

Universidade De Brasília
Faculdade de Medicina
Programa De Pós-Graduação Em Medicina Tropical

Emãnuella Melgaço Garcez

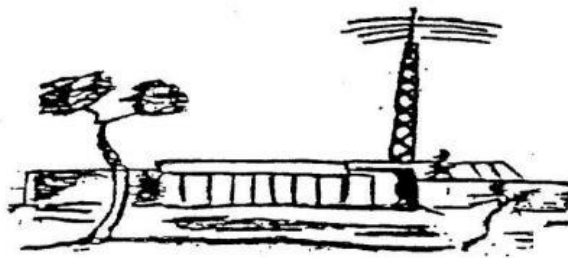
**Efeito do parasitismo por *Trypanosoma cruzi* sobre o potencial
imunomodulatório parácrino de células-tronco**

BRASÍLIA
2022

Efeito do parasitismo por *Trypanosoma cruzi* sobre o potencial imunomodulatório parácrino de células-tronco

Emãnuella Melgaço Garcez

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Medicina Tropical da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Biologia das doenças infecciosas e parasitárias.
Orientador: Profa. Dra. Juliana Lott de Carvalho
Coorientadora: Profa. Dra. Mariana Hecht



**BRASÍLIA
2022**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

MG215e Melgaço Garcez, Emãnuella
Efeito do parasitismo por *Trypanosoma cruzi* sobre o
potencial imunomodulatório parácrino de células-tronco /
Emãnuella Melgaço Garcez; orientador Juliana Lott de
Carvalho; co-orientador Mariana Hecht. -- Brasília, 2022.
162 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Administração) --
Universidade de Brasília, 2022.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Doença de chagas. 3. Células
tronco. 4. Tecido adiposo. I. Lott de Carvalho, Juliana,
orient. II. Hecht, Mariana, co-orient. III. Título.

Data da defesa

22 de fevereiro de 2022

Banca examinadora

Professora Doutora Juliana Lott de Carvalho (Presidente)
Universidade de Brasília

Professora Doutora Nadjar Nitz Silva Lociks de Araújo (Membro)
Universidade de Brasília

Doutor Robert Edward Pogue (Membro externo)
Universidade Católica de Brasília

Doutora Cecilia Beatriz Fiuza Favali (Membro suplente)
Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por me conceder a graça de chegar até aqui, me amparando em todos os momentos.

Agradeço imensamente a minha orientadora Juliana Lott, por toda paciência e por todo tempo dedicado a construir este trabalho junto comigo.

Agradeço também as professoras Nadjar Nitz, Luciana Hagstrom por todos os conselhos e sugestões, além do tempo e trabalho, dedicado a contribuir de forma indispensável neste trabalho.

Agradeço também a Thuany Alencar, Amandda Carvalho, Aline Moraes, Isabela Teotônio e Nélio Gomes, por todos os ensinamentos, por toda a ajuda e parceria durante essa caminhada.

Agradeço a minha mãe, Neyva Samara por todo apoio e por todos os momentos em que me ouviu desabafar sobre coisas que nem sempre conseguia compreender. Agradeço ao Marcos e ao Levy por todo carinho e apoio.

Muito obrigada a todos!

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.

Figura 2. Requisitos para caracterização das populações de CTMs segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular.

Figura 3. Interações imunomodulatórias entre células-tronco mesenquimais e células imunes.

Figura 4: Cultivo de células-tronco mesenquimais (CTMs) de 3 doadores em meio DMEM suplementado com 10% v.v. de SFB.

Figura 5: Histogramas representativos dos marcadores positivos CD44; CD73; CD90 e CD140 em CTMs isoladas de três doadores.

Figura 6: Histogramas representativos dos marcadores negativos CD11b; CD19; CD34; CD45 e HLA-DR em CTMs isoladas de três doadores.

Figura 7. Diferenciação adipogênica de células-tronco mesenquimais (CTMs).

Figura 8. Diferenciação condrogênica de células-tronco mesenquimais (CTMs).

Figura 9. Gráfico representativo da taxa de proliferação das CTMs dos três doadores.

Figura 10. Gráfico representativo da expressão de genes relacionados a imunomodulação nos diferentes doadores de células-tronco mesenquimais (CTMs 1, 2 e 3).

Figura 11. Cultivo de CTMs dos três doadores, após 7 dias de infecção por *T. cruzi* na concentração de 1:1 (CTMs: parasitos).

Figura 12. Cultivo de CTMs dos três doadores, após 7 dias de infecção por *T. cruzi* na concentração de 1:5 (CTMs: parasitos).

Figura 13. Gráfico representativo da expressão do gene *Tc40* em amostras dos três doadores de CTMs infectados pelo *T. cruzi*.

Figura 14. Gráfico representativo da expressão gênica de citocinas em amostras dos três doadores de CTMs não infectados e infectados pelo *T. cruzi*.

Figura 15. Gráfico da comparação da secreção de óxido nítrico (NO) entre os grupos de macrófagos tratados com sobrenadante de CTMs infectadas e não infectadas por *T. cruzi*.

Figura 16. Gráficos representativos da expressão gênica de macrófagos tratados com sobrenadantes de CTMs infectadas e não infectadas por *T. cruzi*.

Figura 17. Gráficos representativos da expressão gênica de macrófagos tratados com sobrenadantes de CTMs infectadas e não infectadas por *T. cruzi* estimulados por LPS.

Figura 18. Gráficos representativos da razão entre a expressão gênica de *IL-1B* e *IL-10* em macrófagos tratados com sobrenadantes de CTMs infectadas e não infectadas por *T. cruzi*, estimuladas e não estimuladas por LPS.

Figura 19. Histogramas representativos da população CD3⁺ CFSE⁺ em amostras de PBMCs.

Figura 20. Gráficos representativos de proliferação de linfócitos T em amostras de PBMCs estimuladas por PHA e tratados com sobrenadante de CTMs infectadas e não infectadas por *T. cruzi*.

Figura 21. Gráficos representativos da expressão gênica de PBMCs tratados com sobrenadantes de CTMs infectadas e não infectadas por *T. cruzi*.

Figura 22. Gráficos representativos da expressão gênica de PBMCs tratados com sobrenadantes de CTMs infectadas e não infectadas por *T. cruzi* e estimulados por PHA.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de iniciadores.

Tabela 2. Dados relativos à expressão de marcadores positivos para CTMs, em porcentagem.

Tabela 3. Dados relativos à expressão de marcadores negativos para CTMs, em porcentagem.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cDNA- DNA complementar

CFSE - Carboxifluoresceína succinimidil éster

CTMs – Células-tronco mesenquimais

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium low glucose*

DTUs – Unidades de tipagem discreta

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

FGF - Fator de crescimento de fibroblastos

GAPDH - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

HGF - Fator de crescimento de hepatócitos

HLA - Human Leucocyte Antigen

HLA-DR - Antígeno leucocitário humano-DR

ICAM-1 - Molécula-1, da adesão intercelular

IDO - Indoleamina-pirrol 2,3-dioxigenase

IFN - Interferon

IFN- γ – Interferon gama

IL – Interleucina

IL-1 β - Interleucina 1 beta

IL-6 - Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

IL-10 - Interleucina 10

IL-12 – Interleucina 12

iNOS - Óxido nítrico sintase induzível

IU/L – Unidades por litro

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

LDLr – Receptor de lipoproteína de baixa densidade

LPS - Lipopolissacarídeo

Lit - Liver Infusion Triptose

mL – Mililitro

NK - Natural Killer (Célula exterminadora natural)

NO – Óxido nítrico

PAMPs - Pathogen Associated Molecular Patterns (Padrões moleculares associados a patógenos)

PBMCs - Peripheral blood mononuclear cells (Células mononucleares do sangue periférico).

PBS - Phosphate Buffer Saline (Tampão fosfato-salino)

PD-L1 - Programmed Death ligand 1 (Ligante 1 de morte programada)

PD-L2 - Programmed Death ligand 1 (Ligante 2 de morte programada)

PGE2 - Prostaglandina E2

pH - Potencial hidrogeniônico

PHA – Phytohemagglutinin (Fitohemaglutinina)

PMA - phorbol 12-myristate 13-acetate (Phorbol-12-miristato-13-acetato)

qRT-PCR - Quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (PCR quantitativa associada a transcrição reversa, ou PCR em tempo real)

RNA - Ribonucleic acid (Ácido ribonucleico)

SFB - Soro fetal bovino

T CD4+ – Linfócitos T CD4+

T CD8+ - Linfócitos T CD8+

T. cruzi - *Trypanosoma cruzi*

Tc40 - Antígeno imunodominante do *Trypanosoma cruzi*

TCR – T cell receptor (receptor de células T)

TGF - Tumour Growth Factor (Fator de Crescimento Transformador)

TGF- β - Tumour Growth Factor - β (Fator de crescimento transformador- β)

TGF-β1 - Tumour Growth Factor -β1 (Fator de crescimento transformante-β1)

TLR - Toll like receptor (receptores Toll-Like)

TLR3 - Toll like receptor (receptores Toll-Like 3)

TNF – Tumour Necrosis Factor (Fator de Necrose Tumoral)

TNF-α - Tumour Necrosis Factor-α fator de necrose tumoral-α (Fator de Necrose Tumoral alfa)

TSG 6 - Tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein (Gene 6 induzível por fator de necrose tumoral)

UnB - Universidade de Brasília

VCAM-1 - Vascular cell adhesion molecule 1 (Molécula-1 de adesão celular vascular)

VEGF - Vascular endothelial growth factor (Fator de crescimento endotelial vascular)

Vβ5 - região variável 5

μm - micrômetro

FINANCIAMENTO

Edital DPG No. 0004/2021 Processo Nº 23106.033190/2021-00

Bolsa de demanda social da CAPES/UnB

SUMÁRIO

1. Introdução	17
1.1. Doença de Chagas	17
1.2. Células-tronco mesenquimais	24
1.2.1. Mecanismos de imunorregulação pelas células-tronco mesenquimais	26
1.2.2. Alterações funcionais de células-tronco mesenquimais em doenças sistêmicas	30
2. Justificativa	31
3. Hipótese	32
4. Objetivos	33
4.1. Objetivo geral	33
4.2. Objetivos específicos	33
5. Metodologia	34
5.1. Fluxograma Geral	34
5.2. Preparação de meio de cultivo celular DMEM LOW GLUCOSE	34
5.3. Cultivo de <i>Trypanosoma cruzi</i>	34
5.4. Isolamento, cultivo e caracterização de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo	35
5.4.1. Criopreservação e descongelamento	35
5.4.2. Troca de meio e passagem	36
5.4.3. Caracterização das células-tronco mesenquimais	36
5.4.3.1. Adesão ao plástico	37
5.4.3.2. Perfil imunofenotípico	37
5.4.3.3. Diferenciação Celular	37
5.4.3.4. Meios de diferenciação celular	37
5.4.3.4.1. Condrogênico	37
5.4.3.4.2. Adipogênico	38
5.4.4. Coloração de células diferenciadas	38
5.4.4.1. Condrogênica	38
5.4.4.2. Adipogênica	38
5.4.5. Capacidade proliferativa	38
5.4.6. Avaliação da expressão gênica	39

