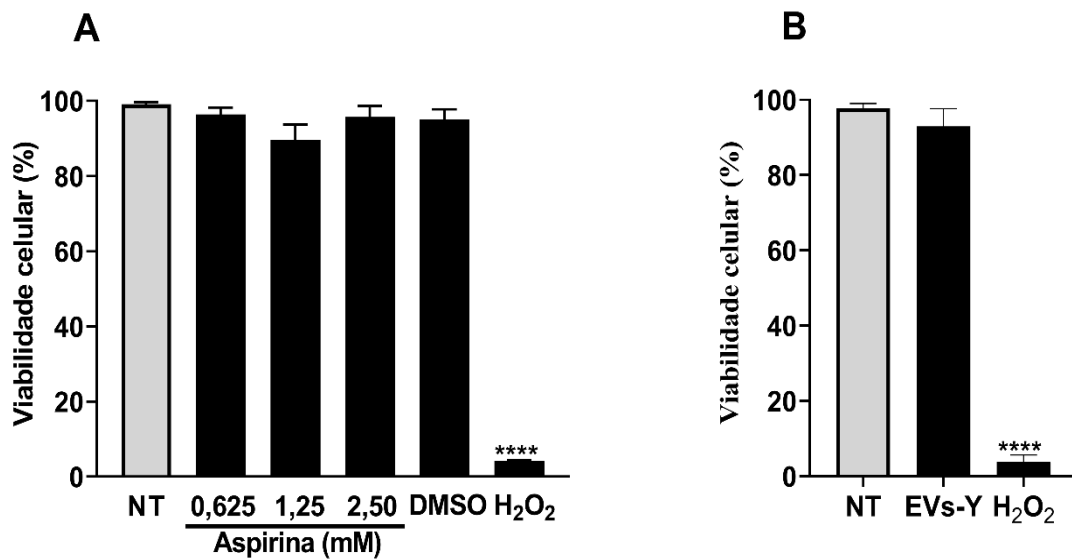


Figura 7. Viabilidade de células RAW 264.7 após tratamento com aspirina. A viabilidade celular foi determinada por ensaio colorimétrico de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Os valores são a média \pm erro padrão para determinação em triplicada e são representativos de duas experiências independentes. H_2O_2 (1 mM) foi usado como controle de morte celular. O controle do veículo foi obtido a partir de células tratadas apenas com DMSO a 0,05%. NT - grupo não tratado. **** $p \leq 0,0001$.



4.3 A aspirina diminui a internalização do parasita em células RAW 264.7

Para determinar se a COX está envolvida na entrada do *T. cruzi*, as células foram infectadas com as formas tripomastigotas na presença de aspirina em concentrações variadas. Conforme mostrado na Figura 8, todas as concentrações testadas inibiram a internalização das formas tripomastigotas nessas células ($p \leq 0,005$).

4.4 O aumento da invasão celular pela ação de EVs-Y foi reduzido pela aspirina

Para obter mais evidências da participação de COX na invasão de *T. cruzi* potencializada por EVs-Y ($p = 0,0003$) (Figura 9), realizamos o tratamento prévio das células RAW 264.7 com aspirina (0,625 - 2,5 mM), a incubação de EVs-Y seguida pela infecção por *T. cruzi*. Conforme mostrado na Figura 9, o tratamento com aspirina (0,625 mM, 1,25 mM e 2,5 mM) diminuiu a invasão mediada por EVs-Y ($p = 0,0078$, $p = 0,0005$ e $p = 0,0091$, respectivamente). Além disso, aumento no número de formas tripomastigotas internalizadas no citoplasma da célula em relação aos controles, indicando a modulação exercida por EVs-Y para favorecer o parasita (Figura 10).

Figura 8. Efeito da aspirina na invasão celular pelo *T. cruzi*. Índice de internalização do processo de interação entre células RAW 264.7 tratadas ou não por 1 h com aspirina (0,625 - 2,5 mM). Os valores são a média \pm erro padrão para determinação em triplicado e são representativos de duas experiências independentes. ** $p = 0,0045$ e *** $p = 0,0009$ para comparação com cultura de células em meio isolado (NT - grupo não tratado), ns = não significativo.

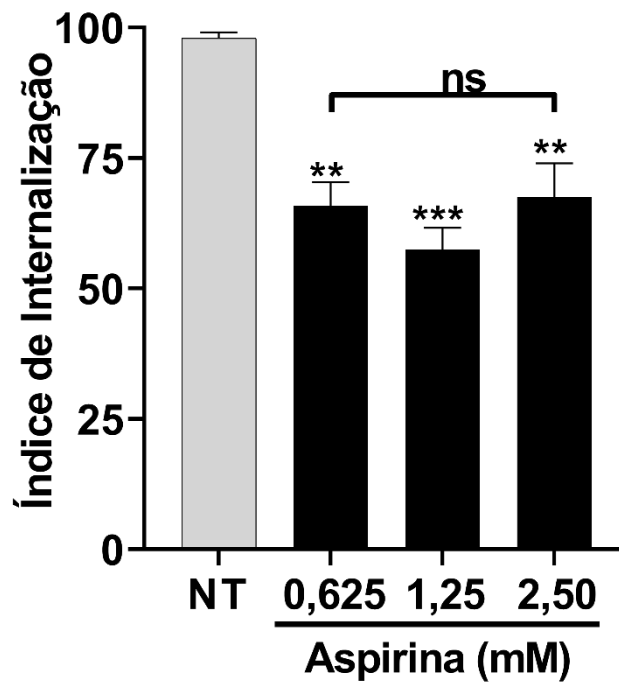


Figura 9. Efeito da aspirina na invasão celular por *T. cruzi* mediada por EVs-Y. Índice de internalização do processo de interação entre células RAW 264.7 tratadas ou não por 1 h com aspirina (0,625 - 2,5mM), incubação prévia de EVs-Y seguida de infecção por *T. cruzi*. Os valores são a média \pm erro padrão para determinação em triplicado e são representativos de duas experiências independentes. ** $p = 0,0078$ e *** $p = 0,0003$ para uma comparação com a cultura de células infectadas em meio sozinho.

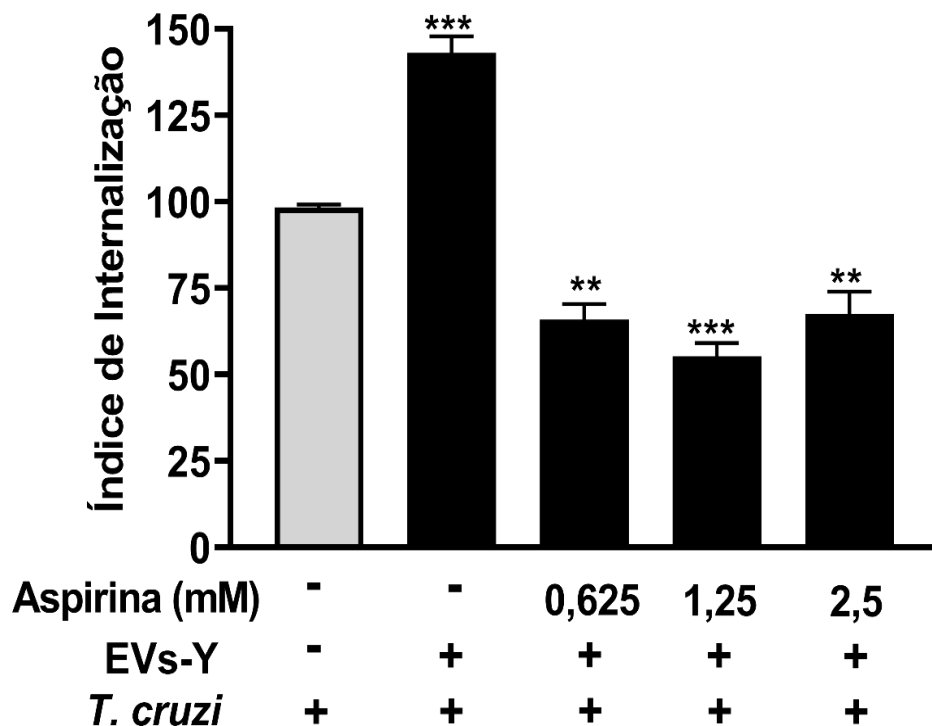
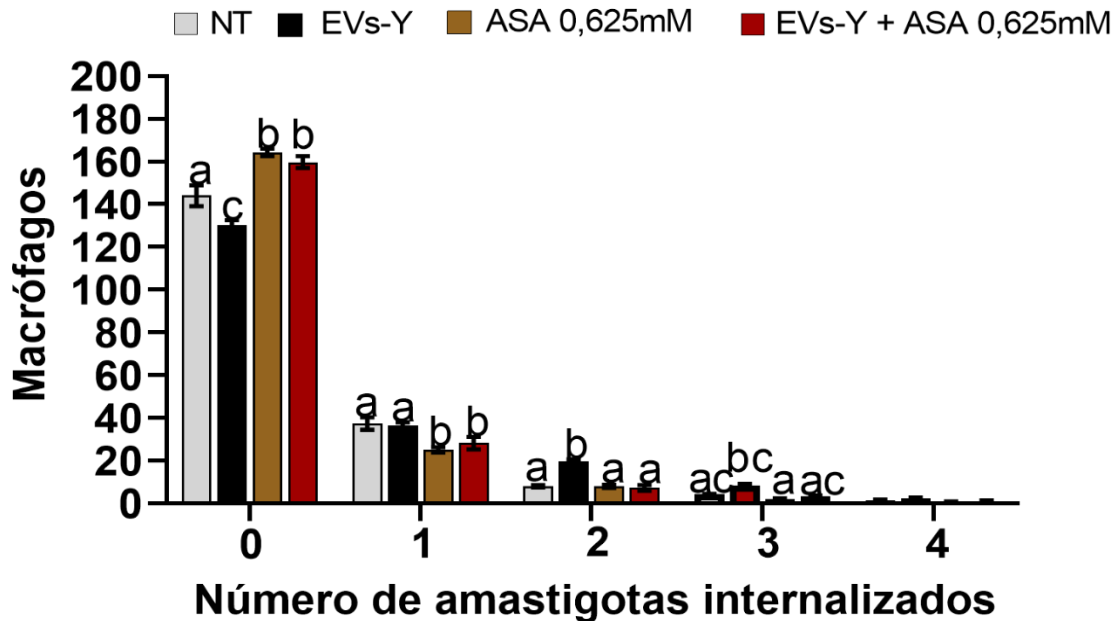


Figura 10. Níveis de infecção por *Trypanosoma cruzi* em células RAW 264.7. A) O número de células RAW 264.7 infectadas com duas amastigotas por célula aumentou com a presença de EVs-Y. Apenas 0,625 mM de aspirina foi capaz de provocar redução do número de amastigotas internalizados. A aspirina diminuiu os efeitos de EVs-Y no nível de infecção de células RAW com uma diminuição no

número de células contendo um e dois amastigotas por célula B) Células RAW 264.7 coradas com Giemsa sobre diferentes tratamentos. B.1 Células não infectadas. B.2 Células infectadas com tripomastigotas de *T. cruzi*. B.3 Células expostas as EVs-Y e infectadas com tripomastigotas de *T. cruzi*. B.4 Células tratadas com ASA, expostas as EVs-Y e infectadas com *T. cruzi*. Os resultados são a média \pm erro padrão para determinações em duplicata. As médias que não compartilham letra são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$, ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey).



4.5 EVs-Y antes da infecção por *T. cruzi* diminui os níveis de produção de NO pelas células RAW 264.7

Células RAW 264.7 induziram produção de NO abaixo do ideal em resposta à infecção por *T. cruzi* Y, exibindo aumento de 8,0 vezes na liberação de NO em comparação com controles sem infecção ($10,82 \pm 1,7$ versus $1,35 \pm 0,03$, $p = 0,0001$), mas inferior ao observado em LPS - células tratadas, ($10,82 \pm 1,7$ versus $16,85 \pm 0,37$, $p = 0,0233$) (Figura. 11). Células RAW 264.7 expostas a EVs-Y e posteriormente infectadas com formas tripomastigotas de *T. cruzi* apresentaram menor produção de óxido nítrico (NO) ($1,46 \pm 0,05$ versus $10,82 \pm 1,7$, $p=0,00033$) (Figura 11).

4.6 O tratamento prévio com aspirina restaura a produção de nitrito pelas células RAW infectadas após exposição as EVs-Y

Curiosamente, quando as células RAW foram tratadas com aspirina (0,625 mM, 1,25 mM e 2,5 mM), antes da exposição a EVs-Y e infecção subsequente, houve maior produção de NO (Figura 11), bem como menor internalização de tripomastigotas em comparação com os controles (Figura 10).

4.7 EVs-Y inibe a geração de NO induzida por IFN- γ

Quando IFN- γ foi administrado a células RAW 264.7 infectadas com *T. cruzi*, a produção de NO, medida como nitrito, aumentou do nível basal de 10 para 19 μ M após 48 h. O efeito inibitório de EVs-Y na produção de NO em células RAW ativadas por IFN- γ é mostrado na Figura 12. Juntos, os resultados apresentados na Fig. (s) 11-12, reforçaram o conceito de que EVs-Y liberados por *T. cruzi* modulam a resposta dos macrófagos a favor do parasita e revela um papel da COX na modulação exercida por EVs-Y no compartimento imune inato.

Figura 11. Células RAW 264.7 expostas a EVs-Y e posteriormente infectadas apresentaram menor produção de nitrito. Esta diminuição foi restaurada pela aspirina. As células foram tratadas ou não por 1 h com aspirina (0,625 - 2,5 mM), incubação prévia de EVs-Y seguida de infecção por *T. cruzi*. Os valores são a média \pm erro padrão para determinação em triplicado e são representativos de duas experiências independentes. Todos * significa diferente de célula não tratada e não infectada. **** $p \leq 0,001$, *** $p = 0,0001$, ** $p = 0,0022$, $p = 0,0033$, $\Psi p = 0,0233$, $\neq p \leq 0,05$ ns = não significativo.