5.5. Infecção de células-tronco mesenquimais com <i>T. cruzi</i>	39
6. Resultados	44
6.1. Isolamento e caracterização das células-tronco-mesenquimais	44
6.2. Taxa proliferativa das CTM	50
6.3. Assinatura imunológica das CTMs	50
6.4. Ensaio de infecção de células-tronco mesenquimais por <i>Trypanosoma cruzi</i>	51
6.5. Determinação da carga parasitária	54
6.6. Avaliação da expressão de genes associados à imunorregulação em células-tronco mesenquimais infectadas por <i>Trypanosoma cruzi</i>	54
6.7. Avaliação da produção de óxido nítrico em macrófagos estimulados com LPS e tratados com o sobrenadante de CTMs infectadas ou não por <i>T. cruzi</i>	55
6.8. Avaliação da expressão gênica em macrófagos	57
6.9. Ensaio de proliferação de PBMCs estimuladas com fitohemaglutinina e tratadas com o sobrenadante de CTMs infectadas ou não por <i>T. cruzi</i>	60
6.10. Avaliação da expressão gênica em PBMCs	62
7. Discussão	64
8. Conclusão, perspectivas e limitações	79
9. Referências	80
Apêndice I: Tabelas com os valores de expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).	116
Anexo I: Certificado CEP	122
Anexo II: Previa do artigo	126

RESUMO

A doença de Chagas é uma infecção parasitária cujo agente etiológico é o protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. A doença impacta tecidos como a medula óssea e tecido adiposo, onde são encontradas as células-tronco mesenquimais (CTMs). Porém, até o momento, ainda não se caracterizou as consequências da infecção de CTMs pelo parasito. Portanto, neste trabalho investigamos o potencial de imunomodulação parácrina de populações de CTMs obtidas do tecido adiposo de doadores humanos saudáveis após a infecção *in vitro* por *T. cruzi*. As CTMs foram isoladas do tecido adiposo de doadores saudáveis e caracterizadas, atendendo aos critérios de classificação da Sociedade Internacional de Terapia Celular. Foi estabelecida a assinatura imunológica de cada doador de CTM através da avaliação da expressão de mediadores anti-inflamatórios. Percebeu-se que existe diferença nos níveis de expressão basal dos genes relacionados à imunomodulação entre as CTMs de diferentes doadores. As CTMs foram infectadas pela cepa Colombiana de *T. cruzi*, na proporção 1:1 e 1:5 (CTMs: parasitos). A carga parasitária foi verificada através da detecção e quantificação relativa do gene Tc40 e revelou variação entre as amostras. O meio condicionado entre o 5º e 7º dia de infecção das CTMs foi obtido e utilizado para realização de ensaios de dosagem de óxido nítrico (NO) em macrófagos estimulados ou não por LPS e proliferação de células T em amostras de células polimorfonucleares do sangue periférico estimuladas ou não por fitohemaglutinina (PHA). Observou-se que independente do status de infecção, o sobrenadante das CTM diminuiu o nível de liberação de NO induzido pelo LPS e a proliferação de linfócitos T induzida pela PHA. Apesar das variações individuais observadas, a infecção por *T. cruzi* comprometeu a capacidade modulatória do sobrenadante das CTMs sobre os macrófagos, mas não sobre os linfócitos T. Individualmente, a infecção pelo parasito promoveu tanto o aumento quanto a diminuição da atividade imunomodulatória parácrina das CTMs isoladas de diferentes doadores. Os sobrenadantes de CTM impactaram na expressão de *IL-1B* e *IL-10* em macrófagos, possivelmente levando a alterações de polarização M1 e M2. Nos ensaios de ativação de linfócitos T em amostras de células mononucleares de sangue periférico, observou-se novamente que a infecção por *T. cruzi* tem diferentes impactos sobre as CTM, de acordo com cada doador. Porém, quando analisados individualmente de maneira qualitativa, os dados permitem notar que o potencial imunomodulatório parácrino das CTM 1 e 3 foi realçado após infecção pelo parasita, enquanto o potencial imunossupressor parácrino da CTM 2 foi comprometido após infecção pelo parasito. Tomados juntos, os resultados demonstram que as CTMs podem ser parasitadas por *T. cruzi*, e que a infecção tem diferentes impactos sobre o potencial imunomodulatório das células derivadas de diferentes doadores. O impacto da infecção de CTMs pelo parasito deve ser, portanto, investigado em trabalhos futuros com o intuito de estabelecer o impacto da infecção de CTMs para o prognóstico da doença.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*; Doença de chagas; Células-tronco mesenquimais; Tecido adiposo.

ABSTRACT

Chagas disease is a parasitic infection whose etiologic agent is the hemoflagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*. The disease impacts tissues such as bone marrow and adipose tissue, where mesenchymal stem cells (MSCs) are found. However, to date, the consequences of MSC infection by the parasite have not yet been characterized. Therefore, in this work we investigated the paracrine immunomodulation potential of MSC populations obtained from the adipose tissue of healthy human donors after in vitro infection with *T. cruzi*. MSCs were isolated from the adipose tissue of healthy donors and characterized, meeting the classification criteria of the International Society for Cell Therapy. The immunological signature of each MSC donor was established by evaluating the expression of anti-inflammatory mediators. It was noticed that there is a difference in the basal expression levels of genes related to immunomodulation between MSCs from different donors. The MSCs were infected by the Colombian strain of *T. cruzi*, in the proportions 1:1 and 1:5 (MSCs: parasites). The parasite load was verified through the detection and relative quantification of the Tc40 gene and revealed variation between samples. The conditioned medium between the 5th and 7th day of MSC infection was obtained and used for assays of nitric oxide (NO) dosage in macrophages stimulated or not by LPS and T cell proliferation in samples of stimulated peripheral blood polymorphonuclear cells or not by phytohemagglutinin (PHA). It was observed that regardless of the infection status, the MSC supernatant decreased the level of NO release induced by LPS and the proliferation of T lymphocytes induced by PHA. Despite the individual variations observed, infection by *T. cruzi* compromised the modulatory capacity of the MSC supernatant on macrophages, but not on T lymphocytes. Individually, infection by the parasite promoted both an increase and a decrease in the paracrine immunomodulatory activity of MSCs. isolated from different donors. MSC supernatants impacted IL-1B and IL-10 expression in macrophages, possibly leading to M1 and M2 polarization changes. In the T lymphocyte activation assays in peripheral blood mononuclear cell samples, it was again observed that *T. cruzi* infection has different impacts on MSCs, according to each donor. However, when analyzed individually in a qualitative way, the data show that the paracrine immunomodulatory potential of MSCs 1 and 3 was enhanced after infection by the parasite, while the paracrine immunosuppressive potential of MSC 2 was compromised after infection by the parasite. Taken together, the results demonstrate that MSCs can be parasitized by *T. cruzi*, and that the infection has different impacts on the immunomodulatory potential of cells derived from different donors. The impact of MSC infection by the parasite should therefore be investigated in future work in order to establish the impact of MSC infection on the prognosis of the disease.

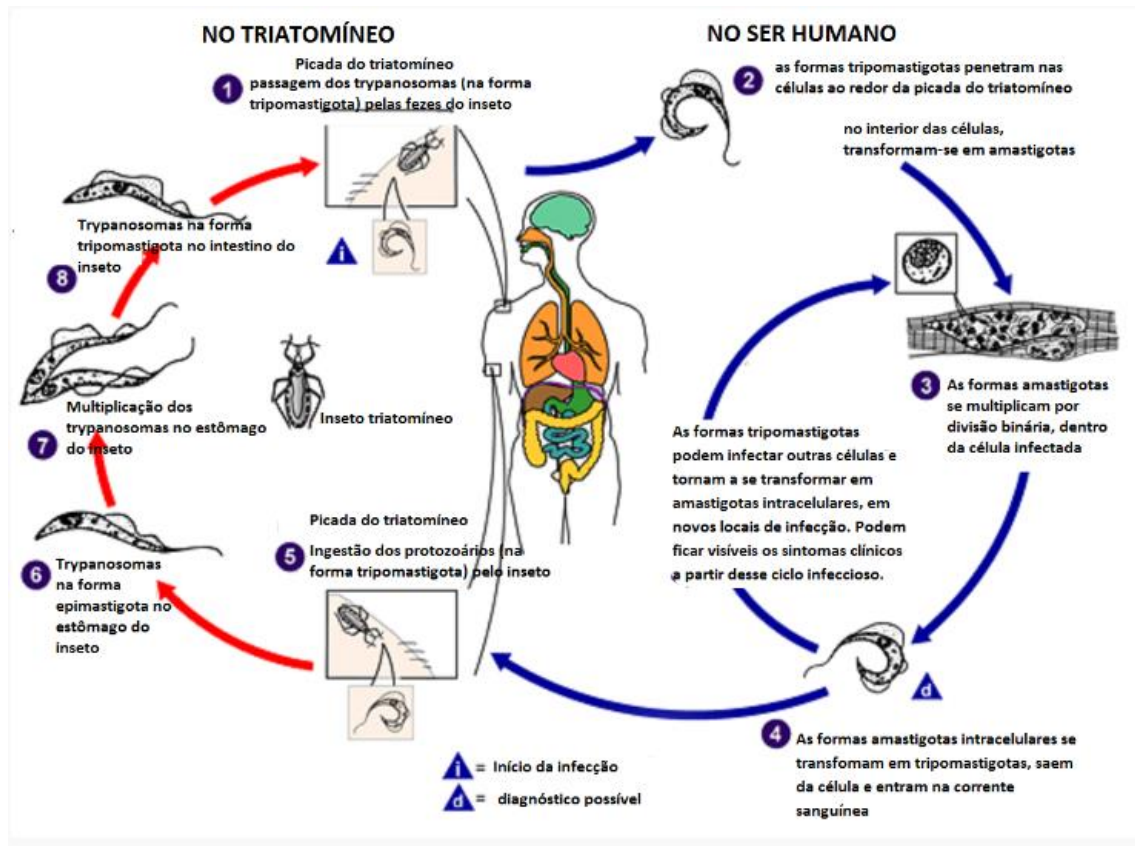
Keywords: *Trypanosoma cruzi*; Chagas disease; Mesenchymal stem cells; Adipose tissue.

1. Introdução

1.1. Doença de Chagas

A doença de Chagas é uma infecção parasitária que tem como agente causador o protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* e configura-se como um grande problema de saúde pública no Brasil. O *T. cruzi* tem um ciclo de vida complexo (figura 1) que envolve hospedeiros vertebrados e invertebrados (Tyler et al., 2001). O ciclo de vida se inicia quando o inseto vetor *Triatominae* infectado libera formas tripomastigotas nas fezes perto do local da picada durante a sua alimentação de sangue. Estas formas então penetram no hospedeiro através da ferida ou pelas mucosas (López-Vélez et al., 2019). No hospedeiro vertebrado, as formas tripomastigotas invadem as células mais próximas ao local da inoculação, onde se diferenciam em formas amastigotas intracelulares, que se multiplicam por fissão binária (Bern et al., 2019). Após a multiplicação, as formas amastigotas se transformam novamente em formas tripomastigotas, e rompem a célula, indo para a corrente sanguínea (López-Vélez et al., 2019). A partir deste momento, se o hospedeiro vertebrado for picado pelo inseto vetor, os parasitos serão transmitidos ao inseto. No intestino do inseto vetor, o *T. cruzi* se transforma em epimastigotas, onde se multiplica e origina formas tripomastigotas, infectantes aos hospedeiros vertebrados (Bern et al., 2019).