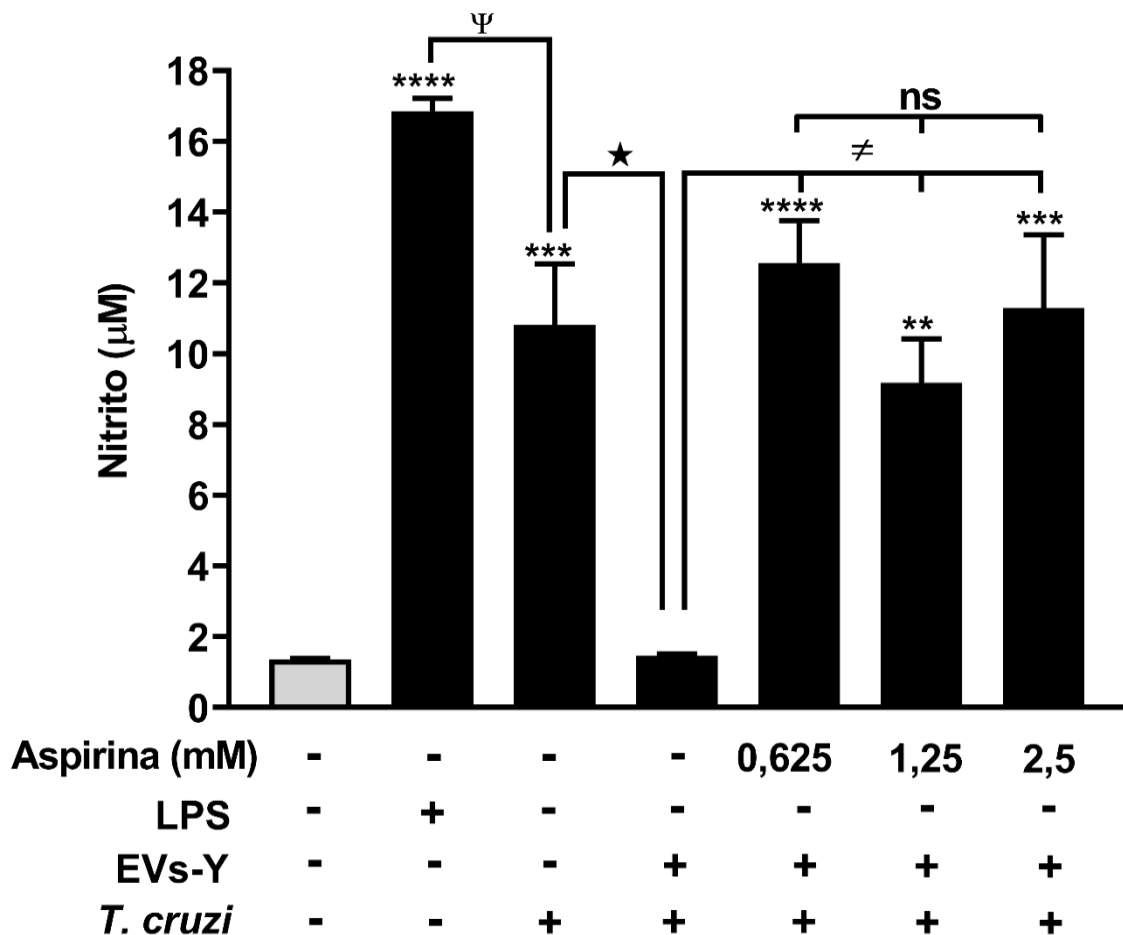
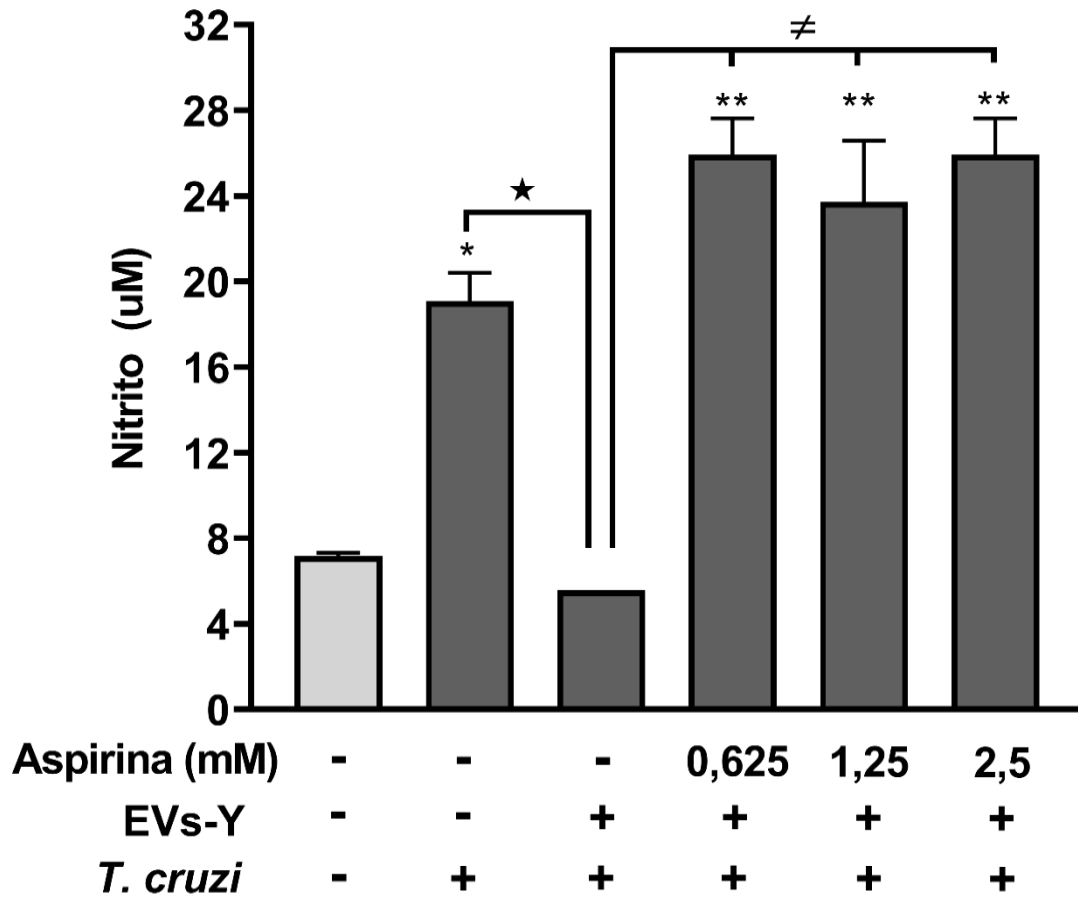


Figura 12. Células RAW 264.7 ativadas por IFN- γ expostas às EVs-Y e posteriormente infectadas apresentaram menor produção de nitrito. Esta diminuição foi restaurada pela aspirina. As células foram tratadas ou não por 1 h com aspirina (0,625 - 2,5 mM), incubação prévia de EVs-Y seguida de infecção por *T. cruzi*. Os valores são a média \pm erro padrão para determinação em triplicado e são

representativos de duas experiências independentes. Todos * significa diferente de célula não tratada e não infectada. ** $p \leq 0,01$, * $p = 0,0148$, ★ $p = 0,0079$, ≠ $p \leq 0,01$ e ns = não significativo.



5. DISCUSSÃO

Os macrófagos são células mononucleares que se encontram distribuídas por todo o organismo, seja na circulação sanguínea (como monócitos) ou residentes em tecidos, e são um dos principais tipos celulares fagocíticos que produzem citocinas para sinalização e recrutamento celular (ABBAS, 2012; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI; KOOGAN *et al.*, 2019). Durante a infecção por *T. cruzi*, os macrófagos atuam tanto na fase aguda da infecção como na fase crônica, desempenhando papéis cruciais para a sobrevivência do hospedeiro e influenciando diretamente o desfecho da doença (ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014; JUNQUEIRA; CAETANO; BARTHOLOMEU; MELO *et al.*, 2010). Uma vez que os macrófagos são atores-chave na resistência inicial à infecção por *T. cruzi*, uma melhor compreensão de suas respostas ao parasita é crucial para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas para DC.

A produção de eicosanóides representa um importante ponto de regulação entre a resposta imune do hospedeiro e a eficiência da infecção por *T. cruzi* (MACHADO; MUKHERJEE; WEISS; TANOWITZ *et al.*, 2011; MALVEZI; DA SILVA; PANIS; YAMAUCHI; LOVO-MARTINS *et al.*, 2014; MALVEZI; PANIS; DA SILVA; DE FREITAS *et al.*, 2014). Na fase inicial da interação entre a célula do hospedeiro e o parasito, o *T. cruzi* é capaz de modular o metabolismo celular para sobreviver. Já foi descrito que o parasito sintetiza preferencialmente tromboxano A₂ (ASHTON; MUKHERJEE; NAGAJYOTHI; HUANG *et al.*, 2007) além de estimular a produção de PGE₂, contribuindo para a invasão (MORAES; DINIZ; BAHIA, 2015) e sobrevivência do parasito no hospedeiro (PINGE-FILHO; TADOKORO; ABRAHAMSOHN, 1999; STERIN-BORDA; GORELIK; GOREN; CAPPÀ *et al.*, 1996). Em alta concentração a PGE₂ está associada a imunossupressão observada no início da resposta ao parasito (PINGE-FILHO; TADOKORO; ABRAHAMSOHN, 1999) além de diminuir a secreção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos, reduzindo também a apresentação de antígenos e a produção de radicais livres nessas células (ALVAREZ; VALERA; MUNICIO; HUGO *et al.*, 2010; RANGEL MORENO; ESTRADA GARCIA; DE LA LUZ GARCIA HERNANDEZ; AGUILAR LEON *et al.*, 2002).

Macrófagos infectados por *T. cruzi* apresentam aumento de organelas citoplasmáticas denominadas corpos lipídicos ou adipossomas. Esses corpos lipídicos atuam como sítios de grande síntese de PGE₂ ao fornecerem substrato para as enzimas ciclooxigenases (COX) que se acumulam no entorno dessas organelas

(D'AVILA; TOLEDO; MELO, 2012). Dessa forma, a formação dos corpos lipídicos e a consequente produção de PGE₂ estão envolvidos com mecanismos de escape desencadeados por *T. cruzi* (D'AVILA; TOLEDO; MELO, 2012; LOVO-MARTINS; MALVEZI; ZANLUQUI; LUCCHETTI *et al.*, 2018). Um mecanismo potencial de sobrevivência intracelular de microrganismos eucarióticos em macrófagos é a desativação de macrófagos por prostaglandinas e leucotrienos produzidos pelo microrganismo (nos fagossomos ou extracelularmente) (NOVERR; ERB-DOWNWARD; HUFFNAGLE, 2003).

Nosso grupo demonstrou anteriormente 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 β (IL1- β), de óxido nítrico e possivelmente de lipoxinas (Figura 13) (MALVEZI; DA SILVA; PANIS; YAMAUCHI; LOVO-MARTINS, 2014). Além disso, o tratamento *in vivo* com inibidores da COX reduziu o dano cardíaco observado durante a fase aguda (ABDALLA; FARIA; SILVA; CASTRO *et al.*, 2008) e crônica da DC experimental (PEREIRA; MALVEZI; LOVO-MARTINS; LUCCHETTI *et al.*, 2020). Utilizando macrófagos de linhagem celular, obtivemos resultados semelhantes quanto à internalização de parasitos nas células tratadas com ASA. As diferentes concentrações de ASA utilizadas (0,625, 1,25 e 2,5 mM) diminuíram a internalização de parasitos nas células RAW-264.7 em comparação ao grupo controle (Figura 8). Importante ressaltar que as concentrações de ASA utilizadas não foram citotóxicas para as células RAW 264.7 no protocolo adotado nesse trabalho (Figura 7).

O papel das vesículas extracelulares liberadas por *T. cruzi* e por células infectadas por *T. cruzi* na modulação da resposta imunológica do hospedeiro a favor do parasito tem sido descrito nos últimos anos (CESTARI; ANSA-ADDO; DEOLINDO; INAL *et al.*, 2012; LOVO-MARTINS; MALVEZI; ZANLUQUI; LUCCHETTI *et al.*, 2018; TROCOLI TORRECILHAS; TONELLI; PAVANELLI; DA SILVA *et al.*, 2009). As EVs secretadas durante a infecção aguda e/ou crônica por *T. cruzi*, desempenham um papel na disseminação e sobrevivência deste parasita no hospedeiro mamífero (DE PABLOS TORRÓ; RETANA MOREIRA; OSUNA, 2018). Neste contexto, os macrófagos são um dos principais alvos das vesículas liberadas por *T. cruzi* Y (CRONEMBERGER-ANDRADE; XANDER; SOARES; PESSOA *et al.*, 2020).

Para os ensaios aqui apresentados foram obtidas EVs-Y a partir de tripomastigotas de cultura da cepa Y de *T. cruzi* segundo o protocolo descrito por LOVO-MARTINS; MALVEZI; ZANLUQUI; LUCCHETTI *et al.* (2018) através da utilização de um kit comercial para purificação das EVs-Y. A análise dessas EVs-Y pela técnica de *Nanosight Tracking Analysis* mostrou que elas apresentam tamanho entre 50 nm a 250 nm, o que confirma a obtenção de uma população mista, composta por exossomos (20-100 nm) e microvesículas (100-1000 nm) (BAYER-SANTOS; AGUILAR-BONAVIDES; RODRIGUES; CORDERO *et al.*, 2013; NOGUEIRA; RIBEIRO; SILVEIRA; CAMPOS *et al.*, 2015). Por isso optou-se pela denominação abrangente “vesículas extracelulares de *T. cruzi* EVs-Y” para se referir às vesículas utilizadas no presente trabalho (Figura 6).

A liberação de EVs-Y durante a infecção por *T. cruzi* além de atuar como mecanismo de evasão do sistema imunológico também cria um microambiente que favorece o parasito, modulando a síntese de eicosanoides. As EVs de *T. cruzi* induzem a formação de corpos lipídicos e de PGE₂ em macrófagos mesmo antes do contato dessas células com o *T. cruzi* (LOVO-MARTINS; MALVEZI; ZANLUQUI; LUCCHETTI *et al.*, 2018). Adicionalmente, as EVs-Y parecem proteger os lipídios bioativos da degradação e desempenham um papel na síntese transcelular de prostaglandinas e leucotrienos (SAGINI; COSTANZI; EMILIANI; BURATTA *et al.*, 2018). As EVs-Y liberadas pelo *T. cruzi* favorecem a invasão do parasito na célula hospedeira, imunomodulam a resposta do hospedeiro e ajudam o parasito a escapar dessa resposta (RETANA MOREIRA; RODRÍGUEZ SERRANO; OSUNA, 2019).

Diante disso, nossos resultados mostram pela primeira vez a relação entre a COX e a ação das EVs-Y na internalização de *T. cruzi* em macrófagos, assim como na ativação microbicida dessas células. As células RAW 264.7 que tiveram contato com EVs-Y antes da infecção apresentaram maior internalização de parasitos em comparação com as células que não tiveram contato com EVs-Y. Surpreendentemente, quando as células foram tratadas com diferentes concentrações de ASA antes da incubação com EVs-Y a internalização de parasitos caiu, sendo menor até mesmo que o grupo controle. Dessa forma, pudemos observar que o bloqueio farmacológico das enzimas COX com ASA interferiu com os efeitos exercidos pelas EVs-Y no que tange ao aumento da internalização dos parasitos em macrófagos (Figura 10).

Nossos dados também mostraram que macrófagos RAW 264.7 expostos a EVs-Y e posteriormente infectados com formas tripomastigotas de *T. cruzi* produziram níveis mais baixos de nitrito (Figura 11). Contudo, quando os macrófagos foram tratados com aspirina, um inibidor duplo da COX, antes da exposição às EVs-Y, e posterior infecção pelo *T. cruzi*, a produção de nitrito pelos macrófagos retornou a níveis semelhantes àqueles produzidos pela célula apenas infectada (Figura 11).

A ativação dos macrófagos na fase aguda da infecção, essencial para o controle do parasitismo, ocorre de forma mais eficiente após a ativação da imunidade adaptativa, especificamente de linfócitos T *helper* do padrão Th1. O tratamento *in vitro* de macrófagos com citocinas associadas ao padrão Th1, como IFN- γ , IL-12 e TNF- α resulta em eficiente ativação dos macrófagos com produção de óxido nítrico e consequente morte das formas amastigotas intracelulares (ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014). Nossos resultados aqui mostrados confirmam esse fenômeno. Os macrófagos RAW-264.7 utilizados produziram 10,8 μ M de nitrito quando infectados por *T. cruzi* (Figura 11, terceira barra). Contudo, quando essas células foram infectadas por *T. cruzi* e estimuladas com IFN- γ a produção de nitrito praticamente dobrou, chegando a 19,08 μ M (Figura 12, segunda coluna). Mesmo nas células estimuladas com IFN- γ , as EVs-Y induziram redução do NO produzido após a infecção. Esse efeito foi novamente revertido quando às células haviam sido tratadas com aspirina antes do contato com EVs-Y (Figura 12).