Figura 1. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Imagem de Biblioteca de imagens do Centro de Controle e Prevenção de Doenças.



A Organização Mundial da Saúde estima que entre 8 e 10 milhões de pessoas no mundo todo estejam infectadas por *T. cruzi*, especialmente na América Latina, onde a doença é endêmica (Nunes et al., 2013). Nas últimas décadas, o perfil epidemiológico mudou em decorrência dos movimentos migratórios que levaram ao processo de urbanização e à globalização da doença (Teixeira et al., 2012). A doença de Chagas é frequentemente observada na população em idade produtiva, tais como os adultos jovens, e pode causar morte prematura e incapacidade substancial, levando a perdas econômicas significativas (Abuhab et al., 2013). As complicações cardíacas e gastrointestinais muitas vezes resultam na necessidade de terapia de longo prazo e procedimentos cirúrgicos, como colocação de marca-passo e desfibrilador cardíaco implantável e transplante cardíaco, aumentando os custos relacionados à doença (Mathers et al., 2007).

Clinicamente, a doença de Chagas apresenta uma fase aguda seguida de uma fase crônica que pode ser classificada como indeterminada, cardíaca ou gastrointestinal (Prata et al., 2001). A fase aguda da doença é caracterizada pela ocorrência de sintomas graves em cerca de 1% dos pacientes, que podem apresentar quadros de miocardite, derrame pericárdico ou meningoencefalite (Bern et al., 2011). A incidência de doença de Chagas aguda diminuiu substancialmente desde a quase interrupção da transmissão por vetores e por meio de transfusões de sangue na maioria dos países da América Latina, apesar dos casos agudos detectados recentemente devido ao consumo de alimentos contaminados, como o açaí. Casos agudos podem ocorrer ainda devido à reagudização da doença, como em pacientes crônicos que passam por regime de imunossupressão (Bern et al., 2012). Em pessoas imunocompetentes, o alto índice de parasitemia detectado na fase aguda é rapidamente controlado pelos mecanismos efetores imunes, resultando em níveis quase indetectáveis de *T. cruzi* no sangue e nos tecidos, à medida que o indivíduo infectado entra na fase crônica (de Meis et al., 2013).

Mesmo com a baixa parasitemia observada na fase crônica da doença, com o passar do tempo, cerca de 20 a 30% dos indivíduos infectados desenvolvem quadros de cardiomiopatia (Pérez-Molina et al., 2018). Estes quadros são caracterizados pela inflamação crônica em todas as câmaras do coração e danos ao sistema de condução e ao músculo cardíaco (Nunes et al., 2018). O desenvolvimento da forma gastrointestinal é bem menos frequente, no entanto, quando ocorre é caracterizada pela presença de manifestações esofágicas que variam de distúrbios de motilidade assintomáticos e a acalasia leve, à casos de megaesôfago e megacólon (El Gharib et al., 2021; Dantas et al., 2021). Em alguns pacientes, pode ocorrer a forma mista da doença de Chagas, onde existe a manifestação da forma cardíaca associada à forma gastrointestinal (Dutra et al., 2008). Apesar do conhecimento acumulado até o momento acerca da fisiopatologia e aspectos clínicos da doença de Chagas, ainda não se compreende completamente a alta complexibilidade da doença e a imprevisibilidade dos casos que se agravam ou permanecem assintomáticos (Pérez-Molina et al., 2018).

A infecção pode ser confirmada por testes sorológicos ou parasitológicos, eletrocardiograma e exames radiológicos do tórax, esôfago e cólon, sendo normalmente caracterizada pela ausência dos sinais e sintomas clínicos da doença (Marin-Neto et al., 2002). O tratamento disponível atualmente para a doença de Chagas consiste em terapia parasitária específica com os medicamentos Nifurtimox e benznidazol (Santos et al., 2021), que são os únicos medicamentos eficácia relevante contra o *T. cruzi* disponíveis há quase 50 anos, sendo indicados para pacientes com infecção aguda, crianças e pessoas recentemente infectadas, ou nos casos de reagudização (Andrade et al., 2011).

1.1.1. Aspectos imunológicos da doença de Chagas

Já foi bem estabelecido que a resposta imune e as manifestações imunopatológicas após a infecção pelo *T. cruzi* são dependentes, ao menos em parte, das características dos hospedeiros, da cepa do parasita, e da via de infecção (Zhang et al., 1999). A literatura relata a existência de uma diversidade de cepas de *T. cruzi* e que elas apresentam diferentes comportamentos biológicos, que estão diretamente associados à biologia molecular, e ao tropismo tecidual do parasito no hospedeiro (Zingales B., 2018). O *Trypanosoma cruzi* tem características genéticas muito diversas, por isso foi feita uma classificação através das linhagens genéticas sendo chamadas de, unidades de tipagem discreta (DTUs), denominadas: Tc I a Tc VI e Tc Bat (Zingales B., 2018). A DTU Tc I é predominante em infecções humanas na Amazônia, Região Andina, América Central e México, no entanto, as DTUs Tc II, Tc V e Tc VI são predominantes nas demais regiões da América do Sul (Brenière et al., 2016).

A cepa colombiana de *T. cruzi* foi isolada de um paciente em 1964, na Colômbia, e tipada como Biodeme Type III e identificado como zymodeme Z1 em 1983 por Andrade e cols, de acordo com seus padrões enzimáticos (Camandaroba et al., 2001). Essa cepa vem sendo amplamente utilizada em estudos sobre a cardiopatia chagásica, por apresentar tropismo pelos tecidos cardíaco e esquelético, e também por poder parasitar outros tecidos (Camandaroba et al., 2006). A cepa colombiana é capaz de gerar alterações teciduais como o aumento do infiltrado inflamatório, a destruição neuronal e

deposição de colágeno, além de participar da manutenção do processo inflamatório através de citocinas pró-inflamatórias (do Carmo Neto et al., 2022).

Embora qualquer célula nucleada possa ser parasitada, o parasito *T. cruzi* costuma ter preferência por alguns tipos celulares. As diferentes cepas de *T. cruzi* tem como característica o histotropismo, que classifica a predominância da multiplicação do parasita em um tecido, não excluindo a possibilidade de haver multiplicação em outros tecidos (Andrade et al., 1997). A depender de sua linhagem, o parasito *T. cruzi* apresenta tropismo por miócitos cardíacos, células periféricas do músculo esquelético e liso, células endoteliais, células dos sistemas nervoso, células do tecido adiposo, dentre outros (Machado et al., 2012).

Já está bem estabelecido que o *T. cruzi* persiste nos tecidos de camundongos de forma crônica, e que essa persistência tem uma importância na patogênese da doença de Chagas (Ferreira et al., 2011). Por exemplo, foi demonstrado que o *T. cruzi* parasita o tecido adiposo em camundongos (Shoemaker et al., 1974; Andrade et al., 1995), e pode persistir no tecido adiposo por um ano após a infecção em um modelo de camundongo (Combs et al., 2005).

Durante a infecção, o *T. cruzi* interage com vários receptores celulares tais com o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL) da célula hospedeira (LDLr) com o objetivo de facilitar a sua internalização e posterior fusão de seu vacúolo parasitóforo com o compartimento lisossômico da célula hospedeira (Caradonna et al., 2011). Receptores celulares atuam também no reconhecimento do parasito, como os receptores Toll-like (TLRs) e receptores de tirosina quinase e receptores de TGF (Machado et al., 2012).

Após a infecção, a primeira barreira de defesa contra o parasito é composta por elementos da imunidade inata como os macrófagos, que eliminam os parasitos após fagocitose ou permitem sua sobrevivência e proliferação (Camandaroba et al., 2006). Após a infecção de células, o *T. cruzi* começa a fase de multiplicação intracelular, onde o parasita libera muitos antígenos que vão ser responsáveis pela ativação da resposta imune do hospedeiro (Teixeira et al.,

2011). Devido à presença de TLR na superfície das células do sistema imune, acontece o reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), responsáveis pela indução da resposta imune (Gibaldi et al., 2020). A ativação via TLR de células como macrófagos e células dendríticas, desencadeiam a produção de moléculas pró-inflamatórias tais como as citocinas *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-8*, *IL-12*, o fator de necrose tumoral (TNF) e quimiocinas (Somoza et al., 2022). A destruição de células não infectadas pode estar relacionada aos fenômenos inflamatórios diretos ou aos mecanismos imunológicos que resultam na cardiopatia, megaloesôfago e megacólon (Prata., 2001; Teixeira et al., 2006).

Mesmo podendo ser um dos sítios de infecção, os macrófagos atuam no controle da infecção pelo *T. cruzi*, e juntamente com os neutrófilos, produzem *IL-12*, fazendo com que as células natural killer (NK) secretem o interferon-gama (*IFN- γ*), que irá aumentar a produção de TNF e óxido nítrico (NO), que serão muito importantes no controle da parasitemia durante a fase aguda da infecção (Acevedo et al., 2018).

De acordo com os estímulos que recebem, os macrófagos podem expressar distintos fenótipos de ativação e variados comportamentos durante a infecção (Cabral-Piccin et al., 2016). Os macrófagos M1 são ativados classicamente e tendem a produzir *IL-12* e NO para eliminar os patógenos intracelulares, enquanto macrófagos ativados alternativamente, pertencentes ao espectro M2, auxiliam no reparo tecidual, promovendo a infecção (Mills et al., 2000). Em modelo experimental, foi observado que os macrófagos obtidos do baço de camundongos durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi* liberam grandes quantidades de NO e, na ausência de outros estímulos, esses macrófagos acumulam altos níveis de mRNA de sintase de óxido nítrico induzível (iNOS) com secreção de *TNF- α* , *IL-6* e *IL-1 β* (Zanluqui et al., 2015).