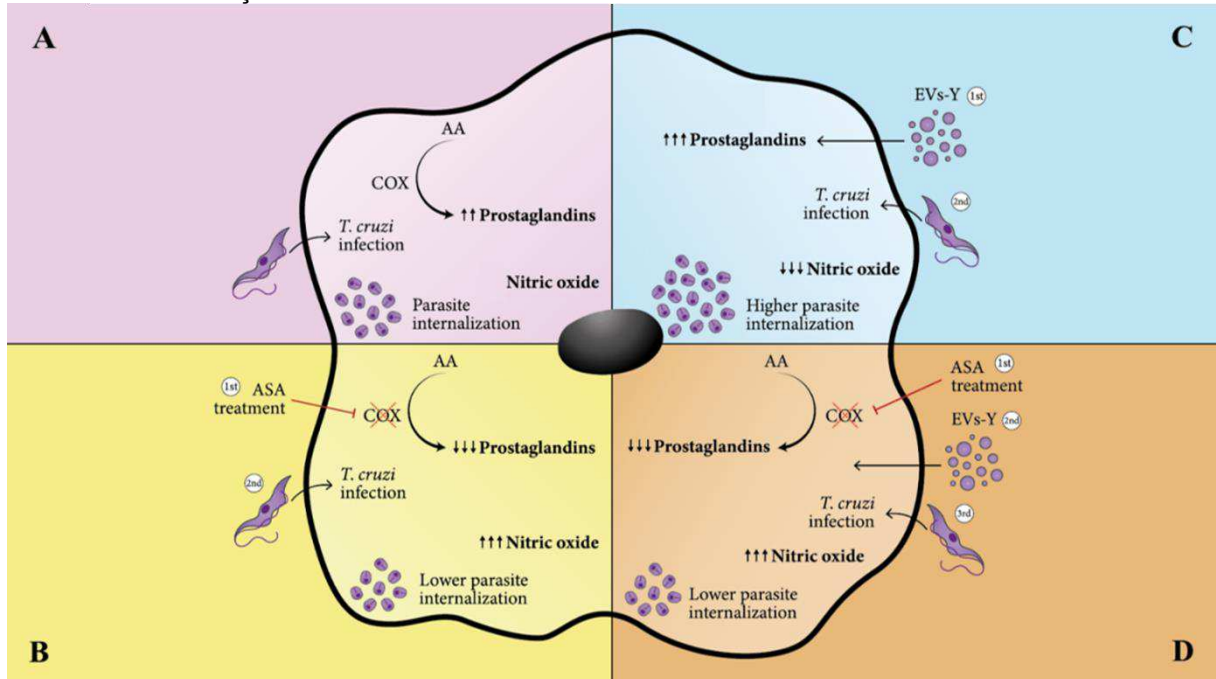
A inibição da atividade da COX pode aumentar os níveis de NO, restaurando assim a atividade antiparasitária dos macrófagos (KIERSZENBAUM; WIRTH; MCCANN; SJOERDSMA *et al.*, 1987). Nossos resultados são consistentes com essa hipótese. Nesse sentido, outros estudos vêm demonstrando que altos níveis de PGE₂ favorecem a replicação do *T. cruzi* e o tratamento de células infectadas com anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), reduz significativamente a replicação do parasita (HIDEKO TATAKIHARA; CECCHINI; BORGES; MALVEZI *et al.*, 2008; MALVEZI; DA SILVA; PANIS; YAMAUCHI; LOVO-MARTINS *et al.*, 2014; TRINDADE; FREIRE-DE-LIMA; CÔRTE-REAL; DECOTE-RICARDO *et al.*, 2021). Curiosamente, a adição de PGE₂ exógena também é capaz de aumentar a replicação do parasita *Leishmania amazonensis* em macrófagos, indicando que a PGE₂ aumentou a carga intracelular desse patógeno em camundongos suscetíveis (PINHEIRO; NUNES; PINHEIRO; D'AVILA *et al.*, 2009) e restaurou a ação invasiva do *T. cruzi* em

macrófagos previamente tratados com aspirina (MALVEZI; DA SILVA; PANIS; YAMAUCHI; LOVO-MARTINS *et al.*, 2014). Além disso, uma característica distintiva dos macrófagos desencadeados pelo *T. cruzi* é a presença de um número aumentado de corpos lipídicos (D'AVILA; TOLEDO; MELO, 2012). O *T. cruzi* induz corpos lipídicos que atuam como sítios de aumento da síntese de PGE₂ e que provavelmente estão envolvidos em mecanismos de escape desencadeados pelo *T. cruzi* (D'AVILA; FREIRE-DE-LIMA; ROQUE; TEIXEIRA *et al.*, 2011; LOVO-MARTINS; MALVEZI; ZANLUQUI; LUCCHETTI *et al.*, 2018).

O efeito benéfico da aspirina está relacionado a dose administrada. Em alguns modelos experimentais *in vivo*, o uso de baixas doses de aspirina aumentou a sobrevivência dos animais e reduziu a presença de infiltrado inflamatório no tecido cardíaco, essa melhora pode estar relacionada com a produção de LXA₄. A lipoxina disparada por aspirina apresenta propriedades pro-resolução da inflamação reduzindo os danos teciduais causados pela infecção por *T. cruzi* (CARRILLO; RABELO; BARBOSA; RATES *et al.*, 2021). PEREIRA; MALVEZI; LOVO-MARTINS; LUCCHETTI *et al.* (2020) demonstraram que a monoterapia com doses baixas de aspirina durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi* reduziu lesões cardíacas teciduais, mostrando os efeitos protetivos exercidos pela aspirina. *In vitro*, nossos dados corroboram aqueles obtidos por MALVEZI; DA SILVA; PANIS; YAMAUCHI; LOVO-MARTINS *et al.* (2014), que utilizaram em seus experimentos as mesmas concentrações de ASA utilizadas no nosso estudo. Em acordo, eles observaram redução na internalização do parasito, aumento de óxido nítrico e IL-1 β , além disso o tratamento com BOC-2 (antagonista LXA₄) demonstrou que o efeito exercido pela aspirina está ligado a produção de lipoxinas.

Nossos dados permitem conceituar que os EVs-Y liberados por *T. cruzi* modulam a resposta inflamatória em macrófagos RAW 264.7 a favor do parasita e revelam pela primeira vez um papel da COX nesta modulação. Isso pode ter implicações importantes para uma nova perspectiva da terapia anti-inflamatória na doença de Chagas (Figura 13).

Figura 13. Resumo dos efeitos do bloqueio da COX na patogênese exercida por EV-Y em macrófagos infectados por *T. cruzi*. A) Em macrófagos, a infecção pelo *Trypanosoma cruzi* está associada à ativação celular, com a produção de prostaglandinas e óxido nítrico, e mesmo assim, a presença de amastigotas intracelulares. B) Quando os macrófagos são tratados com aspirina (ASA) antes da infecção, as células apresentam menor internalização do parasita e aumento dos níveis da molécula microbicida óxido nítrico. C) Por outro lado, macrófagos que entram em contato com vesículas extracelulares liberadas pela cepa Y de *T. cruzi* (EVs-Y) produzem mais prostaglandinas e, após a infecção, apresentam maior internalização do parasita e menor produção de óxido nítrico. D) No entanto, quando a COX é bloqueada pela aspirina antes do contato com EVs-Y, a infecção progride com menor internalização do parasita e maior produção de óxido nítrico, demonstrando um papel da COX nessa modulação.



6. CONCLUSÃO

Células RAW 264.7 expostas às EVs-Y e posteriormente infectadas com formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Cepa Y) apresentaram menor produção de óxido nítrico e maior número de formas tripomastigotas internalizadas no citoplasma em relação aos controles. Quando tratadas com aspirina, um inibidor da ciclooxygenase 1 e 2, antes da exposição às EVs-Y e subsequente infecção por *T. cruzi*, houve maior produção de óxido nítrico e menor internalização de tripomastigotas em relação aos controles. Em adição, EVs-Y inibiram a geração de óxido nítrico induzida por IFN- γ sendo que a produção de óxido nítrico foi restaurada pelo tratamento prévio das células com aspirina. Esses achados enfatizam que EVs-Y podem regular a síntese de óxido nítrico em células RAW 264.7 infectadas por *T. cruzi*. Novos experimentos são necessários para determinar a provável ação das EVs-Y sobre a atividade da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Nossos dados sugerem que EVs-Y modula a resposta de células RAW 264.7 em favor do *T. cruzi* e indicam um papel para ciclooxygenase na modulação imunológica exercida por EVs-Y.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. **Imunologia celular e molecular 7a edição**. Elsevier Brasil, 2012. 8535259724.
- ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. J. I. C. E. M.; KOOGAN, G., Ed. *et al.* Circulação de Leucócitos e migração para os tecidos. p. 39-56, 2019.
- ABDALLA, G.; FARIA, G.; SILVA, K.; CASTRO, E. *et al.* Trypanosoma cruzi: the role of PGE2 in immune response during the acute phase of experimental infection. 118, n. 4, p. 514-521, 2008.
- ABELS, E. R.; BREAKFIELD, X. O. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. **Cell Mol Neurobiol**, 36, n. 3, p. 301-312, Apr 2016.
- AKERS, J. C.; GONDA, D.; KIM, R.; CARTER, B. S. *et al.* Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. **J Neurooncol**, 113, n. 1, p. 1-11, May 2013.
- ALIBERTI, J. C.; CARDOSO, M. A.; MARTINS, G. A.; GAZZINELLI, R. T. *et al.* Interleukin-12 mediates resistance to Trypanosoma cruzi in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infect Immun**, 64, n. 6, p. 1961-1967, Jun 1996.
- ALVAREZ, Y.; VALERA, I.; MUNICIO, C.; HUGO, E. *et al.* Eicosanoids in the innate immune response: TLR and non-TLR routes. **Mediators Inflamm**, 2010, p. 1-14, 2010.
- ANDRADE, D. V.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Acute chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. **PLoS Negl Trop Dis**, 8, n. 7, p. e3010, 2014.
- 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**, 61, n. 7, p. 1277-1287, Jun 29 1990.
- ARALDI, E.; KRÄMER-ALBERS, E. M.; HOEN, E. N.; PEINADO, H. *et al.* International Society for Extracellular Vesicles: first annual meeting, April 17-21, 2012: ISEV-2012. **J Extracell Vesicles**, 1, p. 19995, 2012.
- ASHTON, A. W.; MUKHERJEE, S.; NAGAJYOTHI, F. N.; HUANG, H. *et al.* Thromboxane A2 is a key regulator of pathogenesis during Trypanosoma cruzi infection. **J Exp Med**, 204, n. 4, p. 929-940, Apr 16 2007.
- AUGER, M. J. T. m. The biology of macrophage. p. 3-72, 1992.
- BALOUZ, V.; AGÜERO, F.; BUSCAGLIA, C. A. Chagas Disease Diagnostic Applications: Present Knowledge and Future Steps. **Adv Parasitol**, 97, p. 1-45, 2017.
- BARTENEVA, N. S.; MALTSEV, N.; VOROBEV, I. A. Microvesicles and intercellular communication in the context of parasitism. **Front Cell Infect Microbiol**, 3, p. 49, 2013.
- BAYER-SANTOS, E.; AGUILAR-BONAVIDES, C.; RODRIGUES, S. P.; CORDERO, E. M. *et al.* Proteomic analysis of Trypanosoma cruzi secretome: characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins. **J Proteome Res**, 12, n. 2, p. 883-897, Feb 1 2013.

- BENZIGER, C. P.; DO CARMO, G. A. L.; RIBEIRO, A. L. P. Chagas Cardiomyopathy: Clinical Presentation and Management in the Americas. **Cardiol Clin**, 35, n. 1, p. 31-47, Feb 2017.
- BERN, C. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. **N Engl J Med**, 364, n. 26, p. 2527-2534, Jun 30 2011.
- BERN, C.; MESSENGER, L. A.; WHITMAN, J. D.; MAGUIRE, J. H. Chagas Disease in the United States: a Public Health Approach. **Clin Microbiol Rev**, 33, n. 1, Dec 18 2019.
- BONNEY, K. M.; ENGMAN, D. M. Autoimmune pathogenesis of Chagas heart disease: looking back, looking ahead. **Am J Pathol**, 185, n. 6, p. 1537-1547, Jun 2015.
- BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annu Rev Microbiol**, 27, p. 347-382, 1973.
- BRYAN, M. A.; GUYACH, S. E.; NORRIS, K. A. J. P. n. t. d. Specific humoral immunity versus polyclonal B cell activation in *Trypanosoma cruzi* infection of susceptible and resistant mice. 4, n. 7, p. e733, 2010.
- CARDILLO, F.; CUNHA, F. Q.; TAMASHIRO, W. M.; RUSSO, M. *et al.* NK1.1+ cells and T-cell activation in euthymic and thymectomized C57Bl/6 mice during acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Scand J Immunol**, 55, n. 1, p. 96-104, Jan 2002.
- CARDOSO, M. S.; REIS-CUNHA, J. L.; BARTHOLOMEU, D. C. Evasion of the Immune Response by *Trypanosoma cruzi* during Acute Infection. **Front Immunol**, 6, p. 659, 2015.
- CARRILLO, I.; RABELO, R. A. N.; BARBOSA, C.; RATES, M. *et al.* Aspirin-triggered resolvins D1 reduces parasitic cardiac load by decreasing inflammation in a murine model of early chronic Chagas disease. **PLoS Negl Trop Dis**, 15, n. 11, p. e0009978, Nov 2021.
- CARVALHO, W. A.; CARVALHO, R. D.; RIOS-SANTOS, F. [Specific cyclooxygenase-2 inhibitor analgesics: therapeutic advances.]. **Rev Bras Anesthesiol**, 54, n. 3, p. 448-464, Jun 2004.
- CESTARI, I.; ANSA-ADDO, E.; DEOLINDO, P.; INAL, J. M. *et al.* *Trypanosoma cruzi* immune evasion mediated by host cell-derived microvesicles. **J Immunol**, 188, n. 4, p. 1942-1952, Feb 15 2012.
- CHAGAS-LIMA, A. C.; PEREIRA, M. G.; FAMPA, P.; LIMA, M. S. *et al.* Bioactive lipids regulate *Trypanosoma cruzi* development. **Parasitol Res**, 118, n. 9, p. 2609-2619, Sep 2019.
- CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K. L.; EVANSON, N. K. *et al.* COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 99, n. 21, p. 13926-13931, Oct 15 2002.
- CHAPUT, N.; THÉRY, C. Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. **Semin Immunopathol**, 33, n. 5, p. 419-440, Sep 2011.

- COLASANTI, M.; GRADONI, L.; MATTU, M.; PERSICHINI, T. *et al.* Molecular bases for the anti-parasitic effect of NO (Review). **Int J Mol Med**, 9, n. 2, p. 131-134, Feb 2002.
- COLASANTI, M.; PERSICHINI, T.; MENEGAZZI, M.; MARIOTTO, S. *et al.* Induction of nitric oxide synthase mRNA expression. Suppression by exogenous nitric oxide. **J Biol Chem**, 270, n. 45, p. 26731-26733, Nov 10 1995.
- CRONEMBERGER-ANDRADE, A.; XANDER, P.; SOARES, R. P.; PESSOA, N. L. *et al.* Trypanosoma cruzi-Infected Human Macrophages Shed Proinflammatory Extracellular Vesicles That Enhance Host-Cell Invasion via Toll-Like Receptor 2. **Front Cell Infect Microbiol**, 10, p. 99, 2020.
- CRUVINEL, W. d. M.; MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T. *et al.* Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. 50, n. 4, p. 434-447, 2010.
- CRYER, B.; DUBOIS, A. The advent of highly selective inhibitors of cyclooxygenase--a review. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, 56, n. 5-6, p. 341-361, Aug 1998.
- D'AVILA, H.; TOLEDO, D. A.; MELO, R. C. Lipid bodies: inflammatory organelles implicated in host-Trypanosoma cruzi interplay during innate immune responses. **Mediators Inflamm**, 2012, p. 478601, 2012.
- D'AVILA, H.; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; ROQUE, N. R.; TEIXEIRA, L. *et al.* Host cell lipid bodies triggered by Trypanosoma cruzi infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with prostaglandin E2 generation and increased parasite growth. 204, n. 6, p. 951-961, 2011.
- DE PABLOS TORRÓ, L. M.; RETANA MOREIRA, L.; OSUNA, A. Extracellular Vesicles in Chagas Disease: A New Passenger for an Old Disease. 9, 2018-June-01 2018. Review.
- DE SOUZA, W. Cell biology of Trypanosoma cruzi. **Int Rev Cytol**, 86, p. 197-283, 1984.
- DE SOUZA, W. J. T. c. e. D. d. C. R. d. J. E. G. K. O parasito e sua interação com os hospedeiros. p. 88-126, 2000.
- DEOLINDO, P.; EVANS-OSES, I.; RAMIREZ, M. I. Microvesicles and exosomes as vehicles between protozoan and host cell communication. **Biochem Soc Trans**, 41, n. 1, p. 252-257, Feb 1 2013.
- DI NOIA, J. M.; BUSCAGLIA, C. A.; DE MARCHI, C. R.; ALMEIDA, I. C. *et al.* A Trypanosoma cruzi small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. **J Exp Med**, 195, n. 4, p. 401-413, Feb 18 2002.
- DIAS, J. C. P.; RAMOS, A. N.; GONTIJO, E. D.; LUQUETTI, A. *et al.* 2 nd Brazilian consensus on chagas disease, 2015. 49, p. 03-60, 2016.
- DINARELLO, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, 87, n. 6, p. 2095-2147, Mar 15 1996.

- DOS SANTOS, F. d. S.; DA SILVA RAMOS, K.; BRUM, G. G. G.; GAIA, I. A. *et al.* Doença de chagas e sua transmissão pelo açaí: Uma revisão bibliográfica. 2, n. 3, p. 2128-2144, 2019.
- DUTRA, W. O.; MENEZES, C. A.; MAGALHÃES, L. M.; GOLLOB, K. J. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. **Parasite Immunol**, 36, n. 8, p. 377-387, Aug 2014.
- DVORAK, J. A.; HYDE, T. P. Trypanosoma cruzi: interaction with vertebrate cells in vitro. 1. Individual interactions at the cellular and subcellular levels. **Exp Parasitol**, 34, n. 2, p. 268-283, Oct 1973.
- GASPARRINI, M.; FORBES-HERNANDEZ, T. Y.; GIAMPIERI, F.; AFRIN, S. *et al.* Anti-inflammatory effect of strawberry extract against LPS-induced stress in RAW 264.7 macrophages. 102, p. 1-10, 2017.
- GIRI, P. K.; SCHOREY, J. S. Exosomes derived from M. Bovis BCG infected macrophages activate antigen-specific CD4+ and CD8+ T cells in vitro and in vivo. **PLoS One**, 3, n. 6, p. e2461, Jun 18 2008.
- GONÇALVES, C. S.; ÁVILA, A. R.; DE SOUZA, W.; MOTTA, M. C. M. *et al.* Revisiting the Trypanosoma cruzi metacyclogenesis: morphological and ultrastructural analyses during cell differentiation. **Parasit Vectors**, 11, n. 1, p. 83, Feb 6 2018.
- GONÇALVES, M. F.; UMEZAWA, E. S.; KATZIN, A. M.; DE SOUZA, W. *et al.* Trypanosoma cruzi: shedding of surface antigens as membrane vesicles. **Exp Parasitol**, 72, n. 1, p. 43-53, Jan 1991.
- GORLA, D.; NOIREAU, F. Geographic distribution of Triatominae vectors in America. *In: American Trypanosomiasis Chagas Disease*: Elsevier, 2017. p. 197-221.
- GUARNER, J. Chagas disease as example of a reemerging parasite. **Semin Diagn Pathol**, 36, n. 3, p. 164-169, May 2019.
- GUERRERO, N. A.; CAMACHO, M.; VILA, L.; ÍÑIGUEZ, M. A. *et al.* 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**, 9, n. 8, p. e0004025, 2015.
- HALLIWELL, B. J. F. r. i. b.; MEDICINE. Free radicals," reactive species" and toxicology. p. 544-616, 1999.
- HAMILTON, P. B.; TEIXEIRA, M. M.; STEVENS, J. R. The evolution of Trypanosoma cruzi: the 'bat seeding' hypothesis. **Trends Parasitol**, 28, n. 4, p. 136-141, Apr 2012.
- HASSANPOUR, M.; REZAIE, J.; NOURI, M.; PANAHI, Y. The role of extracellular vesicles in COVID-19 virus infection. **Infect Genet Evol**, 85, p. 104422, Nov 2020.
- HEMMIGE, V.; TANOWITZ, H.; SETHI, A. Trypanosoma cruzi infection: a review with emphasis on cutaneous manifestations. **Int J Dermatol**, 51, n. 5, p. 501-508, May 2012.
- HIDEKO TATAKIHARA, V. L.; CECCHINI, R.; BORGES, C. L.; MALVEZI, A. D. *et al.* Effects of cyclooxygenase inhibitors on parasite burden, anemia and oxidative stress in murine Trypanosoma cruzi infection. **FEMS Immunol Med Microbiol**, 52, n. 1, p. 47-58, Jan 2008.

- HINZ, B.; BRUNE, K. Cyclooxygenase-2--10 years later. **J Pharmacol Exp Ther**, 300, n. 2, p. 367-375, Feb 2002.
- JANSEN, A. M.; XAVIER, S.; ROQUE, A. L. R. Landmarks of the Knowledge and Trypanosoma cruzi Biology in the Wild Environment. **Front Cell Infect Microbiol**, 10, p. 10, 2020.
- JOUZEAU, J.-Y.; TERLAIN, B.; ABID, A.; NÉDÉLEC, E. *et al.* Cyclo-oxygenase isoenzymes. 53, n. 4, p. 563-582, 1997.
- JUNQUEIRA, C.; CAETANO, B.; BARTHOLOMEU, D. C.; MELO, M. B. *et al.* The endless race between Trypanosoma cruzi and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert Rev Mol Med**, 12, p. e29, Sep 15 2010.
- KAHN, S. J.; WLEKLINSKI, M.; EZEKOWITZ, R. A.; CODER, D. *et al.* The major surface glycoprotein of Trypanosoma cruzi amastigotes are ligands of the human serum mannose-binding protein. **Infect Immun**, 64, n. 7, p. 2649-2656, Jul 1996.
- KIERSZENBAUM, F.; WIRTH, J. J.; MCCANN, P. P.; SJOERDSMA, A. J. I. *et al.* Impairment of macrophage function by inhibitors of ornithine decarboxylase activity. 55, n. 10, p. 2461-2464, 1987.
- KIM, G. D.; LEE, S. E.; YANG, H.; PARK, H. R. *et al.* β 2 integrins (CD11/18) are essential for the chemosensory adhesion and migration of polymorphonuclear leukocytes on bacterial cellulose. **J Biomed Mater Res A**, 103, n. 5, p. 1809-1817, May 2015.
- KRETTLI, A. U.; BRENER, Z. Protective effects of specific antibodies in Trypanosoma cruzi infections. **J Immunol**, 116, n. 3, p. 755-760, Mar 1976.
- KUBO, H. Extracellular Vesicles in Lung Disease. **Chest**, 153, n. 1, p. 210-216, Jan 2018.
- 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**, 98, n. 3, p. 299-304, Apr 2003.
- LIDANI, K. C. F.; ANDRADE, F. A.; BAVIA, L.; DAMASCENO, F. S. *et al.* Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. **Front Public Health**, 7, p. 166, 2019.
- LOPES, R. O. M. Aspirina: aspectos culturais, históricos e científicos. 2011.
- LOPEZ, M.; TANOWITZ, H. B.; GARG, N. J. Pathogenesis of Chronic Chagas Disease: Macrophages, Mitochondria, and Oxidative Stress. **Curr Clin Microbiol Rep**, 5, n. 1, p. 45-54, Mar 2018.
- LOVO-MARTINS, M. I.; MALVEZI, A. D.; ZANLUQUI, N. G.; LUCCHETTI, B. F. C. *et al.* Extracellular Vesicles Shed By Trypanosoma cruzi Potentiate Infection and Elicit Lipid Body Formation and PGE(2) Production in Murine Macrophages. **Front Immunol**, 9, p. 896, 2018.
- MACEDO, A. M.; MACHADO, C. R.; OLIVEIRA, R. P.; PENA, S. D. Trypanosoma cruzi: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 99, n. 1, p. 1-12, Feb 2004.

- MACHADO, F. S.; DUTRA, W. O.; ESPER, L.; GOLLOB, K. J. *et al.* Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. **Semin Immunopathol**, 34, n. 6, p. 753-770, Nov 2012.
- MACHADO, F. S.; DUTRA, W. O.; ESPER, L.; GOLLOB, K. J. *et al.*, 2012, **Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease**. Springer. 753-770.
- MACHADO, F. S.; MUKHERJEE, S.; WEISS, L. M.; TANOWITZ, H. B. *et al.* Bioactive lipids in *Trypanosoma cruzi* infection. **Adv Parasitol**, 76, p. 1-31, 2011.
- MALDONADO, V. B. **Efeitos microscópicos do ácido acetilsalicílico (aspirina) e do acetaminofeno (tylenol) na movimentação dentária induzida e nas reabsorções radiculares associadas**. 2009. -, Universidade de São Paulo.
- MALVEZI, A. D.; DA SILVA, R. V.; PANIS, C.; YAMAUCHI, L. M. *et al.* Aspirin modulates innate inflammatory response and inhibits the entry of *Trypanosoma cruzi* in mouse peritoneal macrophages. 2014, p. 580919, 2014.
- MALVEZI, A. D.; DA SILVA, R. V.; PANIS, C.; YAMAUCHI, L. M. *et al.* Aspirin modulates innate inflammatory response and inhibits the entry of *Trypanosoma cruzi* in mouse peritoneal macrophages. **Mediators Inflamm**, 2014, p. 580919, 2014.
- MALVEZI, A. D.; PANIS, C.; DA SILVA, R. V.; DE FREITAS, R. C. *et al.* Inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 impairs *Trypanosoma cruzi* entry into cardiac cells and promotes differential modulation of the inflammatory response. **Antimicrob Agents Chemother**, 58, n. 10, p. 6157-6164, Oct 2014.
- MARCILLA, A.; MARTIN-JAULAR, L.; TRELIS, M.; DE MENEZES-NETO, A. *et al.* Extracellular vesicles in parasitic diseases. **J Extracell Vesicles**, 3, p. 25040, 2014.
- MARIN-NETO, J. A.; CUNHA-NETO, E.; MACIEL, B. C.; SIMÕES, M. V. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, 115, n. 9, p. 1109-1123, Mar 6 2007.
- MARTINS-MELO, F. R.; CARNEIRO, M.; RAMOS, A. N., Jr.; HEUKELBACH, J. *et al.* The burden of Neglected Tropical Diseases in Brazil, 1990-2016: A subnational analysis from the Global Burden of Disease Study 2016. **PLoS Negl Trop Dis**, 12, n. 6, p. e0006559, Jun 2018.
- MARTINS-MELO, F. R.; CASTRO, M. C.; WERNECK, G. L. J. A. T. Levels and trends in Chagas disease-related mortality in Brazil, 2000–2019. 220, p. 105948, 2021.
- MELO, R. F. P.; GUARNERI, A. A.; SILBER, A. M. The Influence of Environmental Cues on the Development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae Vector. **Front Cell Infect Microbiol**, 10, p. 27, 2020.
- MONTEÓN, V. M.; FURUZAWA-CARBALLEDA, J.; ALEJANDRE-AGUILAR, R.; ARANDA-FRAUSTRO, A. *et al.* American trypanosomiasis: in situ and generalized features of parasitism and inflammation kinetics in a murine model. **Exp Parasitol**, 83, n. 3, p. 267-274, Aug 1996.
- MORAES, K.; DINIZ, L. F.; BAHIA, M. T. J. M. d. I. O. C. Role of cyclooxygenase-2 in *Trypanosoma cruzi* survival in the early stages of parasite host-cell interaction. 110, p. 181-191, 2015.

- MORETTI, N. S.; MORTARA, R. A.; SCHENKMAN, S. *Trypanosoma cruzi*. **Trends Parasitol**, 36, n. 4, p. 404-405, Apr 2020.
- NARABA, H.; MURAKAMI, M.; MATSUMOTO, H.; SHIMBARA, S. *et al.* Segregated coupling of phospholipases A2, cyclooxygenases, and terminal prostanoid synthases in different phases of prostanoid biosynthesis in rat peritoneal macrophages. **J Immunol**, 160, n. 6, p. 2974-2982, Mar 15 1998.
- NOGUEIRA, P. M.; RIBEIRO, K.; SILVEIRA, A. C.; CAMPOS, J. H. *et al.* Vesicles from different *Trypanosoma cruzi* strains trigger differential innate and chronic immune responses. **Journal of extracellular vesicles**, 4, n. 1, p. 28734, 2015.
- NOVERR, M. C.; ERB-DOWNWARD, J. R.; HUFFNAGLE, G. B. Production of eicosanoids and other oxylipins by pathogenic eukaryotic microbes. **Clin Microbiol Rev**, 16, n. 3, p. 517-533, Jul 2003.
- PAIVA, C. N.; FEIJÓ, D. F.; DUTRA, F. F.; CARNEIRO, V. C. *et al.* Oxidative stress fuels *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **J Clin Invest**, 122, n. 7, p. 2531-2542, Jul 2012.
- PEREIRA, R. S.; MALVEZI, A. D.; LOVO-MARTINS, M. I.; LUCCHETTI, B. F. C. *et al.* Combination Therapy Using Benznidazole and Aspirin during the Acute Phase of Experimental Chagas Disease Prevents Cardiovascular Dysfunction and Decreases Typical Cardiac Lesions in the Chronic Phase. **Antimicrob Agents Chemother**, 64, n. 7, Jun 23 2020.
- 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**, 193, n. 1, p. 90-98, Apr 10 1999.
- PINGE-FILHO, P. J. M. h. Can extracellular vesicles produced during infection by *Trypanosoma cruzi* function as damage-associated molecular patterns in the host? 155, p. 110667, 2021.
- PINHEIRO, R. O.; NUNES, M. P.; PINHEIRO, C. S.; D'AVILA, H. *et al.* Induction of autophagy correlates with increased parasite load of *Leishmania amazonensis* in BALB/c but not C57BL/6 macrophages. **Microbes Infect**, 11, n. 2, p. 181-190, Feb 2009.
- RAELE, R. A. **Avaliação da citotoxicidade de quantum dots, in vitro, em células RAW 264.7**. 2013. -, Universidade Federal de Pernambuco.
- RAMIREZ, M. I.; DEOLINDO, P.; DE MESSIAS-REASON, I. J.; ARIGI, E. A. *et al.* Dynamic flux of microvesicles modulate parasite-host cell interaction of *Trypanosoma cruzi* in eukaryotic cells. **Cell Microbiol**, 19, n. 4, Apr 2017.
- RANG, H.; DALE, M.; RITTER, J.; FLOWER, R. J. R. *et al.* Fármacos antiinflamatórios e imunossupressores. 2007.
- RANGEL MORENO, J.; ESTRADA GARCIA, I.; DE LA LUZ GARCIA HERNANDEZ, M.; AGUILAR LEON, D. *et al.* The role of prostaglandin E2 in the immunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis. **Immunology**, 106, n. 2, p. 257-266, Jun 2002.