As células T também atuam diretamente no processo de controle de infecções, sendo que as células T CD8 desempenham ação na eliminação das células que abrigam parasitas intracelulares (Tarleton R. L., 2015), enquanto as células T CD4 e CD8 produzem *IFN- γ* , responsável pela ativação dos macrófagos para conter a infecção (Dos Reis et al., 2007). Durante a infecção

por *T. cruzi*, os linfócitos podem sofrer apoptose, e isso afeta negativamente a expansão das células T, a resposta das células B, e diminui a capacidade de eliminação dos parasitos pelos macrófagos classicamente ativados (Cabral-Piccin et al., 2016). Além disso, a captação de células apoptóticas promove a infecção dentro dos macrófagos, por meio da produção de prostaglandina E-2 (PGE-2) e o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), sendo que essas características estão associadas aos macrófagos ativados alternativamente (M2) (Mills et al., 2000). Quando acontece o bloqueio da produção de PGE-2 ou a inibição do apoptose de linfócitos pelos inibidores de caspase, o crescimento do parasita *in vitro* e a parasitemia são reduzidos de forma significativa (Silva et al., 2007), evidenciando a importância destes elementos no controle do parasito. Porém, foi demonstrado que a infecção por *T. cruzi* tende a diminuir a resposta das células T em pacientes com infecção aguda (Bonney et al., 2019). O mecanismo de diminuição induzido pelo parasito associado à baixa expressão de receptores de *IL-2* (Passos et al., 2017). Em um estudo sobre células T feito em pacientes bolivianos que apresentavam infecção em fase aguda, foi observada uma diminuição acentuada na frequência de células T que expressava a região variável 5 (V β 5) do receptor de células T (TCR), no entanto, em pacientes em fase crônica, as células T que expressam V β 5 e TCR estavam altamente expandidas. Este evento pode ser observado tanto em PBMCs recém-isoladas e em PBMCs após a estimulação *in vitro* com antígenos do parasita (Costa et al., 2000).

A lesão tecidual decorrente da doença de Chagas aguda está relacionada à persistência de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias e ao aumento de linfócitos T CD4+ e CD8+ responsáveis pela produção de *IFN- γ* no sangue periférico, além da redução de células T reguladoras (Boscardin et al., 2010). No entanto, durante a fase crônica indeterminada, é possível perceber o aumento do número de células regulatórias e produção elevada de *IL-10*, que promovem a desativação de macrófagos e inibição dos efeitos das células T e NK (Pérez-Antón et al., 2018). É possível perceber que para controlar a infecção, deve haver um equilíbrio entre os mecanismos efetores contra o parasita e a

produção de mediadores que impeçam que essa resposta imune exacerbada ocasione o dano tecidual (Passos et al., 2017).

1.2. Células-tronco mesenquimais

As células-tronco são identificadas de acordo com duas características: a capacidade de se diferenciar em diferentes linhagens e a capacidade de auto renovação. Essas características podem ser encontradas tanto em células embrionárias, como em células adultas (Potten et al., 1990). Frequentemente, as células-tronco são classificadas de acordo com a multipotencialidade. De acordo com essa classificação, as células-tronco totipotentes são capazes de se dividir e se diferenciar em todos os tipos de célula, através da formação de estruturas embrionárias e extra-embrionárias (Zakrzewski et al., 2019). As células-tronco pluripotentes podem formar células de todas as camadas germinativas, mas não de estruturas extra-embrionárias, como a placenta (de Kretser D., 2007). As células-tronco multipotentes dispõem de um espectro de diferenciação mais estreito, podendo se especializar em células de linhagens celulares específicas, como as célula-tronco hematopoiéticas que podem se diferenciar em vários tipos de células sanguíneas (Zakrzewski et al., 2019). Por fim, as células-tronco unipotentes são capazes de se diferenciar em apenas um tipo celular, mas mantém a propriedade de auto renovação que as distingue das células não-tronco (Ding et al., 2011).

As células-tronco embrionárias humanas são oriundas da massa celular interna do blastocisto, responsável pelo desenvolvimento do feto durante o processo de embriogênese (Sukuyan et al., 1993). Essas células formam agregações que são chamadas de camadas germinativas: endoderme, mesoderme e ectoderme, e cada uma delas eventualmente dará origem a células e tecidos diferenciados do feto (Larijani et al., 2012). As células-tronco multipotentes podem ser encontradas em todo o organismo como células indiferenciadas, e suas principais características são a proliferação pela diferenciação em células especializadas sob certas condições fisiológicas (Larijani et al., 2012). O processo de especialização das células-tronco acontece por sinais externos como aqueles mediados por meio do contato físico entre

células, ou pela secreção de mediadores solúveis; a diferenciação das células-tronco pode ser controlada também por meio de sinais internos, controlados por genes (Zakrzewski et al., 2019). As células-tronco participam dos processos de reparo do corpo, através da formação de novas células, sendo que essa participação depende diretamente do órgão em que estão (Larijani et al., 2012). As células-tronco participam do processo regenerativo por meio da liberação de fatores solúveis também, como fatores de crescimento (Baraniak et al., 2010).

As células-tronco mesenquimais (CTMs) são células estromais que possuem a capacidade de auto renovação e também apresentam capacidade de se diferenciar em células de várias linhagens (Dennis et al., 2002). Elas podem ser obtidas a partir de vários tipos de tecidos, como cordão umbilical, medula óssea, tecido adiposo, entre outros (Ding et al., 2011). As CTMs foram identificadas como células-tronco residentes em quase todos os órgãos adultos (Mazini et al., 2020). Alguns estudos mostram que as CTMs se apresentam como pericitos que podem ser encontrados ao redor dos vasos sanguíneos, o que contribui para a compreensão de seu amplo potencial regenerativo em tecidos adultos (Corselli et al., 2013). Devido a sua facilidade de isolamento em alguns tipos de tecido, tais como o tecido adiposo e medula óssea, combinada com suas capacidades de auto renovação e multipotencialidade, as CTMs vem sendo consideradas como uma opção de tratamento promissora para diversas doenças (Sacchetti et al., 2007). As CTMs do tecido adiposo desempenham um papel no controle da inflamação tecidual e no processo de imunomodulação, através da adoção de um fenótipo imunorregulador em resposta à fatores inflamatórios como o *IFN- γ* , *IL-1 β* ou *TNF- α* , que serão secretados pelas células imunes ativadas (Hoogduijn et al., 2019). Quando essas células reconhecem padrões moleculares associados a patógenos, tais como o LPS, inicia-se a ativação de TLRs, que promoverá a expressão de citocinas inflamatórias como *TNF- α* (Baer et al., 2019).

Devido à presença de CTMs em uma grande gama de tecidos, ainda não existe um biomarcador único para a sua identificação. A fim de estabelecer alguns critérios mínimos para a caracterização de CTMs, foi estabelecido pela

Sociedade Internacional de Terapia Celular (International Society for Cellular Therapy) (Dominici et al., 2006) (figura 2), um conjunto de marcadores e características celulares. Estas incluem a capacidade de auto renovação, aderência ao plástico, potencial de diferenciação multipotente e a expressão de um conjunto característico de marcadores de superfície, como cluster de diferenciação (CD)73, CD90 e CD105, e uma baixa expressão de CD14, CD34, CD45 e antígeno leucocitário humano-DR (HLA-DR) (Pendleton et al., 2013).

Figura 2. Requisitos para caracterização das populações de CTMs segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular. Modificado de Dominici et al., 2006.



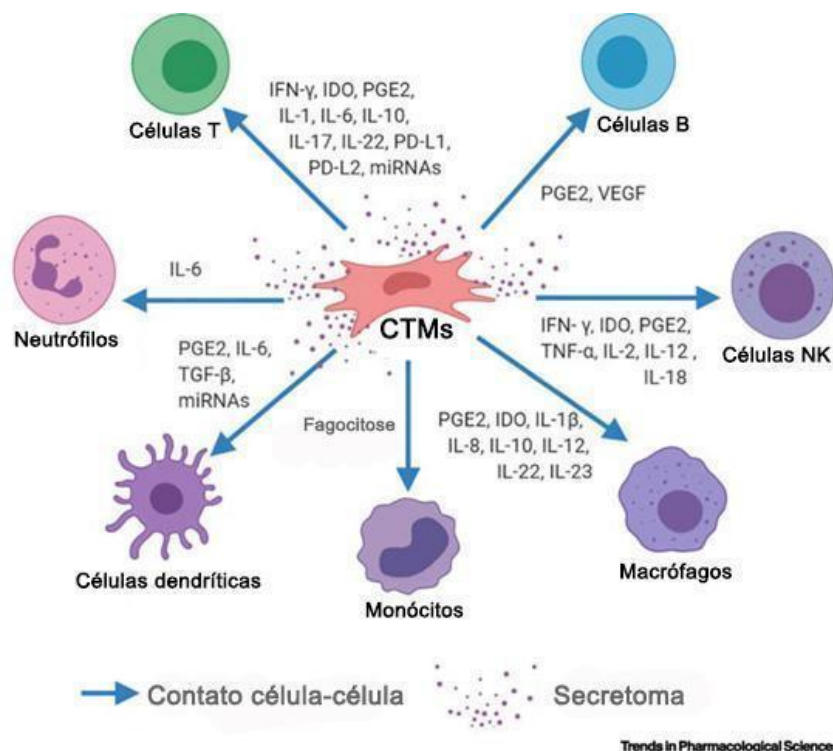
A qualidade da amostra de CTM é influenciada por muitos fatores, tais como a qualidade do isolamento e do cultivo, a idade do doador e as condições de saúde (Bruder et al., 1997). Vários estudos vêm mostrando o potencial das CTMs de se diferenciarem em múltiplas linhagens celulares, sendo que alguns estudos avaliaram o potencial de diferenciação adipogênico e osteogênico (Fujimura et al., 2005; Vishnubalaji et al., 2012), enquanto outros se concentraram apenas na capacidade de diferenciação adipogênica e condrogênica (Danisovic et al., 2009; Afizah et al., 2007; Schipper et al., 2008).

1.2.1. Mecanismos de imunorregulação pelas células-tronco mesenquimais

Dentre as diversas propriedades descritas até o momento para as CTMs, está sua capacidade de modular tanto a resposta imune inata quanto a adaptativa. De fato, as CTMs podem inibir a ativação de células dendríticas,

macrófagos pró-inflamatórios do tipo M1, células NK e células B e T (figura 3), enquanto induzem a geração de células com fenótipos anti-inflamatórios (Aggarwal et al., 2005). Devido a essa alta capacidade imunorreguladora, o potencial terapêutico das CTMs em distúrbios autoimunes e inflamatórios tem sido intensamente investigado em modelos experimentais de camundongos (Ghannam et al., 2010; González et al., 2009). A literatura apresenta resultados promissores em modelo experimental de artrite (Bouffi et al., 2010; González et al., 2009), diabetes (Moreira et al., 2017; Capilla-González et al., 2018; Mahmoud et al., 2019) e lúpus (Liu et al., 2018). Parte desses resultados já foram confirmados em ensaios clínicos, subsidiando o uso de CTMs para auxiliar no tratamento de doenças fibróticas e inflamatórias como a doença do enxerto contra o hospedeiro (Zhou et al., 2020), esclerose múltipla (He et al., 2021), diabetes tipo 1 (Boháčová et al., 2018), lúpus eritematoso sistêmico (Li et al., 2021), uveíte refratária (Yang et al., 2021), glomerulonefrite (Al Mushafi et al., 2021), dentre outros.

Figura 3. Interações imunomodulatórias entre as células-tronco mesenquimais e células imunes. As CTMs participam em funções imunomoduladoras por interações com células do sistema imune, como células T, células B, células NK, macrófagos, monócitos, células dendríticas e neutrófilos, pelas vias de contatos célula a célula (setas azuis) e por mediadores parácrinos (demonstrada pelo secretoma). Dentro do secretoma é possível encontrar uma gama de citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas, e suas funções imunomodulatórias variam de acordo com a fonte de CTMs. Imagem retirada de Song, Na et al., 2020.