- RAPOSO, G.; NIJMAN, H. W.; STOORVOGEL, W.; LIEJENDEKKER, R. *et al.* B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. **J Exp Med**, 183, n. 3, p. 1161-1172, Mar 1 1996.
- RAPOSO, G.; STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. **J Cell Biol**, 200, n. 4, p. 373-383, Feb 18 2013.
- RASCHKE, W. C.; BAIRD, S.; RALPH, P.; NAKOINZ, I. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. **Cell**, 15, n. 1, p. 261-267, Sep 1978.
- RASSI, A., Jr.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infect Dis Clin North Am**, 26, n. 2, p. 275-291, Jun 2012.
- RASSI, A., Jr.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, 375, n. 9723, p. 1388-1402, Apr 17 2010.
- RETANA MOREIRA, L.; RODRÍGUEZ SERRANO, F.; OSUNA, A. J. P. N. T. D. Extracellular vesicles of *Trypanosoma cruzi* tissue-culture cell-derived trypomastigotes: induction of physiological changes in non-parasitized culture cells. 13, n. 2, p. e0007163, 2019.
- ROBBINS, P. D.; MORELLI, A. E. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. **Nat Rev Immunol**, 14, n. 3, p. 195-208, Mar 2014.
- RODRIGUES, M. M.; OLIVEIRA, A. C.; BELLIO, M. The Immune Response to *Trypanosoma cruzi*: Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development. **J Parasitol Res**, 2012, p. 507874, 2012.
- SAGINI, K.; COSTANZI, E.; EMILIANI, C.; BURATTA, S. *et al.* Extracellular Vesicles as Conveyors of Membrane-Derived Bioactive Lipids in Immune System. **Int J Mol Sci**, 19, n. 4, Apr 18 2018.
- SANGENIS, L. H.; NIELEBOCK, M. A.; SANTOS, C. D.; SILVA, M. C. *et al.* Chagas disease transmission by consumption of game meat: systematic review. **Rev Bras Epidemiol**, 19, n. 4, p. 803-811, Oct-Dec 2016.
- SANTOS, C. F.; SILVA, M. E.; SILVA, M. E.; SILVA, M. E. *et al.* Effect of an essential fatty acid deficient diet on experimental infection with *Trypanosoma cruzi* in germfree and conventional mice. **Braz J Med Biol Res**, 25, n. 8, p. 795-803, 1992.
- SCHOREY, J. S.; HARDING, C. V. Extracellular vesicles and infectious diseases: new complexity to an old story. **J Clin Invest**, 126, n. 4, p. 1181-1189, Apr 1 2016.
- SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A. P.; RÔÇAS, G.; COTTA, R. M. *et al.* [Chagas's disease and deep ecology: the anti-vectorial fight in question]. **Cien Saude Colet**, 16, n. 2, p. 677-687, Feb 2011.
- SMITH, W. L. Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. **Am J Physiol**, 263, n. 2 Pt 2, p. F181-191, Aug 1992.
- SMITH, W. L.; MARNETT, L. J.; DEWITT, D. L. Prostaglandin and thromboxane biosynthesis. **Pharmacol Ther**, 49, n. 3, p. 153-179, 1991.
- SREEKUMAR, P. G.; KANNAN, R.; KITAMURA, M.; SPEE, C. *et al.* α B crystallin is apically secreted within exosomes by polarized human retinal pigment epithelium and provides neuroprotection to adjacent cells. **PLoS One**, 5, n. 10, p. e12578, Oct 8 2010.

STANAWAY, J. D.; ROTH, G. The burden of Chagas disease: estimates and challenges. **Glob Heart**, 10, n. 3, p. 139-144, Sep 2015.

STERIN-BORDA, L.; GORELIK, G.; GOREN, N.; CAPPAS, S. G. *et al.* Lymphocyte Muscarinic Cholinergic Activity and PGE2 Involvement in Experimental Trypanosoma cruzi Infection. **Clinical immunology and immunopathology**, 81, n. 2, p. 122-128, 1996.

STEVERDING, D. The history of Chagas disease. **Parasit Vectors**, 7, p. 317, Jul 10 2014.

TAKAHASHI, Y.; ZHU, H.; YOSHIMOTO, T. Essential roles of lipoxygenases in LDL oxidation and development of atherosclerosis. **Antioxid Redox Signal**, 7, n. 3-4, p. 425-431, Mar-Apr 2005.

TANOWITZ, H. B.; MACHADO, F. S.; SPRAY, D. C.; FRIEDMAN, J. M. *et al.* Developments in the management of Chagas cardiomyopathy. **Expert Rev Cardiovasc Ther**, 13, n. 12, p. 1393-1409, Dec 2015.

TORRECILHAS, A. C.; SCHUMACHER, R. I.; ALVES, M. J.; COLLI, W. Vesicles as carriers of virulence factors in parasitic protozoan diseases. **Microbes Infect**, 14, n. 15, p. 1465-1474, Dec 2012.

TRINDADE, J. D. S.; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; CÔRTE-REAL, S.; DECOTE-RICARDO, D. *et al.* Drug repurposing for Chagas disease: In vitro assessment of nimesulide against Trypanosoma cruzi and insights on its mechanisms of action. **PLoS One**, 16, n. 10, p. e0258292, 2021.

TROCOLI TORRECILHAS, A. C.; TONELLI, R. R.; PAVANELLI, W. R.; DA SILVA, J. S. *et al.* Trypanosoma cruzi: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. **Microbes Infect**, 11, n. 1, p. 29-39, Jan 2009.

TRUYENS, C.; ANGELO-BARRIOS, A.; TORRICO, F.; VAN DAMME, J. *et al.* 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**, 62, n. 2, p. 692-696, Feb 1994.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of Trypanosoma cruzi revisited. **Int J Parasitol**, 31, n. 5-6, p. 472-481, May 1 2001.

VALADI, H.; EKSTRÖM, K.; BOSSIOS, A.; SJÖSTRAND, M. *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nat Cell Biol**, 9, n. 6, p. 654-659, Jun 2007.

VAN NIEL, G.; D'ANGELO, G.; RAPOSO, G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 19, n. 4, p. 213-228, Apr 2018.

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**, 62, n. 11, p. 5177-5182, Nov 1994.

WALKER, J. D.; MAIER, C. L.; POBER, J. S. Cytomegalovirus-infected human endothelial cells can stimulate allogeneic CD4+ memory T cells by releasing antigenic exosomes. **J Immunol**, 182, n. 3, p. 1548-1559, Feb 1 2009.

WHO, W. H. O. Chagas disease (also known as American trypanosomiasis). 2022.

WU, Z.; WANG, L.; LI, J.; WANG, L. *et al.* Extracellular Vesicle-Mediated Communication Within Host-Parasite Interactions. **Front Immunol**, 9, p. 3066, 2018.

YOSHIDA, N.; MORTARA, R. A.; ARAGUTH, M. F.; GONZALEZ, J. C. *et al.* Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. **Infect Immun**, 57, n. 6, p. 1663-1667, Jun 1989.

ZENG, Y. P.; YANG, C.; LI, Y.; FAN, Y. *et al.* Aspirin inhibits osteoclastogenesis by suppressing the activation of NF- κ B and MAPKs in RANKL-induced RAW264.7 cells. **Mol Med Rep**, 14, n. 3, p. 1957-1962, Sep 2016.

ZHAN, R.; XIA, L.; SHAO, J.; WANG, C. *et al.* Polysaccharide isolated from Chinese jujube fruit (*Zizyphus jujuba* cv. Junzao) exerts anti-inflammatory effects through MAPK signaling. 40, p. 461-470, 2018.

ANEXO

Este trabalho foi realizado na Universidade Estadual de Londrina e gerou um artigo intitulado “ ***Beneficial effects of aspirin on the actions of extracellular vesicles shed by Trypanosoma cruzi***”.

Research Article

Beneficial Effects Of Aspirin On The Actions Of Extracellular Vesicles Shed By *Trypanosoma cruzi* In Macrophages

Lucas Felipe dos Santos^{a,b#}, Gabriella Ferreira Rodrigues^{a#}, Aparecida Donizette Malvezi^a, Mariana de Souza^a, Raquel Pires Nakama^a, Maria Isabel Lovo-Martins^a, Phileno Pinge-Filho^{a,b*}

^a Laboratory of Experimental Immunopathology, Department of Pathological Sciences, State University of Londrina, Londrina, Brazil.

^b Postgraduate Program of Microbiology, Department of Microbiology, UEL, Londrina, Paraná, Brazil.

Contributed equally

Corresponding author at: Celso Garcia Cid Highway, PR-445, Km 380, Londrina, PR, 86057-970. Laboratory of Experimental Immunopathology, Department of Pathological Sciences, State University of Londrina, Londrina, Brazil.

E-mail address: pingefilho@uel.br

Abstract

Trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease, shed extracellular vesicles (EVs) that promote the susceptibility of host cells to infection. During *T. cruzi* infection, the immune response of the host is important for controlling parasitism, which is necessary for survival. Macrophages produce inflammatory mediators, such as eicosanoids and nitric oxide (NO), with trypanocidal effects that control the parasite load in the early stages of the disease. In this study, we evaluated the contribution of host cyclooxygenase (COX) to the actions of EVs shed by *T. cruzi* strain Y (EVs-Y) in infected macrophages. RAW 264.7 macrophages exposed to EVs-Y and then infected with trypomastigote forms of *T. cruzi* produced less NO, and an increased number of trypomastigote forms were internalized in the cell compared to the controls, indicating that the effects exerted by EVs-Y favor the parasite. Interestingly, when macrophages were pretreated with aspirin, a dual COX inhibitor, before exposure to EVs-Y and subsequent infection with trypomastigote forms, there was an increase in NO production and a decrease in trypomastigote uptake compared to the controls. These results suggest that EVs-Y modulates the macrophage response in favor of *T. cruzi* and indicate a role for COX in the effects of EVs.

Keywords: Chagas disease; Extracellular vesicles, Cyclooxygenase, Cellular Invasion, RAW264.7 Cells, Nitric oxide

1. Introduction

The protozoan *Trypanosoma cruzi* is the etiologic agent of Chagas disease (CD), a neglected tropical disease affecting approximately 7 million people worldwide [1]. The incidence is higher in Latin America owing to the presence of the insect vector responsible for its dissemination. However, the disease occurs in other regions through immigration, blood transfusion, organ donation, ingestion of contaminated food, etc. [2].

During infection, the host immune response is important for controlling parasitism. Macrophages produce several inflammatory mediators, such as eicosanoids [3], chemokines, and cytokines, that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity [4] to control parasite load and infection [5-8]. However, the parasite has escape mechanisms, such as the release of extracellular vesicles (EVs), that promote parasite infectivity and modulate the host innate and acquired immune responses [9-14]. Interestingly, all extracellular forms of *T. cruzi* release EVs containing major surface molecules [11].

We previously demonstrated that EVs shed by *T. cruzi* Y strain (EVs-Y) potentiate infection by modulating the host response in favor of the parasite; induce lipid body formation and prostaglandin E₂ (PGE₂) production by bone marrow-derived macrophages, even in the absence of *T. cruzi*; and decrease production of PGE₂ in *T. cruzi*-infected macrophages [9].

Aspirin is a non-steroidal anti-inflammatory agent that blocks the cyclooxygenase (COX) enzymes that convert arachidonic acid into eicosanoid. Our group characterized COX modulation as a potential target for Chagas chemotherapy, as the COX pathway plays a fundamental role in *T. cruzi* invasion [5, 15]. By inhibiting COX, aspirin modulates the progression of acute and chronic CD [6, 16].

In this study, the contribution of host COX activity to the effects of EVs shed by *T. cruzi* on infected-RAW264.7 murine macrophages was investigated. We concluded that EVs shed by

T. cruzi modulate the macrophage response in favor of the parasite and reveal a role for COX in the effects of EVs on the innate immune response.

2. Materials and methods

2.1 Parasite and cells

Trypanosoma cruzi strain Y, belonging to the *T. cruzi* I (TcI) lineage [17], was maintained by weekly intraperitoneal inoculation of blood trypomastigote forms into Swiss mice. The protocol was approved by the Internal Scientific Commission and the Ethics in Animal Experimentation Committee of Londrina State University (approval number: CEUA n° 002.2021) and was conducted in accordance with the guidelines of the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA). Vero E6 cells (ATCC# 1008) were maintained in Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) medium supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS), 2 mM l-glutamine, 10 mM HEPES, 100 UI/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (all from Gibco, Grand Island, NY, USA) at 37°C in 5% CO₂. Blood trypomastigotes obtained from Swiss mice at 10–12 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 cells and infection of murine RAW264.7 macrophages. All experiments with *T. cruzi* were conducted in a biosafety level 2 laboratory in accordance with the regulations of the Biosafety Commission of the State University of Londrina.

2.2 Isolation of *T. cruzi* Trypomastigote EVs (EVs-Y)

To obtain EVs from *T. cruzi* Y strain, we followed the procedure described by Lovo-Martins et al. (2018) [9]. Briefly, trypomastigotes accumulated in the supernatant of infected Vero E6 cells were collected, washed three times with RPMI medium (2,600 × g, 10 min), and incubated for 2 h at 37°C in RPMI (1 × 10⁸/mL) without FBS to promote spontaneous EV-Y

release. Parasites were removed by centrifugation at $2,600 \times g$ for 10 min, and EV-containing supernatants were filtered through a 0.45- μm sterile membrane. EVs were purified using total exosome isolation from cell culture media reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The EV-Y pellet was suspended in phosphate-buffered saline (PBS).

2.3 Nanoparticle tracking analysis to measure EV size, distribution, and concentration

The size, distribution, and concentration of EVs-Y (EVs from the Y strain of *T. cruzi*) were measured using a NanoSight LM10 instrument (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK). The data were analyzed using nanoparticle tracking analysis (NTA) software (version 3.1) with default settings according to the manufacturer's protocol. The EV preparation was sampled twice to generate two independent dilutions and reduce the number of particles in the field of view to less than 200 detected tracks per image. For each sample, five videos (30 s each) were analyzed. All samples were measured using the same detection threshold.

2.4 Cell culture, treatments, and infection with T. cruzi

RAW 264.7 cells were cultured in DMEM/F-12 medium containing 10% FBS, 2 mM l-glutamine, 10 mM HEPES, 100 UI/mL penicillin, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin (all from Gibco, Grand Island, NY, USA) at 37°C in 5% CO₂. Aspirin (Sigma, St. Louis, MO, USA) was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma) to generate a stock solution. To study the contribution of host COX to the actions of EVs-Y, the cells were incubated with aspirin (0.625, 1.25, and 2.5 mM) for 1 h, and then washed with sterile PBS, and subsequently exposed to EVs-Y (released from 1×10^7 parasites). RAW264.7 cells were then incubated with EVs-Y for 24 h. The final concentration of DMSO in the vehicle group was 0.05%, which was equivalent to that in cells treated with the highest dose (2.5 mM) of aspirin. The control group was treated with medium only. RAW 264.7 cells ($2 \times 10^5/\text{cm}^2$) were infected with Y trypomastigotes at a

1:5 cell:parasite ratio. Trypomastigotes were allowed to infect cells for 18 h. Then, the cells were washed twice with sterile PBS (pH 7.4) to remove extracellular trypomastigotes. To evaluate the effect of additional stimulus, after infection, the cells were treated or not with 0.5 ng/mL of recombinant IFN- γ . The attached uninfected cells were treated with 0.1 μ g/mL LPS (*Escherichia coli*, 026:B6, Sigma) with or without aspirin at a final volume of 200 μ L/well. The cultured cells and supernatants were collected to measure the following parameters after treatment (Fig. 1).

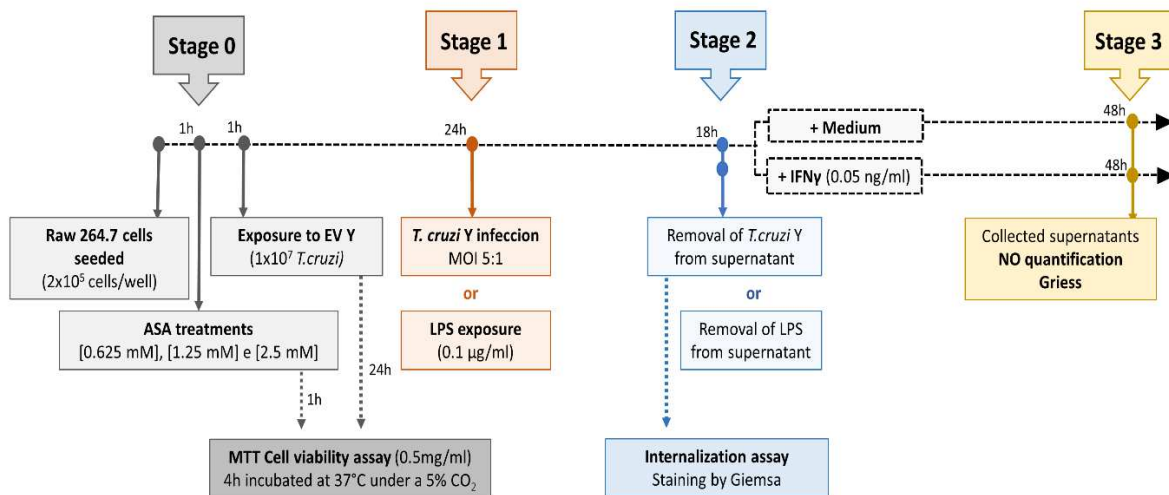


Fig. 1. Study flow diagram. Stage 0: Raw 264.7 macrophages were seeded at 2×10^5 cells per well for 1h until complete adherence. Stage 1: After adhesion, cells were treated with aspirin at different concentrations for 1 h. The wells were washed to remove all aspirin. Stage 2: Raw 264.7 cells were exposed to extracellular vesicles of *T. cruzi* and incubated for 24h. Cellular cytotoxicity in cells treated with aspirin or EVs-Y was evaluated by the MTT assay. Stage 3: The cells were infected with trypomastigote culture forms at a final concentration of 1×10^6 parasites per well (MOI 5:1) for 18h or stimulated with 0.1 μ g/ml LPS as a cell activation control, also for 18h. In this moment, some cells were stained with Giemsa for quantification of internalized trypomastigotes. Stage 4: After removing the non-internalized trypomastigotes,

the cells were separated into two groups. The first was cultured with DMEM and the second with DMEM + 0.05ng/ml IFN- γ for macrophage activation. After 48h, the supernatant was collected and NO was quantified by the Griess assay. All incubations were carried out in an atmosphere of 5% CO₂ at 37°C.

2.5. Cell viability

The cytotoxicity of aspirin and EVs-Y in cultured cells was determined by the MTT assay (as the reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide [MTT reagent] to formazan salt). After treatment, the supernatant was removed from cells cultured in a 24-well plate, and MTT reagent (0.03 mg/mL) was added to each well. The cells were incubated at 37°C for 4 h, and the formazan salts were dissolved in 100% DMSO. The absorbance was measured at 550 nm using a Synergy HT microplate reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA).

2.6. Cell invasion assays

Invasion assays were performed as previously described [5, 18, 19]. Briefly, the internalization index was calculated by multiplying the percentage of infected cells by the mean number of parasites per infected cell. All internalization indices were normalized to that of untreated RAW 264.7 cells. Experiments were performed in triplicate under blinded conditions, and three independent experiments were performed. All experiments included untreated infected cells as controls. Quantification was performed using light microscopy, and 500 randomly selected cells were counted.

2.7. Nitric oxide measurement

RAW cells (2×10^5) that were previously treated with different concentrations of aspirin for 1 h, exposed to EVs-Y for 24 h and/or infected with 1×10^6 trypomastigotes (Y strain) were cultured in 24-well plates. In some experiments, uninfected and infected cells were treated with

IFN- γ (0.5 ng/mL) or LPS (0.1 μ g/mL). After 48 h of treatment, nitric oxide (NO) levels in the culture supernatant were measured. NO synthesis was evaluated indirectly by measuring the nitrite content in supernatants from *T. cruzi*-infected RAW 264.7 cultures in the presence or absence of EVs-Y or aspirin 17 [19]. Culture supernatants (50 μ L) were mixed with 100 μ L of Griess reagent; at 10 min after mixing, the nitrite concentration in the culture supernatant was measured as the absorbance at 550 nm. The nitrite concentration was determined based on a standard curve using NaNO₂.

2.8. Statistical analysis

Statistical analysis was conducted using analysis of variance (ANOVA) with Tukey's post-hoc test. Values are presented as the mean \pm standard error of the mean. Differences were considered significant when $p \leq 0.05$. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1 Characterization of extracellular vesicles released by cultured trypomastigotes from *T. cruzi* Y strain (EVs-Y)

NTA analysis of extracellular vesicles spontaneously released by cultured trypomastigote forms of *T. cruzi* strain Y showed a population of vesicles ranging from 50 nm to 250 nm. The mean size of the EVs-Y was 126 nm (mode, was 95 nm; Fig. 2), confirming that the EV-Y solution contained a heterogeneous mixture of extracellular vesicles including exosomes and microvesicles (Fig. 2) [20-22].

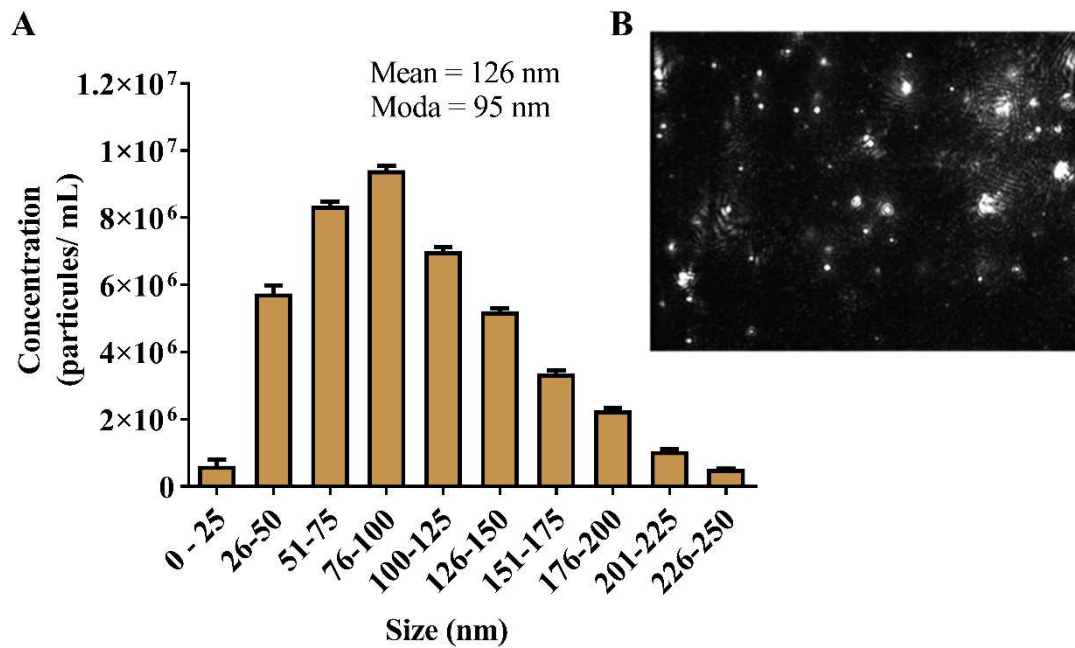


Fig. 2. Nanoparticle tracking analysis of the extracellular vesicles isolated from *Trypanosoma cruzi* Y. The concentration (particles/mL) and size distribution (nm) of extracellular vesicles spontaneously shed by tissue culture-derived trypomastigote forms of *T. cruzi* Y (EVs-Y) measured in a NanoSight LM10 instrument (Malvern Instruments). Data are representative of two independent experiments.

3.2 Cytotoxicity of aspirin and EVs-Y on RAW264.7 cells

The cytotoxic effect of aspirin and EVs-Y on RAW264.7 cells was evaluated using the MTT assay (Fig. 3A). The results indicated that up to 2.5 mM aspirin had no cytotoxic effect on RAW264.7 cells (Fig. 3A). Cells were incubated in the presence of EVs-Y (released from 1×10^7 parasites) in serum-depleted medium for 24 h. EVs-Y had no cytotoxic effect on RAW264.7 cells ($p = 0.4688$; Fig. 3B).

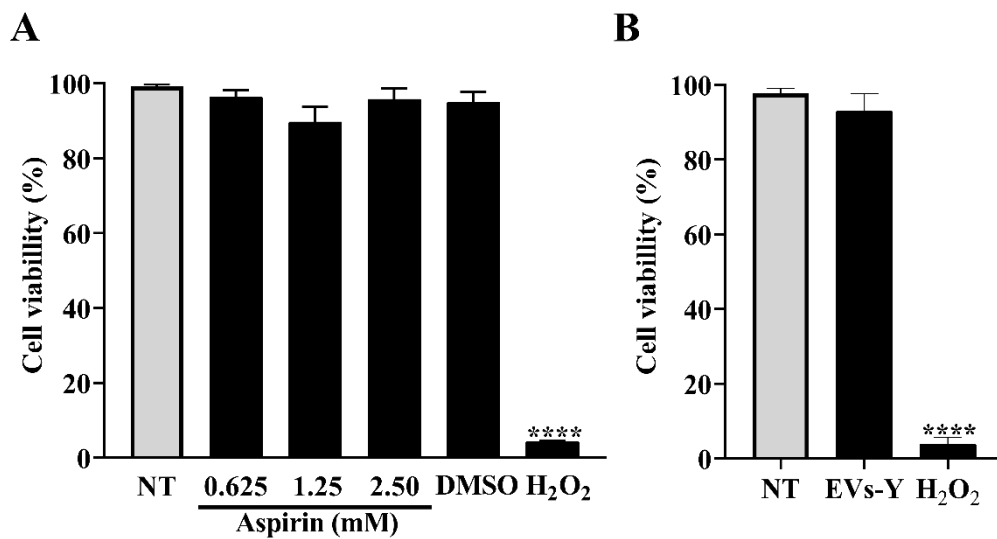


Fig. 3. Viability of RAW 264.7 cells after treatment with aspirin (A) and incubation with EVs-Y (B). Cell viability was determined by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay. Aspirin was not cytotoxic at up to 2.5 mM. Values are the mean \pm standard error of triplicate determinations from one of two independent experiments. H₂O₂ (1 mM) was used as a negative control. The vehicle control was treated with 0.05% DMSO only. NT, non-treated group. **** $p \leq 0.0001$.

3.3 Aspirin impairs parasite internalization by RAW 264.7 cells

To determine whether COX is involved in *T. cruzi* entry, cells were infected with trypomastigote forms in the presence of varying concentrations of aspirin. As shown in Figure 4, at all tested concentrations, parasite internalization by RAW cells was inhibited ($p \leq 0.005$).

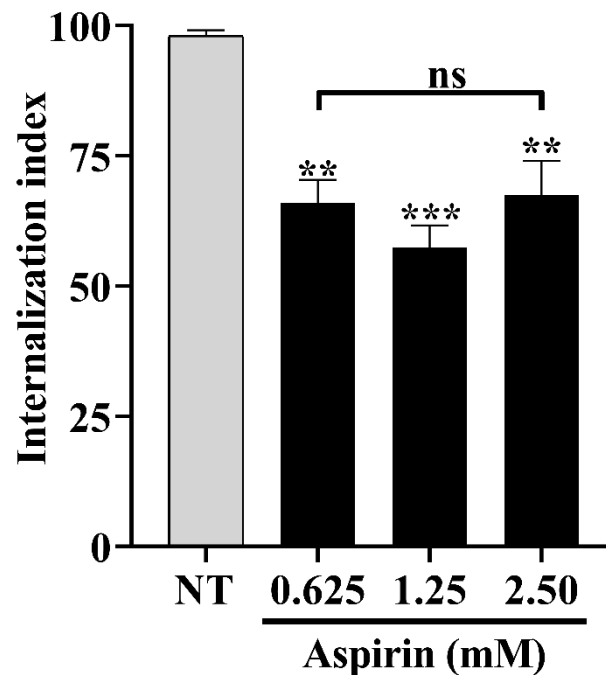


Fig. 4. Effect of aspirin on cell invasion by *T. cruzi*. Internalization index of the RAW 264.7 cells treated with aspirin (0.625–2.5 mM for 1 h). Values are the mean \pm standard error of triplicate determinations from one of two independent experiments. ** $p = 0.0045$ and *** $p = 0.0009$ vs. cells cultured in medium alone (NT, non-treated group), ns = non-significant.

3.4 EV-Y-induced enhanced cell invasion is reduced by aspirin

To obtain further evidence for the role of COX in EV-Y-potentiated *T. cruzi* invasion ($p = 0.0003$; Fig. 5A), RAW cells were pretreated with various concentrations of aspirin (0.625–2.5 μ M) prior to EV-Y incubation and *T. cruzi* infection. As shown in Fig. 5B, treatment with aspirin at 0.625, 1.25, or 2.5 mM diminished the enhanced parasite invasion induced by EVs-Y ($p = 0.0078$, $p = 0.0005$, and $p = 0.0091$, respectively).

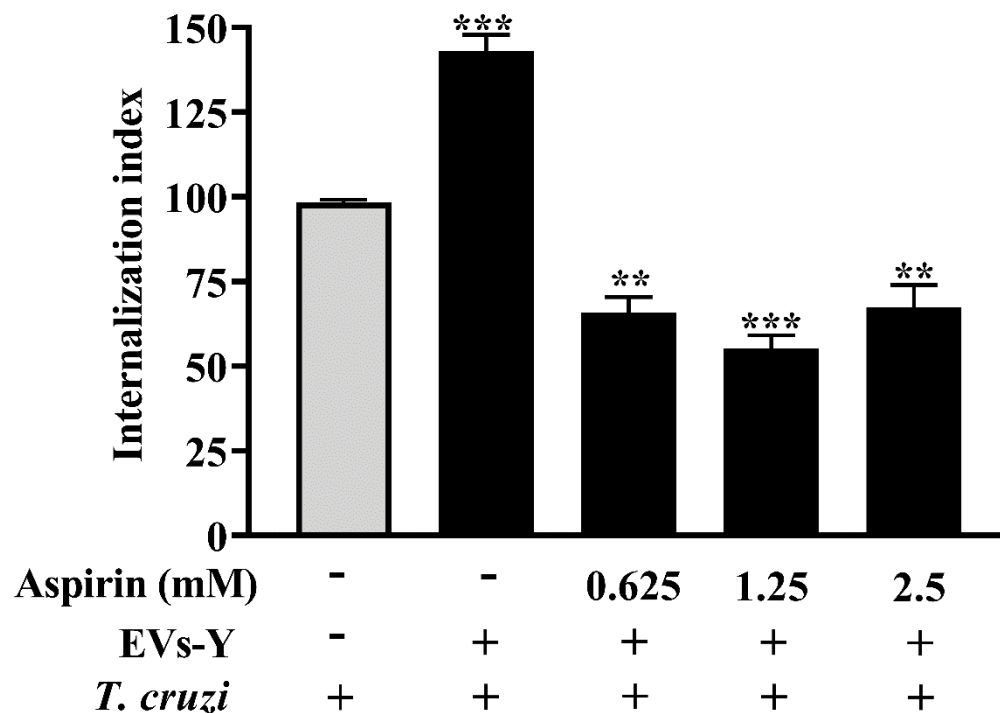


Fig. 5. Effect of aspirin on EVs-Y-potentiated *T. cruzi* invasion. Internalization index of RAW 264.7 cells treated with various concentrations of aspirin (0.625–2.5 mM) for 1 h prior to incubation with EVs-Y and *T. cruzi* infection. Values are the mean \pm standard error of triplicate determinations from one of two independent experiments. ** $p = 0.0078$ and *** $p = 0.0003$ vs. infected cells in medium alone.