As CTMs atuam na modulação do sistema imune inato e adaptativo através de mecanismos de interação como o contato célula-célula, que atua em conjunto com a secreção de fatores imunológicos solúveis (Kean et al., 2013). Através de moduladores específicos, como mediadores celulares lipídicos, citocinas e fatores de crescimento, as CTMs modulam as respostas inflamatórias e equilibram os perfis imunológicos (Wang et al., 2018). Além de moléculas solúveis, moléculas de adesão, e os antígenos do complexo de histocompatibilidade (HLA) são também relevantes para a indução do processo de imunossupressão pelas CTMs (Aboalola et al., 2017).

O secretoma da CTMs é formado por uma diversidade de fatores de crescimento, como o fator de crescimento de hepatócitos (*HGF*), fator de crescimento de fibroblastos (*FGF*) e fator de crescimento transformante- β 1 (*TGF- β 1*), citocinas, como *TNF- α* e IL-10, mediadores lipídicos como *PGE2*, enzimas como indoleamina-pirrol 2,3 - dioxigenase (*IDO*) e espécies reativas como NO, entre muitos outros que se unem para modular a função de células imunes (Li et al., 2017; Salgado et al., 2010). Esses fatores parácrinos são encontrados livres no ambiente extracelular ou encapsulados em vesículas

extracelulares. Neste contexto, foi demonstrado que vesículas extracelulares produzidas pelas CTMs atuam no aumento da geração de macrófagos M2 e de células T reguladoras, ao mesmo tempo que atuam na supressão da maturação de monócitos e da proliferação de células T e células B (Prockop et al., 2013; Bernardo et al., 2013).

As CTMs também atuam no processo de regulação do processo inflamatório e no reparo de células e tecidos danificados, através da adesão aos locais com inflamação ativa (Ren et al., 2008). A modulação da imunossupressão é potencializado quando as CTMs são estimuladas pela primeira vez por citocinas inflamatórias, tais como o *TNF* e interleucina- (*IL*) 1 (Abomaray et al., 2016). Além de responderem aos sinais das citocinas inflamatórias, as CTMs também produzem moléculas imunorreguladoras que atuam na mediação do processo de inflamação, sendo elas a *IDO* em humanos e *NO*, em camundongos (Su et al., 2014). Em reconhecimento à capacidade de imunomodulação do secretoma de CTMs, diferentes ensaios clínicos estão sendo realizados com o intuito de validar a utilização de secretomas de CTMs para tratar doenças imunes e pacientes com distúrbios imunológicos graves, incluindo doença de Crohn (Bai et al., 2012; Dalal et al., 2012) e COVID-19 (Sahu et al., 2021).

A interação entre as CTMs e diferentes células imunológicas vem sendo gradualmente elucidado. Por exemplo, foi demonstrado que, de acordo com o microambiente específico proveniente das CTMs, macrófagos podem ser polarizados no perfil M1 ou M2 (Glass et al., 2016). Estudos mostraram que a co-cultura de macrófagos com CTMs promove a indução de macrófagos M2, que atuam na atividade fagocítica, na liberação de *IL-10*, e também regulam negativamente os níveis de citocinas inflamatórias, como *IFN- γ* , *TNF- α* , *IL-1 β* , e *IL -12* (Zhang et al., 2010; Liu et al., 2015).

As CTMs também demonstraram a capacidade de inibir as respostas de células T, com o objetivo de se comunicar com células apresentadoras de antígenos através da regulação positiva da molécula-1, da adesão intercelular (*ICAM-1*) e da molécula-1 de adesão celular vascular (*VCAM-1*), moléculas com

atuação importante para a ativação de células T e para o processo de recrutamento de leucócitos para o local da inflamação (Ren et al., 2010).

1.2.2. Alterações funcionais de células-tronco mesenquimais em doenças sistêmicas

Inicialmente descritas como células responsáveis pela regeneração tecidual, as CTMs são atualmente consideradas componentes relevantes para uma ampla gama de processos fisiológicos, como hematopoese (Aqmasheh et al., 2017) e outros eventos de diferenciação celular, angiogênese, controle do stress oxidativo, dentre outros (Vizoso et al., 2019). Conseqüentemente, quando apresentam disfunções, as CTMs contribuem para processos patológicos. De fato, alterações em CTMs já foram descritas em doenças como lúpus, fibrose pulmonar idiopática, diabetes, psoríase, artrite reumatoide, síndromes mielodisplásicas e também ao longo do envelhecimento (Vizoso et al., 2019).

Quando em contato com patógenos, as CTMs também apresentam alterações funcionais. Quando em contato com patógenos, as CTMs podem ter sua capacidade imunorregulatória comprometida como observado após a infecção de CTMs por citomegalovírus (Meisel et al., 2014), ou no caso de patógenos reconhecidos por TLR3 (Najar et al., 2017). Porém, a investigação da interação de CTMs com diferentes patógenos ainda é incipiente, justificando novos trabalhos e contribuindo para a concepção de que as CTMs constituem não apenas ferramentas terapêuticas, mas parte do processo fisiopatológico em diferentes doenças.

Considerando as alterações teciduais locais e sistêmicas observadas na doença de Chagas, o presente trabalho tem como objetivo investigar como as populações de CTMs obtidas do tecido adiposo de doadores humanos saudáveis se comportam durante a infecção pelo parasito hemoflagelado *T. cruzi*, e se essa infecção altera a capacidade imunomodulatória parácrina dessas células, por meio de ensaios com macrófagos e células mononucleadas do sangue periférico (PBMCs).

2. Justificativa

A fisiopatologia da doença de Chagas é complexa e ainda não foi completamente elucidada. Este fato compromete a proposição de novos tratamentos efetivos para a doença, como recentemente observado nas tentativas frustradas de terapia celular. Entre as alterações já descritas para a doença estão a disfunção da medula óssea e do tecido adiposo, culminando em alteração da resposta imunológica, elemento relevante no combate ao parasita e controle da doença. Notoriamente, as CTMs residem nestes tecidos, onde possuem papel relevante no controle da geração e regulação de células imunológicas. Porém, até o momento não há nenhum tipo de investigação sobre o que ocorre com as populações endógenas de CTMs do hospedeiro mamífero infectado por *T. cruzi*. Por conseguinte, este é o objetivo do presente trabalho: avaliar o efeito do parasitismo pela cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi* sobre a capacidade imunomodulatória de CTMs por meio parácrino. Esta avaliação pode contribuir para a compreensão de mais um aspecto da fisiopatologia da doença de Chagas e também contribuir para a otimização de novas tentativas de terapia celular para a doença.

3. Hipótese

Pergunta: As CTMs humanas têm sua capacidade imunomodulatória parácrina alterada pelo parasitismo por *Trypanosoma cruzi*?

Hipótese: Hipotetiza-se que as CTMs tenham as suas funções alteradas pela infecção por *T. cruzi*.

4. Objetivos

4.1. Objetivo geral

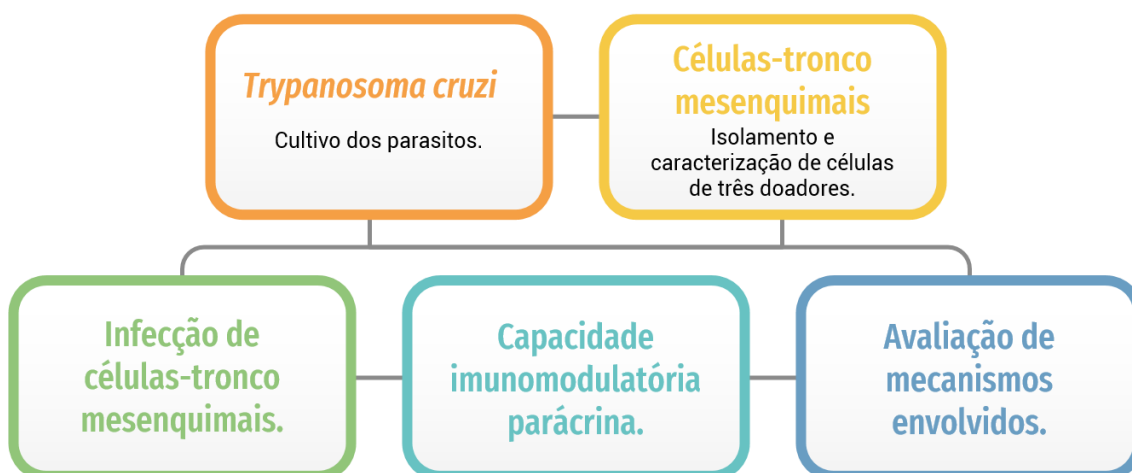
Avaliar o efeito da infecção por *Trypanosoma cruzi* sobre a capacidade imunomodulatória parácrina de CTMs.

4.2. Objetivos específicos

1. Isolar e caracterizar CTMs humanas do tecido adiposo.
2. Realizar a infecção de CTMs por formas tripomastigotas da cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi* e determinar a carga parasitária.
3. Avaliar a capacidade imunomodulatória parácrina das CTMs infectadas ou não por *T. cruzi* sobre macrófagos e PBMCs humanos.

5. Metodologia

5.1. Fluxograma Geral



5.2. Preparação de meio de cultivo celular DMEM LOW GLUCOSE

O meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium low glucose* (DMEM; Sigma-Aldrich) foi ressuspendido em água destilada e suplementado com 1 mL de gentamicina (Novafarm) na concentração de 100 IU/L e 3,7 g de bicarbonato de sódio.

O pH foi ajustado para 7.4 e o meio foi então filtrado em sistema de filtração a vácuo, com membrana de 0,22 μm (Corning) e aliquotado. A esterilidade do meio transferido para as garrafas foi testada colocando uma alíquota de meio em uma estufa a 37 °C por 24 horas. Caso o meio não estivesse contaminado, ele foi então suplementado com 10% v.v. de soro fetal bovino (SFB, Gibco).

5.3. Cultivo de *Trypanosoma cruzi*

As formas epimastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi* foram provenientes do banco de células disponível no laboratório interdisciplinar de biociências da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, mantidas a 25 °C em meio Lit suplementado com 10% de SFB, 100 IU/mL de penicilina e 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina (Gibco), e os repiques foram feitos a cada 15 dias. Para a obtenção de formas tripomastigotas, foi feita a cultura de células da

linhagem L6, que foram mantidas em meio DMEM suplementado com 5% v.v. SFB (Gibco) e incubadas a 37 °C e 5% CO₂ por 3 dias, quando foram infectadas pelas formas epimastigotas de *T. cruzi*. Após 7 dias, o sobrenadante foi coletado e centrifugado por 5 minutos a 300 g para a obtenção do pellet (Dumoulin et al., 2018).