3.5 Incubation with EVs-Y prior to *T. cruzi* infection decreases NO production by RAW cells

RAW cells elicited suboptimal NO production in response to *T. cruzi* Y infection, exhibiting an 8.0-fold increase in NO release compared to the uninfected controls (10.82 ± 1.7 vs. 1.35 ± 0.03 , $p = 0.0001$), but a decrease compared that observed in LPS-treated cells (10.82 ± 1.7 vs. 16.85 ± 0.37 , $p = 0.0233$) (Fig. 6). RAW cells exposed to EVs-Y and later infected with trypomastigote forms of *T. cruzi* showed lower NO production (1.46 ± 0.05 vs. 10.82 ± 1.7 , $p = 0.00033$) (Fig. 6) and an increase in the number of trypomastigote forms internalized

in the cell cytoplasm when compared to controls, indicating that the modulation effect exerted by EVs-Y favors the parasite (Fig. 7).

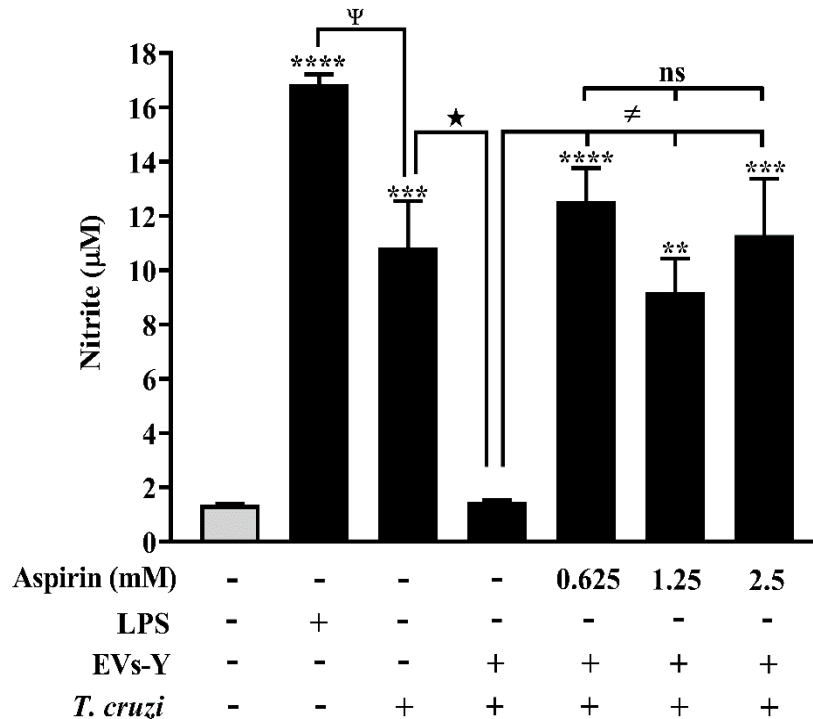


Fig. 6. RAW 264.7 cells exposed to EVs-Y and then infected with *T. cruzi* produce less nitrite, and this decrease was restored by aspirin pretreatment. Cells were treated or not with various concentrations of aspirin (0.625, 1.25, or 2.5 mM) for 1 h before incubation with EVs-Y and *T. cruzi* infection. Values are the mean \pm standard error of triplicate determinations from one of two independent experiments. Differences compared to untreated and uninfected cells are denoted as follows **** $p \leq 0.001$, *** $p = 0.0001$, ** $p = 0.0022$, ★ $p = 0.0033$, Ψ $p = 0.0233$, ≠ $p \leq 0.05$. ns = non-significant.

3.6 Pretreatment with aspirin restores nitrite production by infected-RAW cells incubated with EVs-Y

Interestingly, when RAW cells were pretreated with aspirin (0.625 mM) before exposure to EVs-Y and subsequent infection, NO production was increased (Fig. 6) and trypomastigote uptake was decreased compared to that in the controls (Fig. 7).

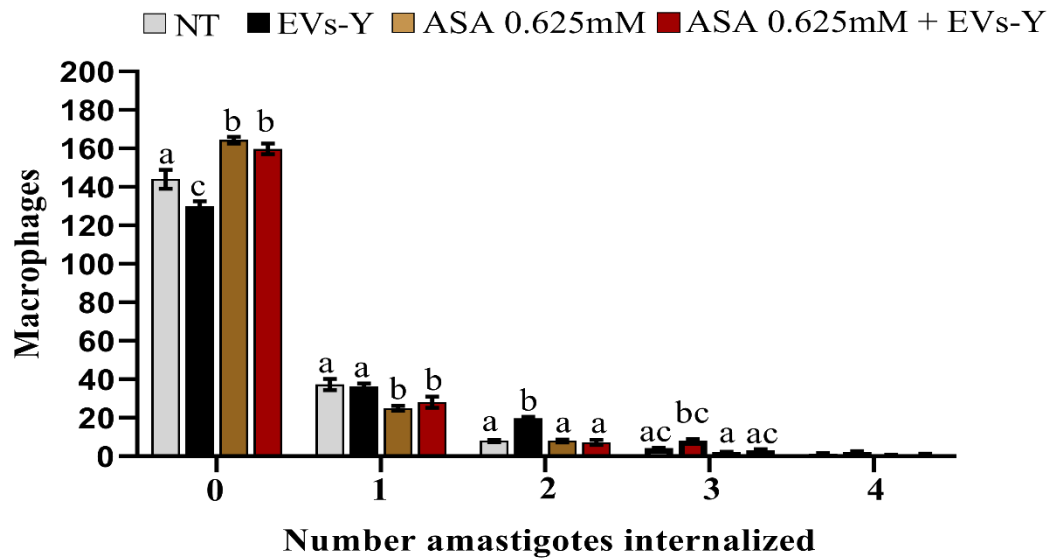


Fig. 7. Levels of *Trypanosoma cruzi* infection in RAW 264.7 cells. The number of infected RAW 264.7 cells with two amastigotes per cell increased in the presence of EVs-Y. Aspirin (0.625 mM) reduced the number of internalized amastigotes. Aspirin diminished the effects of EVs-Y on infection in RAW cells, as shown by the decrease in the number of cells containing one and two amastigotes per cell. Results are the mean \pm standard error of duplicate determinations. Means with different letters are significantly different ($p \leq 0.05$, one-way ANOVA with Tukey's post-test).

3.7 EVs-Y inhibit IFN- γ -induced NO generation

When IFN- γ was administered to *T. cruzi*-infected RAW 264.7 cells, NO production, measured as nitrite, was increased from the basal level of 10–19 mM after 48 h. The inhibitory effect of EVs-Y on NO production in IFN- γ -activated RAW cells is shown in Figure 8. The correlations between aspirin pretreatment (0.625–2.5mM) and its effects were pooled, and the results are also shown in Figure 8. The results presented in Figures 5–8 reinforced the concept that EVs shed by *T. cruzi* modulate the macrophage response in favor of the parasite and revealed a role for COX in the effects exerted by EVs in the innate immune compartment (Fig.9).

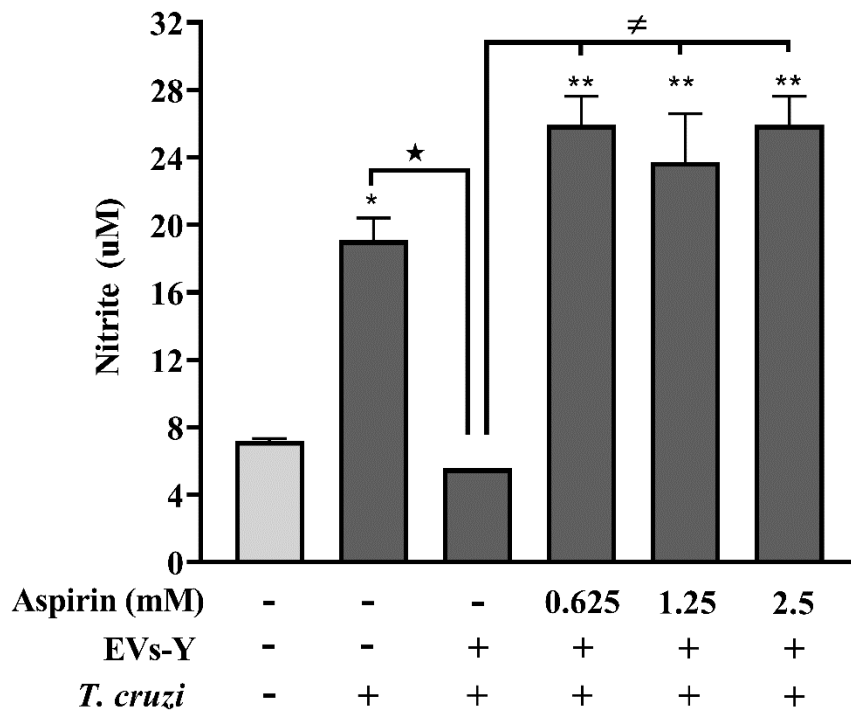


Fig. 8. IFN- γ -activated RAW 264.7 cells exposed to EVs-Y and then infected with *T. cruzi* produced less nitrite, and this decrease was restored by aspirin. Cells were treated with various concentrations of aspirin (0.625–2.5 mM for 1 h) before incubation with EVs-Y and *T. cruzi* infection. Values are the mean \pm standard error of triplicate determinations from one of two independent experiments. ns = non-significant. Asterisks indicate significant differences compared to untreated and uninfected cells. ** $p \leq 0.01$, * $p = 0.0148$, $p = 0,0079$, # $p \leq 0.01$ and ns = non-significant.

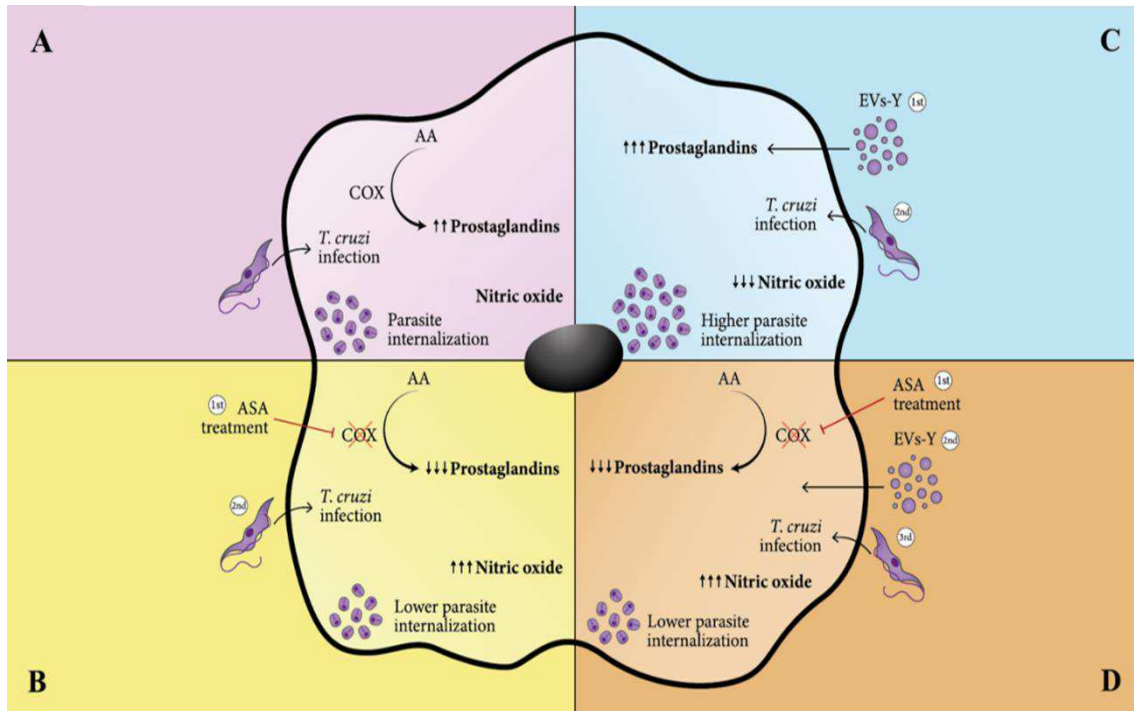


Fig. 9. Summary of the effects of cyclooxygenase (COX) blockade on the effects of EVs-Y in *T. cruzi*-infected in RAW 264.7 cells. (A) *T. cruzi* infection is associated with cellular activation, the production of prostaglandins and nitric oxide, and even so, the presence of intracellular amastigotes. (B) When cells are treated with aspirin (ASA) prior to infection, levels of the microbicidal molecule nitric oxide are increased and less parasite is internalized. (C) Cells that come into contact with extracellular vesicles released by *T. cruzi* Y strain (EVs-Y) produce more prostaglandins and less nitric oxide, and, after infection, show a greater number of internalized parasites. (D) However, when COX is blocked by aspirin before contact with EVs-Y, more nitric oxide is produced and infection results in less parasite internalization, demonstrating a role for COX in this modulation.

4. Discussion

Macrophages are one of the main targets of EVs, especially in the context of infectious diseases such as CD [23]. EVs secreted during acute and/or chronic *T. cruzi* infection play a role in parasite dissemination and survival in mammalian hosts [24]. Because macrophages are

key in the initial resistance to *T. cruzi* infection, a better understanding of their response to the parasite is crucial for the development of therapeutics for CD.

Eicosanoids are important in the regulation of the host immune response and affect *T. cruzi*-infection efficiency [3, 5, 6]. One potential mechanism by which eukaryotic microbes survive in macrophages involves deactivation of macrophages by microbe-produced prostaglandins and leukotrienes [25]. In the very early stage of *T. cruzi*-host cell interaction, the parasite modulates cellular metabolism to survive; the parasite preferentially synthesizes thromboxane [26] and PGE₂, which contributes to host invasion [27] and survival [28, 29].

Treatment with COX inhibitors reduced cardiac damage during the acute [30, 31] and chronic phases of experimental CD [32]. In vitro inhibition of COX impaired *T. cruzi* entry into macrophages [5] and cardiac cells [6], promoting differential modulation of the inflammatory response. Our data showed that aspirin impaired parasite internalization in RAW 264.7 cells. However, the involvement of COX in the *T. cruzi* macrophage-entry-promoting effects of EVs has not yet been explored in detail.