5.4. Isolamento, cultivo e caracterização de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo

As CTMs humanas foram isoladas a partir do tecido adiposo subcutâneo abdominal de doadores saudáveis (n=3) que passaram por cirurgia de lipoaspiração. A obtenção das amostras de tecido adiposo ocorreu após a assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido, conforme projeto aprovado pelo comitê de ética de pesquisa da Universidade de Brasília (protocolo número 30175020.00000.5558).

As CTMs foram isoladas conforme de Carvalho JL et al., 2015. O tecido adiposo coletado foi lavado com tampão fosfato-salino (PBS) 0,15 M suplementado com uma solução de penicilina e estreptomicina (Gibco) nas concentrações finais de 100 U/mL e 100 µg/mL, respectivamente. Após a lavagem, o tecido adiposo foi então digerido por 1 hora a 37° C, em solução de colagenase do tipo 2 (Gibco), na concentração de 0,01% p.v. Ao final da digestão, a enzima foi inativada por meio da adição do mesmo volume de SFB (Gibco), e a amostra centrifugada para a obtenção e plaqueamento das células do pellet, descrito como a fração vascular estromal do tecido adiposo. O cultivo das células da fração vascular estromal foi feito em DMEM low glucose (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% v.v. de SFB (Gibco), a 37 °C e 5% CO₂. As células foram expandidas até a 3.^a passagem e criopreservadas em nitrogênio líquido até a realização dos experimentos. As células isoladas de cada doador foram aleatoriamente denominadas CTM 1, 2 e 3.

5.4.1. Criopreservação e descongelamento

As CTMs foram expandidas até a 3.^a passagem e criopreservadas em nitrogênio líquido até o uso. Para tanto, ao atingir 70-80% de confluência, as células foram coletadas por meio de tripsinização, contadas e ressuspensas em solução composta por 90% v.v. SFB (Gibco) e 10% v.v. de dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich). O congelamento foi feito em criotubos (Millipore), utilizando uma placa de congelamento lento (ThermoFisher Scientific) a -80 °C e, posteriormente, as células foram armazenadas em tanque de nitrogênio.

Para o descongelamento, o conteúdo do criotubo foi descongelado em banho-maria a 37 °C; diluído em 3 mL de meio de cultura e centrifugado por 3 minutos a 189 g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet de células ressuspensado em 1 mL de meio de cultura. As células foram contadas e 200.000 células foram plaqueadas em cada garrafa de cultura de 75 cm² (Kasvi). Para a contagem, a solução contendo as células foi diluída na proporção de 1:5 com solução 0,4% de Azul de Tripán (Gibco) e aplicada na câmara de Neubauer para contagem das células nos quatro quadrantes exteriores. As CTMs foram cultivadas em meio DMEM low glucose (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% v.v. de SFB (Gibco) a 37 °C e 5% CO₂. CTMs de passagem 3 a 5 foram usadas para os experimentos descritos a seguir.

5.4.2. Troca de meio e passagem

A troca de meio das células foi feita a cada 2 ou 3 dias. A quantidade de meio usada para manutenção foi: Garrafa 75 cm² (Kasvi) 10-15 mL; Placa de 6 poços 2 mL/poço (Kasvi). Ao atingir confluência de aproximadamente 80%, as células foram lavadas com PBS (6 mL para garrafa de 75 cm²) e incubadas com Tripsina (Prolab) por 3 minutos a 37 °C. Em seguida, foi adicionado meio DMEM/SFB e o tubo foi centrifugado por 5 minutos a 256 g. O pellet de células foi ressuspensado em 1 mL de meio de cultura.

5.4.3. Caracterização das células-tronco mesenquimais

A caracterização das CTMs foi feita seguindo as recomendações da Sociedade Internacional de Terapia Celular e Gênica (Dominici et al., 2006), conforme descrito a seguir.

5.4.3.1. Adesão ao plástico

A adesão ao plástico foi verificada por meio de observação em microscópio invertido Olympus CKX 41, após o isolamento e durante todo o período de cultivo das células.

5.4.3.2. Perfil imunofenotípico

A imunofenotipagem de todas as células foi realizada com o *Human MSC Analysis Kit* (BD Stemflow™), seguindo as recomendações do fabricante, e a leitura do sinal de fluorescência emitido pelas células marcadas ocorreu no equipamento FACSCalibur™ (BD). Os marcadores analisados foram CD44; CD73; CD90 e CD105, enquanto o coquetel negativo continha anticorpos para CD45; CD34; CD11b; CD19 e HLA-DR. Foram adquiridos 10.000 eventos em cada leitura. Os dados foram analisados no *software* FlowJo (Dominici et al., 2006).

5.4.3.3. Diferenciação Celular

Após descongelamento e expansão, células dos três doadores foram diferenciadas em condrócitos e adipócitos. Para todas as diferenciações, foram plaqueadas 1×10^4 células por poço em placa de 6 poços, mantidas em meio de cultura DMEM low glucose (Sigma) acrescido de 10% v.v. SFB (Gibco) até a confluência de aproximadamente 80%. A partir da obtenção da confluência, foi iniciado o cultivo com meios específicos para as diferenciações. A troca de meio foi feita a cada 2 dias. Células mantidas em meio basal foram mantidas como controle negativo de diferenciação (Dominici et al., 2006).

5.4.3.4. Meios de diferenciação celular

5.4.3.4.1. Condrogênico

Para diferenciação condrogênica foi utilizado o meio comercial *StemPro™ Chondrogenesis Differentiation Kit* (ThermoFisher Scientific), gentilmente cedido pelo professor Robert Pogue, da Universidade Católica de Brasília. O meio comercial foi diluído (1:1) em meio DMEM low glucose (Sigma-Aldrich) sem adição de SFB (Gibco). A diferenciação durou 21 dias.

5.4.3.4.2. Adipogênico

Ao meio de cultivo base, DMEM low glucose (Sigma-Aldrich), suplementado com 10% SFB (Gibco) e gentamicina (Novafarm); foi adicionado: Dexametasona (Teuto, medicamento genérico, comprimidos de 4 mg) concentração de 100 uM/L; Indometacina Cristalina (Sigma-Aldrich) concentração de 71 mg/L; isobutil-metilxantina (3-Isobutyl-1-methylxanthine, ou IBMX, ≥99% HPLC), Sigma-Aldrich) concentração 111,1 mg/L e Insulina (Novolin, Nordisk, medicamento injetável, concentração de 100 UI/mL). A diferenciação durou 21 dias.

5.4.4. Coloração de células diferenciadas

5.4.4.1. Condrogênica

Para verificação da condrogênese, após 21 dias de indução de diferenciação, as células foram lavadas com PBS e fixadas por 30 minutos em solução de formalina 10%. Após a fixação foram novamente lavadas com PBS e mantidas em solução 1% de azul de alcian (do inglês, *Alcian Blue* - Sigma-Aldrich) diluído em 0,1 N HCL por 30 minutos. As células coradas foram então lavadas três vezes com 0,1 N HCL e mantidas em PBS (Ullah et al., 2012).

5.4.4.2. Adipogênica

Para verificação da adipogênese, após 21 dias de indução de diferenciação, as células foram lavadas com PBS e fixadas por 30 minutos em solução de formalina 10%. Em seguida as células foram lavadas com água destilada e mantidas em isopropanol 60% por 5 minutos. O isopropanol foi retirado e adicionou-se 2 mL da solução de uso de *Oil Red* (Sigma-Aldrich) por 5 minutos. As células foram lavadas com água destilada. Foi adicionado 2 mL de hematoxilina por 1 minuto. Após a retirada da hematoxilina, as células foram lavadas três vezes com PBS e mantidas em PBS (Fink et al., 2011).

5.4.5. Capacidade proliferativa

As CTMs foram expandidas em garrafas de cultura T75 (Kasvi) com meio de cultura basal DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% v.v. de SFB (Gibco). Foram plaqueadas 2×10^5 células por garrafa e a avaliação da capacidade proliferativa foi realizada por meio de contagem de células.

5.4.6. Avaliação da expressão gênica

As CTMs 1, 2 e 3 foram avaliadas quanto à expressão basal dos genes gliceraldeído fosfato desidrogenase (*GAPDH*), interleucina 10 (*IL-10*), indoleamina-pirrol 2,3-dioxigenase (*IDO*), gene 6 induzível por fator de necrose tumoral (*TSG 6*) e fator de crescimento transformador beta (*TGF-β*), por meio de qRT-PCR, realizada conforme descrito no item 5.8.2.

5.5. Infecção de células-tronco mesenquimais com *T. cruzi*

As CTMs 1, 2 e 3 foram cultivadas em garrafas T75 (Kasvi) com DMEM low glucose (Sigma-Aldrich), suplementado com 10% v.v. de SFB (Gibco). As células foram infectadas por formas epimastigotas da cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi*, em duas concentrações diferentes, sendo 1:1 e 1:5 (CTMs: parasitos) e mantidas por 72 h a 37 °C e 5% CO₂. As células de cada doador foram consideradas como uma replicata biológica. Após a visualização da infecção das células pelos parasitos, foi iniciada a troca de meio DMEM low glucose (Sigma-Aldrich), suplementado com 5% v.v. SFB (Gibco) a cada 2 ou 3 dias.

5.6. Preparo do meio condicionado de CTMs infectadas ou não por *T. cruzi*

O meio utilizado para o cultivo de CTMs foi coletado 48 hs após a troca de meio feita no 5.º dia de infecção por *T. cruzi* ou em células não infectadas como controle. Os meios coletados foram centrifugados por 3 minutos a 189 g para a remoção de parasitos. Posteriormente, os meios coletados foram filtrados em membrana de 0,22 µm e congelados até o uso.

5.7. Determinação da carga parasitária

A carga parasitária foi determinada por meio de PCR em tempo real (ou PCR quantitativa, qPCR) com o kit *Lumina Ct Sybr Green qPCR ReadyMix* (Sigma) com CTM de 3 doadores, infectadas e não infectadas por *T. cruzi* para a avaliação da expressão do gene Tc40 (Rose et al., 2020), conforme foi descrito no item 5.9.6.

5.8. Ensaio de ativação e polarização M1/M2 em macrófagos da linhagem U937 tratados com sobrenadante de CTM infectadas ou não por *T. cruzi*

As células de linfoma U937 foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro e mantidas em meio RPMI 1640 (Invitrogen®) com adição de 10% v.v. de SFB (Gibco), a 37 °C e 5% de CO₂. Para os experimentos, as células foram plaqueadas e tratadas com 10 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma-Aldrich) em placa de 96 poços em uma densidade de 10⁵ células / poço por 24 horas, seguindo protocolo amplamente padronizado na literatura (Song et al., 2015; Prasad et al., 2020; Yang et al., 2017). Após 24h, foi adicionado, de acordo com o grupo experimental, o sobrenadante de CTMs infectadas ou não infectadas diluído 1:1 em RPMI/SFB, além de LPS na concentração de 0,5 µg/mL. As células foram então incubadas por mais 24 h e o sobrenadante coletado para a avaliação da produção de óxido nítrico (Green et al., 1982).

5.8.1. Quantificação da produção de Óxido Nítrico

O método de Griess foi usado para quantificar a produção de óxido nítrico (NO). Foram adicionados 20 µl de reagente de Griess, que foi preparado com 0,05 g de sulfanilamida a 1% e N-(1-naftil) etilenodiamina dihidrocloridrato à 0,2% dissolvido em ácido fosfórico à 5%, dissolvidos em 25 mL de água destilada. A concentração restante de nitrito foi determinada a 540 nm. Os resultados foram expressos como uma porcentagem do nitrito gerado, estabelecida por meio da realização de uma curva de diluição usando nitrito de sódio como padrão (Green et al., 1982).

5.8.2. Avaliação da expressão gênica

A expressão dos genes *GAPDH* que foi usado como controle, os genes de polarização M1: *IL-1β* e *TNF-α* e o gene de polarização M2: *IL-10* foi avaliada em macrófagos infectados ou controle, estimulados com LPS ou não, por meio de qRT-PCR, conforme descrito no item 5.9.6.

5.9. Ensaio de ativação de linfócitos T tratados com sobrenadante de CTMs infectadas ou não por *T. cruzi*

Foi feito cultivo de células mononucleares de sangue periférico (*peripheral blood mononuclear cells* - PBMCs) seguida de ativação com Fitohemaglutinina (*phytohemagglutinin* - PHA, 5 µg/mL) (Hearing et al., 1999; Lin et al., 2018), e avaliação de proliferação através da marcação dos PBMCs por carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE) (Serejo et al., 2019).

5.9.1. Isolamento de células polimorfonucleares do sangue periférico

Foi feita a coleta de sangue periférico de 3 doadores em 3 tubos com EDTA, com volume total de aproximadamente 10 mL. Após a coleta de sangue anticoagulado, foi feita uma diluição com PBS. Em um novo tubo, 3 mL de Ficoll (Sigma-Aldrich) foram adicionados a 8 mL de sangue diluído 1:2 em PBS, seguido de centrifugação por 30 a 40 minutos (sem frenagem). Após, as PBMCs foram transferidas para um novo tubo e uma lavagem com solução tampão foi feita. Para remover as plaquetas, após a lavagem, foi necessário realizar mais uma centrifugação a 200 g e remover o sobrenadante (Hearing et al., 1999; Lin et al., 2018).

5.9.2. Ensaio de proliferação de PBMCs

As PBMCs de 3 doadores foram ativadas por PHA (Sigma-Aldrich, 5 µg/mL) (Hearing et al. 1999; Lin et al. 2018), seguido de avaliação de proliferação através da marcação por CFSE com concentração de 2,5 µM de CFSE por poço em 100 uL de meio RPMI 10% v.v. de SFB acrescido de 5 µg/mL PHA (Lange-Consiglio et al., 2020). A leitura do sinal de fluorescência emitido pelas células marcadas CFSE e anticorpo anti-CD3 ocorreu com a aquisição de 10.000 eventos no Citômetro FACSCalibur utilizando os canais de FL1 (CFSE-FITC) e FL4 (anti-CD3). Os dados foram analisados no software FlowJo (Serejo et al., 2019).

5.9.3. Extração de RNA e qRT-PCR

RNA total foi obtido de amostras de *T. cruzi* da cepa colombiana, CTMs, U937 e PBMCs. Para tanto, ao pellet de 1 milhão de células foi adicionado 1 mL de TRIzol™. As amostras foram vortexadas e mantidas à temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugadas a 494g por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, e adicionado 200 µL de clorofórmio (Sigma-Aldrich). As amostras foram vortexadas novamente e mantidas à temperatura

ambiente por 10 minutos, em seguida centrifugadas a 4 °C, a 7168 g por 20 minutos. Após a centrifugação, a fase aquosa (de cima) foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL, e adicionado 3 µL de glycoblu (Invitrogen) e 500 µL de isopropanol (Sigma-Aldrich). A mistura foi vortexada e incubada no gelo por 10 minutos. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 16128 g por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Então, 1 mL de etanol 70% gelado foi adicionado ao pellet, e o tubo foi centrifugado a 16128 g por 5 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado; o pellet de RNA foi mantido à temperatura ambiente até secar e por fim as amostras foram ressuspensas em 11 µL de água RNase free.

5.9.4. Quantificação de RNA

O RNA foi quantificado no equipamento Qubit® (Invitrogen). Para cada quantificação, 1 µL de amostra de RNA foi utilizado.

5.9.5. Síntese de DNA complementar

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 500 ng de RNA total, em um volume de 10 µL (completado com água RNase free, se necessário). Ao RNA, foi adicionado 10 µL do mix preparado com o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*® (Applied Biosystems). Com este kit, para cada amostra a ser sintetizada em cDNA, utilizou-se: 4,2 µL de água RNase free; 2 µL do Buffer RT 10X; 0,8 µL do mix de dNTP 25X; 2 µL de Random Primers RT 10X e 1 µL de MultiScribe™ Reverse Transcriptase. As amostras, em volume final de 20 µL, foram submetidas ao seguinte ciclo de temperatura em um termociclador: 10 minutos a 25 °C; 120 minutos a 37 °C; 5 minutos a 85 °C, 4 °C e armazenadas em freezer a -20 °C até o uso.

5.9.6. PCR em tempo real

A análise de expressão gênica foi realizada por PCR em tempo real com o kit Lumina Ct Sybr Green qPCR ReadyMix (Sigma-Aldrich). Com este kit, para cada amostra utilizou-se: 1,9 µL de água RNase free; 5 µL do Lumina S.G; 0,5 µL do Primer R; 0,5 µL do Primer F, 0,1 µL de Rox e 2 µL de cDNA. As amostras, em volume final de 10 µL, foram submetidas ao seguinte ciclo de temperatura no

equipamento Step One: 10 minutos a 25 °C; 120 minutos a 37 °C; 5 minutos a 85 °C e 4 °C. A expressão dos seguintes genes foi avaliada: *GAPDH*; *IFN-γ*, *TNF-α*; *IL-10*, *TGF-β*; *IL-1β*, *Tc40*, *IDO* e *TSG-6*, e os iniciadores utilizados são apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Sequência de iniciadores.

Gene	Primer Foward (5'- 3')	Primer Reverse (5'- 3')
<i>GAPDH</i>	ACATCGCTCAGACACCATG	TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG
<i>IDO</i>	GGGAAGCTTATGACGCCTGT	CTGGCTTGCAGGAATCAGGA,
<i>IL-10</i>	GGCACCCAGTCTGAGAACAG	ACTCTGCTGAAGGCATCTCG
<i>IL-1β</i>	ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA	GTCGGAGATTCGTAGCTGGA
<i>INF-γ</i>	ACTGTCGCCAGCAGCTAAAA	TATTGCAGGCAGGACAACCA
<i>Tc40</i>	TGCGAAGACGAGGAGTACAA	GCCACACACGAGCACTTAAA
<i>TGF-B1</i>	TGACACAGAGATCCGCAGTC	GCTGTATTTAAGGACACCGTGC
<i>TSG-6</i>	CCCAGGTTGCTTGGCTGATT	GGACCCATACGTACCTTCCC
<i>TNF-α</i>	CACAGTGAAGTGCTGGCAAC	GATCAAAGCTGTAGGCCCCA

5.10. Análise de dados

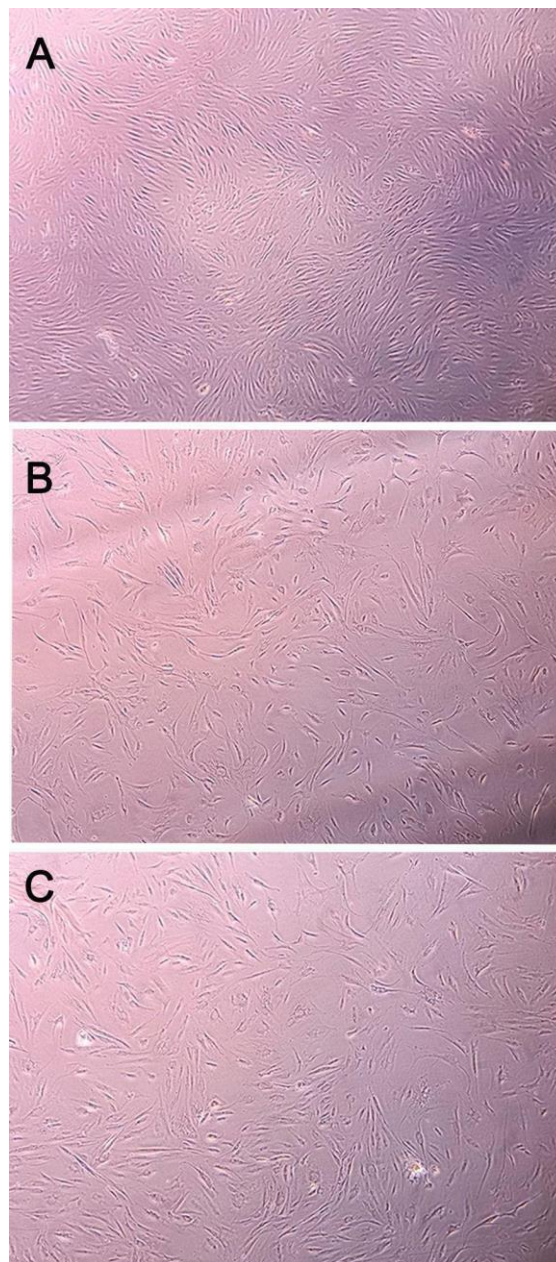
A análise dos dados foi feita através do software GraphPad Prism 8.0.2. Para a comparação entre os dados de produção de NO por macrófagos e proliferação de linfócitos T, os dados foram analisados de forma conjunta através do teste T. Para os dados analisados de forma individual apenas análise qualitativa foi feita.

6. Resultados

6.1. Isolamento e caracterização das células-tronco-mesenquimais

As CTMs isoladas a partir da doação de tecido adiposo de três doadores saudáveis foram capazes de aderir ao plástico durante o processo de cultivo e apresentaram morfologia fibroblastoide (Figura 4).

Figura 4: Cultivo de células-tronco mesenquimais (CTMs) de 3 doadores em meio DMEM suplementado com 10% v.v. de SFB, visualizadas em microscópio invertido, sendo: (A) CTM 1, (B) CTM 2 e (C) CTM 3. Imagem feita em objetiva de 5x.



A caracterização do perfil imunofenotípico foi feita através da análise da expressão dos marcadores de superfície CD44; CD73; CD90 e CD140 que foram analisados de forma individual (Tabela 2, Figura 5), e dos marcadores CD11b; CD19; CD34; CD45 e HLA-DR, que foram analisados utilizando-se um pool com todos os anticorpos contra esses marcadores (Tabela 3, Figura 6). Os marcadores de superfície que foram analisados de forma individual, são considerados marcadores positivos de CTMs pela Sociedade Internacional de Terapia Celular. Os marcadores que foram analisados em pool são considerados como marcadores negativos para CTMs, pois são indicativos de contaminação por células de linhagens hematopoiéticas. A tabela 2 apresenta os dados relativos à porcentagem dos níveis de expressão dos marcadores positivos de CTMs. O doador 2 de CTM apresentou um nível de expressão mais baixo para o marcador CD90 em relação aos outros doadores. Os demais marcadores apresentaram uma expressão semelhante entre os doadores, permanecendo sempre em níveis acima de 90%. A tabela 3 apresenta os dados relativos à porcentagem dos níveis de expressão do coquetel negativo que foi feito em pool. Apenas as CTM 1 apresentaram nível de positividade levemente superior ao preconizado pela Sociedade Internacional de Terapia Celular.