Intriguingly, EVs appeared to protect bioactive lipids from degradation and play a role in the transcellular synthesis of prostaglandins and leukotrienes [33]. EVs shed by *T. cruzi* facilitated parasite invasion of host cells, immunomodulated the host response, and helped the parasite evade this response [34]. Our data showed that EVs-Y increased *T. cruzi* invasion into RAW 264.7, which was reduced by aspirin, blocking the establishment of this parasite inside the host cell.

Our data also showed that RAW 264.7 macrophages exposed to EVs-Y and later infected with trypomastigote forms of *T. cruzi* produced lower levels of NO and had an increased number of internalized trypomastigotes compared to the controls, indicating that the effects exerted by EVs-Y favor the parasite. When macrophages were treated with aspirin, a dual COX inhibitor, before exposure to EVs-Y and subsequent infection with *T. cruzi*, NO

levels were higher and trypomastigote uptake was lower than in the controls. It was previously shown that inhibition of COX activity may increase NO levels, thus restoring the anti-parasitic activity of macrophages [35], and our results are consistent with this finding. According to other studies, high levels of PGE₂ favor *T. cruzi* replication, and treatment of infected mice with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) significantly reduces parasite replication [5-7, 31]. Interestingly, the addition of exogenous PGE₂ also increased replication of the parasite *Leishmania amazonensis* in macrophages, indicating that PGE₂ increases the intracellular pathogen load in susceptible mice [36] and restored the invasiveness of *T. cruzi* in macrophages previously treated with aspirin [5]. A distinguishing feature of *T. cruzi*-triggered macrophages is the presence of an increased number of distinct cytoplasmic organelles termed lipid bodies or lipid droplets [37]. *T. cruzi*-induced lipid bodies are sites of increased PGE₂ synthesis and are likely involved in the escape mechanisms triggered by *T. cruzi* [9, 38].

We observed that EVs-Y inhibited IFN- γ -induced generation of NO. Aspirin restored NO production. These results emphasize that EVs-Y regulate NO synthesis in activated macrophages probably through inducible nitric oxide synthase (iNOS). Further experiments are required to address this issue.

Our data suggest that EVs shed by *T. cruzi* modulate the inflammatory response in RAW 264.7 macrophages to favor the parasite and reveal, for the first time, the role of COX in this modulation. This may have important implications on anti-inflammatory therapy for CD.

5. References

- [1] WHO, Chagas disease (also known as American trypanosomiasis), 2021. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)).
- [2] F. Guhl, J.D. Ramírez, Poverty, Migration, and Chagas Disease, *Current Tropical Medicine Reports* 8(1) (2021) 52-58 <https://doi.org/10.1007/s40475-020-00225-y>.
- [3] F.S. Machado, S. Mukherjee, L.M. Weiss, H.B. Tanowitz, A.W. Ashton, Bioactive lipids in *Trypanosoma cruzi* infection, *Adv Parasitol* 76 (2011) 1-31. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385895-5.00001-3>.

- [4] M.A. Muñoz-Fernández, M.A. Fernández, M. Fresno, Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF- α and IFN- γ through a nitric oxide-dependent mechanism, *Immunology letters* 33(1) (1992) 35-40. [https://doi.org/10.1016/0165-2478\(92\)90090-B](https://doi.org/10.1016/0165-2478(92)90090-B).
- [5] A.D. Malvezi, R.V. da Silva, C. Panis, L.M. Yamauchi, M.I. Lovo-Martins, N.G. Zanluqui, V.L. Tatakihara, L.V. Rizzo, W.A. Verri, Jr., M.C. Martins-Pinge, S.F. Yamada-Ogatta, P. Pinge-Filho, Aspirin modulates innate inflammatory response and inhibits the entry of *Trypanosoma cruzi* in mouse peritoneal macrophages, *Mediators Inflamm* 2014 (2014) 580919. <https://doi.org/10.1155/2014/580919>.
- [6] A.D. Malvezi, C. Panis, R.V. da Silva, R.C. de Freitas, M.I. Lovo-Martins, V.L. Tatakihara, N.G. Zanluqui, E.C. Neto, S. Goldenberg, J. Bordignon, S.F. Yamada-Ogatta, M.C. Martins-Pinge, R. Cecchini, P. Pinge-Filho, Inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 impairs *Trypanosoma cruzi* entry into cardiac cells and promotes differential modulation of the inflammatory response, *Antimicrob Agents Chemother* 58(10) (2014) 6157-64. <https://doi.org/10.1128/AAC.02752-14>.
- [7] J.D.A.S. Trindade, C.G. Freire-de-Lima, S. Côte-Real, D. Decote-Ricardo, M.E. Freire de Lima, Drug repurposing for Chagas disease: In vitro assessment of nimesulide against *Trypanosoma cruzi* and insights on its mechanisms of action, *PloS one* 16(10) (2021) e0258292. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0258292>.
- [8] F.S. Machado, G.i.A. Martins, J.I.C. Aliberti, F.L. Mestriner, F.Q. Cunha, J.o.S. Silva, *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity, *Circulation* 102(24) (2000) 3003-3008. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.102.24.3003>.
- [9] M.I. Lovo-Martins, A.D. Malvezi, N.G. Zanluqui, B.F.C. Lucchetti, V.L.H. Tatakihara, P.A. Mörking, A.G. de Oliveira, S. Goldenberg, P.F. Wovk, P. Pinge-Filho, Extracellular Vesicles Shed By *Trypanosoma cruzi* Potentiate Infection and Elicit Lipid Body Formation and PGE(2) Production in Murine Macrophages, *Front Immunol* 9 (2018) 896. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00896>.
- [10] A.C. Torrecilhas, R.P. Soares, S. Schenkman, C. Fernández-Prada, M. Olivier, Extracellular vesicles in trypanosomatids: host cell communication, *Frontiers in cellular and infection microbiology* 10 (2020). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.602502>.
- [11] C.I. Vasconcelos, A. Cronemberger-Andrade, N. Souza-Melo, J.T. Maricato, P. Xander, W.L. Batista, R.P. Soares, S. Schenkman, A.C. Torrecilhas, Stress induces release of extracellular vesicles by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes, *Journal of Immunology Research* 2021 (2021). <https://doi.org/10.1155/2021/2939693>.
- [12] A.C.T. Torrecilhas, R.R. Tonelli, W.R. Pavanelli, J.S. da Silva, R.I. Schumacher, W. de Souza, N.C. e Silva, I. de Almeida Abrahamsohn, W. Colli, M.J.M. Alves, *Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response, *Microbes and Infection* 11(1) (2009) 29-39. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.10.003>.
- [13] M. Wyllie, M. Ramirez, 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, *Pathogens and Disease* 75(7) (2017). <https://doi.org/10.1093/femspd/ftx077>.
- [14] I.V. Rossi, M.A.F. Nunes, S. Vargas-Otalora, T.C. da Silva Ferreira, M. Cortez, M.I. Ramirez, Extracellular Vesicles during TriTryps infection: Complexity and future challenges, *Molecular Immunology* 132 (2021) 172-183. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2021.01.008>.
- [15] R.C. de Freitas, S.C.H. Lonien, A.D. Malvezi, G.F. Silveira, P.F. Wovk, R.V. da Silva, L.M. Yamauchi, S.F. Yamada-Ogatta, L.V. Rizzo, J. Bordignon, *Trypanosoma cruzi*: Inhibition of infection of human monocytes by aspirin, *Experimental parasitology* 182 (2017) 26-33. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.09.019>.
- [16] S. Mukherjee, F.S. Machado, H. Huang, H.S. Oz, L.A. Jelicks, C.M. Prado, W. Koba, E.J. Fine, D. Zhao, S.M. Factor, Aspirin treatment of mice infected with *Trypanosoma cruzi* and implications for the pathogenesis of Chagas disease, *PloS one* 6(2) (2011) e16959. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016959>.
- [17] B. Zingales, S.G. Andrade, M.R. Briones, D.A. Campbell, E. Chiari, O. Fernandes, F. Guhl, E. Lages-Silva, A.M. Macedo, C.R. Machado, M.A. Miles, A.J. Romanha, N.R. Sturm, M. Tibayrenc, A.G. Schijman, A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI, *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(7) (2009) 1051-4. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000700021>.

- [18] E.S. Barrias, L.C. Reignault, W. De Souza, T.M. Carvalho, Dynasore, a dynamin inhibitor, inhibits *Trypanosoma cruzi* entry into peritoneal macrophages, *PLoS One* 5(1) (2010) e7764. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007764>.
- [19] V.L. Tatakihara, A.D. Malvezi, C. Panis, R. Cecchini, N.G. Zanluqui, L.M. Yamauchi, M.I. Martins, R.V. da Silva, S.F. Yamada-Ogatta, L.V. Rizzo, M.C. Martins-Pinge, P. Pinge-Filho, Nitric oxide-releasing indomethacin enhances susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection acting in the cell invasion and oxidative stress associated with anemia, *Chem Biol Interact* 227 (2015) 104-11. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.12.024>.
- [20] E. Bayer-Santos, C. Aguilar-Bonavides, S.P. Rodrigues, E.M. Cordero, A.F. Marques, A. Varela-Ramirez, H. Choi, N. Yoshida, J.F. da Silveira, I.C. Almeida, Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* secretome: characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins, *J Proteome Res* 12(2) (2013) 883-97. <https://doi.org/10.1021/pr300947g>.
- [21] T.M. Clemente, C. Cortez, S. Novaes Ada, N. Yoshida, Surface Molecules Released by *Trypanosoma cruzi* Metacyclic Forms Downregulate Host Cell Invasion, *PLoS Negl Trop Dis* 10(8) (2016) e0004883. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004883>.
- [22] P.M. Nogueira, K. Ribeiro, A.C. Silveira, J.H. Campos, O.A. Martins-Filho, S.R. Bela, M.A. Campos, N.L. Pessoa, W. Colli, M.J. Alves, Vesicles from different *Trypanosoma cruzi* strains trigger differential innate and chronic immune responses, *Journal of extracellular vesicles* 4(1) (2015) 28734. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.28734>.
- [23] A. Cronemberger-Andrade, P. Xander, R.P. Soares, N.L. Pessoa, M.A. Campos, C.C. Ellis, B. Grajeda, Y. Ofir-Birin, I.C. Almeida, N. Regev-Rudzki, A.C. Torrecilhas, *Trypanosoma cruzi*-Infected Human Macrophages Shed Proinflammatory Extracellular Vesicles That Enhance Host-Cell Invasion via Toll-Like Receptor 2, *Front Cell Infect Microbiol* 10 (2020) 99. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00099>.
- [24] L.M. de Pablos Torró, L. Retana Moreira, A. Osuna, Extracellular Vesicles in Chagas Disease: A New Passenger for an Old Disease, *Front Microbiol* 9 (2018) 1190. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01190>.
- [25] M.C. Noverr, J.R. Erb-Downward, G.B. Huffnagle, Production of eicosanoids and other oxylipins by pathogenic eukaryotic microbes, *Clin Microbiol Rev* 16(3) (2003) 517-33. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.517-533.2003>.
- [26] A.W. Ashton, S. Mukherjee, F. Nagajyothi, H. Huang, V.L. Braunstein, M.S. Desruisseaux, S.M. Factor, L. Lopez, J.W. Berman, M. Wittner, Thromboxane A2 is a key regulator of pathogenesis during *Trypanosoma cruzi* infection, *The Journal of Experimental Medicine* 204(4) (2007) 929-940. <https://doi.org/10.1084/jem.20062432>.
- [27] K. Moraes, L.F. Diniz, M.T. Bahia, Role of cyclooxygenase-2 in *Trypanosoma cruzi* survival in the early stages of parasite host-cell interaction, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 110 (2015) 181-191. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140311>.
- [28] L. Sterin-Borda, G. Gorelik, N. Goren, S.G. Cappa, A.M. Celentano, E. Borda, Lymphocyte Muscarinic Cholinergic Activity and PGE2 Involvement in Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection, *Clinical immunology and immunopathology* 81(2) (1996) 122-128. <https://doi.org/10.1006/clin.1996.0167>.
- [29] P. Pinge-Filho, C.E. Tadokoro, I. de Almeida Abrahamsohn, Prostaglandins Mediate Suppression of Lymphocyte Proliferation and Cytokine Synthesis in Acute *Trypanosoma cruzi* Infection, *Cellular immunology* 193(1) (1999) 90-98. <https://doi.org/10.1006/cimm.1999.1463>.
- [30] G. Abdalla, G. Faria, K. Silva, E. Castro, M. Reis, M. Michelin, *Trypanosoma cruzi*: the role of PGE2 in immune response during the acute phase of experimental infection, *Experimental parasitology* 118(4) (2008) 514-521. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.11.003>.
- [31] V.L. Hideko Tatakihara, R. Cecchini, C.L. Borges, A.D. Malvezi, V.K. Graça-de Souza, S.F. Yamada-Ogatta, L.V. Rizzo, P. Pinge-Filho, Effects of cyclooxygenase inhibitors on parasite burden, anemia and oxidative stress in murine *Trypanosoma cruzi* infection, *FEMS immunology and medical microbiology* 52(1) (2008) 47-58. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00340.x>.
- [32] R.S. Pereira, A.D. Malvezi, M.I. Lovo-Martins, B.F.C. Lucchetti, J.P. Santos, E.R. Tavares, W.A. Verri Jr, E.J. de Almeida Araújo, L.M. Yamauchi, S.F. Yamada-Ogatta, Combination therapy using benznidazole and aspirin during the acute phase of experimental chagas disease prevents cardiovascular

- dysfunction and decreases typical cardiac lesions in the chronic Phase, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 64(7) (2020) e00069-20.
- [33] K. Sagini, E. Costanzi, C. Emiliani, S. Buratta, L. Urbanelli, Extracellular Vesicles as Conveyors of Membrane-Derived Bioactive Lipids in Immune System, *Int J Mol Sci* 19(4) (2018). <https://doi.org/10.3390/ijms19041227>.
- [34] L. Retana Moreira, F. Rodríguez Serrano, A. Osuna, Extracellular vesicles of *Trypanosoma cruzi* tissue-culture cell-derived trypomastigotes: induction of physiological changes in non-parasitized culture cells, *PLoS Neglected Tropical Diseases* 13(2) (2019) e0007163. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007163>.
- [35] F. Kierszenbaum, J.J. Wirth, P.P. McCANN, A. Sjoerdsma, Impairment of macrophage function by inhibitors of ornithine decarboxylase activity, *Infection and immunity* 55(10) (1987) 2461-2464. <https://doi.org/10.1128/iai.55.10.2461-2464.1987>.
- [36] R.O. Pinheiro, M.P. Nunes, C.S. Pinheiro, H. D'Avila, P.T. Bozza, C.M. Takiya, S. Corte-Real, C.G. Freire-de-Lima, G.A. DosReis, Induction of autophagy correlates with increased parasite load of *Leishmania amazonensis* in BALB/c but not C57BL/6 macrophages, *Microbes Infect* 11(2) (2009) 181-90. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19070676>. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.11.006>.
- [37] H. D'Avila, D.A. Toledo, R.C. Melo, Lipid bodies: inflammatory organelles implicated in host-*Trypanosoma cruzi* interplay during innate immune responses, *Mediators Inflamm* 2012 (2012) 478601. <https://doi.org/10.1155/2012/478601>.
- [38] H. D'Avila, C.G. Freire-de-Lima, N.R. Roque, L. Teixeira, C. Barja-Fidalgo, A.R. Silva, R.C. Melo, G.A. Dosreis, H.C. Castro-Faria-Neto, P.T. Bozza, Host cell lipid bodies triggered by *Trypanosoma cruzi* infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with prostaglandin E₂ generation and increased parasite growth, *J Infect Dis* 204(6) (2011) 951-61. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir432>.