Tabela 2. Dados relativos à expressão de marcadores positivos para CTMs, em porcentagem.

	CD44	CD73	CD90	CD105
CTM 1	100%	100%	100%	95,2%
CTM 2	92,2%	98,8%	63,6%	96,3%
CTM 3	99,9%	99,9%	99,9%	99,9%

Tabela 3. Dados relativos à expressão de marcadores negativos para CTMs, em porcentagem.

	CD11b, CD19, CD34, CD45 e HLA-DR
CTM 1	7,38%
CTM 2	0,12%
CTM 3	1,32%

Os valores acima de 95% para os marcadores positivos e abaixo de 5% para os marcadores negativos indicam o sucesso no isolamento de populações celulares enriquecidas de CTMs. No entanto, foi possível observar diferenças nos níveis de expressão das proteínas avaliadas entre as amostras biológicas.

Figura 5: Histogramas representativos dos marcadores positivos CD44; CD73; CD90 e CD140 em CTMs isoladas de três doadores. A linha preta pontilhada representa o controle de isotipo. A cor azul representa o nível de positividade para cada um dos marcadores avaliados.

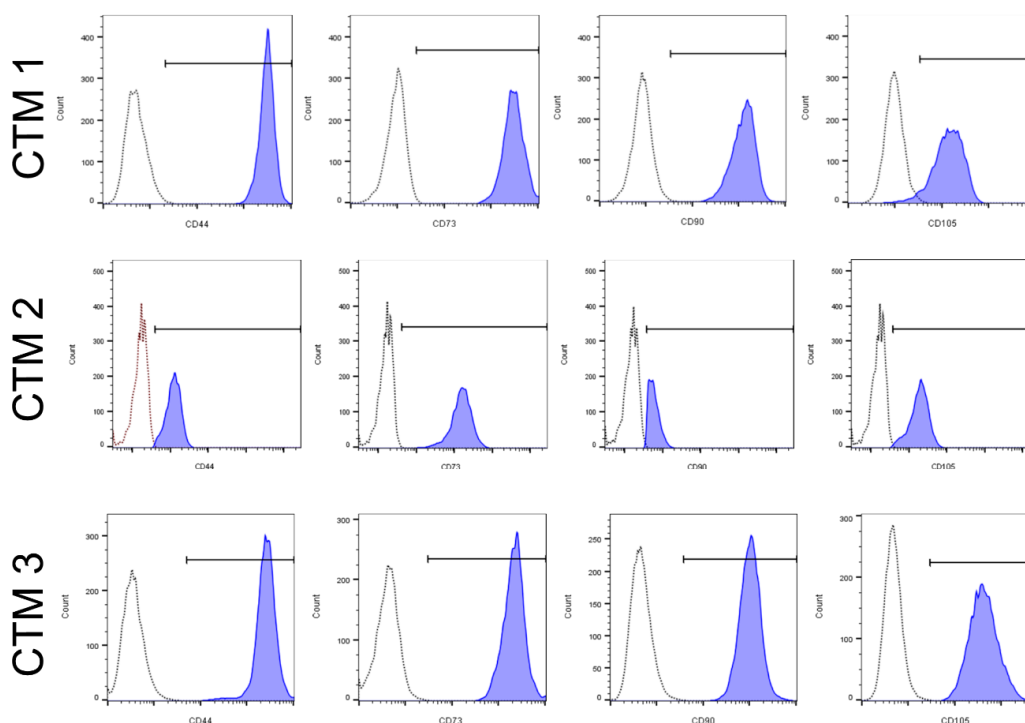
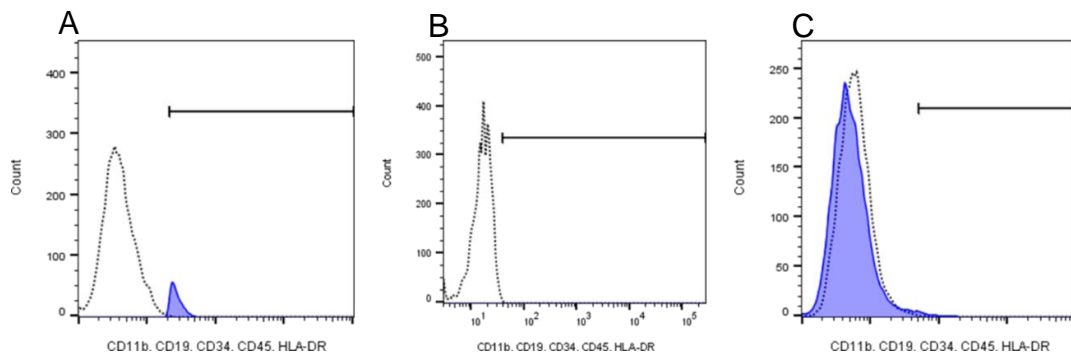


Figura 6: Histogramas representativos dos marcadores negativos CD11b; CD19; CD34; CD45 e HLA-DR em CTMs isoladas de três doadores. A avaliação da expressão destes marcadores foi feita com pool de anticorpos, nas amostras (A) CTM 1, (B) CTM 2 e (C) CTM 3. A linha preta pontilhada representa o controle de isotipo (controle negativo de marcação). A cor azul representa o nível de positividade para os marcadores avaliados.



Foi possível confirmar o potencial de diferenciação multipotente das CTMs isoladas através do ensaio de diferenciação em adipócitos e condrócitos (Figura 7 e 8). A capacidade de diferenciação foi verificada por meio de cultivo em diferentes meios de indução. As diferenciações adipogênica e condrogênica duraram 21 dias, período após o qual as células foram fixadas e coradas com corantes específicos para a detecção de cada tipo celular. Nas amostras induzidas à diferenciação adipogênica (Figura 7), foi possível visualizar acúmulo intracelular de lipídios de forma nítida em todos os grupos estimulados à diferenciação. Por outro lado, as células mantidas em meio basal não apresentaram acúmulo lipídico. Nas amostras induzidas à diferenciação condrogênica (Figura 8), foi possível realizar a visualização do acúmulo de matriz extracelular rica em glicosaminoglicanas nos grupos induzidos à diferenciação, ao contrário das células mantidas em meio de cultivo basal.

Figura 7. Diferenciação adipogênica de células-tronco mesenquimais (CTMs). As CTMs foram diferenciadas pelo período de 21 dias, quando foram coradas por meio de coloração de Oil Red. À esquerda, são apresentadas imagens representativas de células mantidas em meio de cultura basal, visualizadas em objetiva de 5x, sendo (A) CTM 1; (C) CTM 2 e (E) CTM 3. À direita, são apresentadas imagens representativas de células do mesmo doador mantidas em meio de diferenciação adipogênica, visualizadas em objetiva de 10x, sendo (B) CTM 1; (D) CTM 2 e (F) CTM 3.

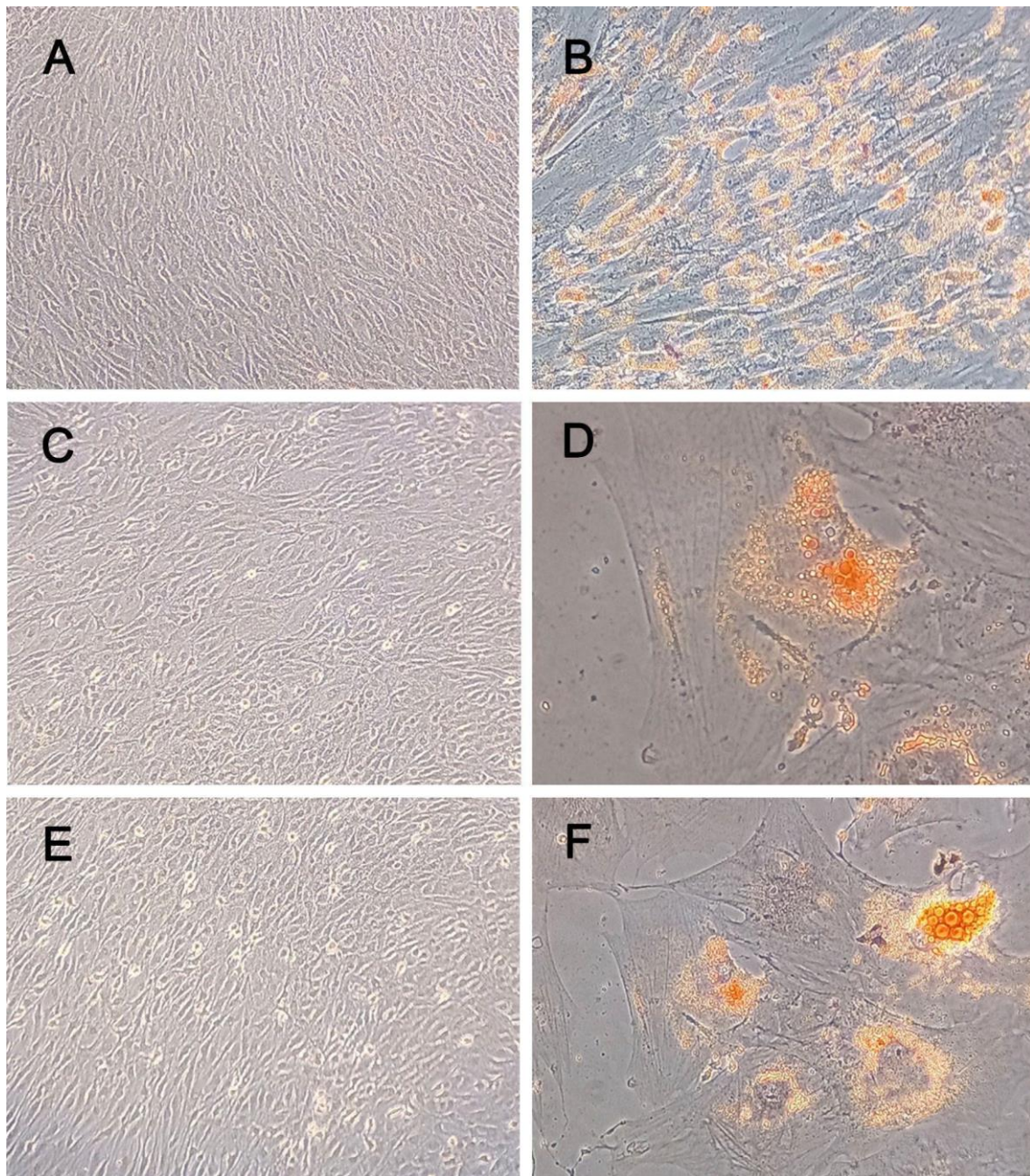
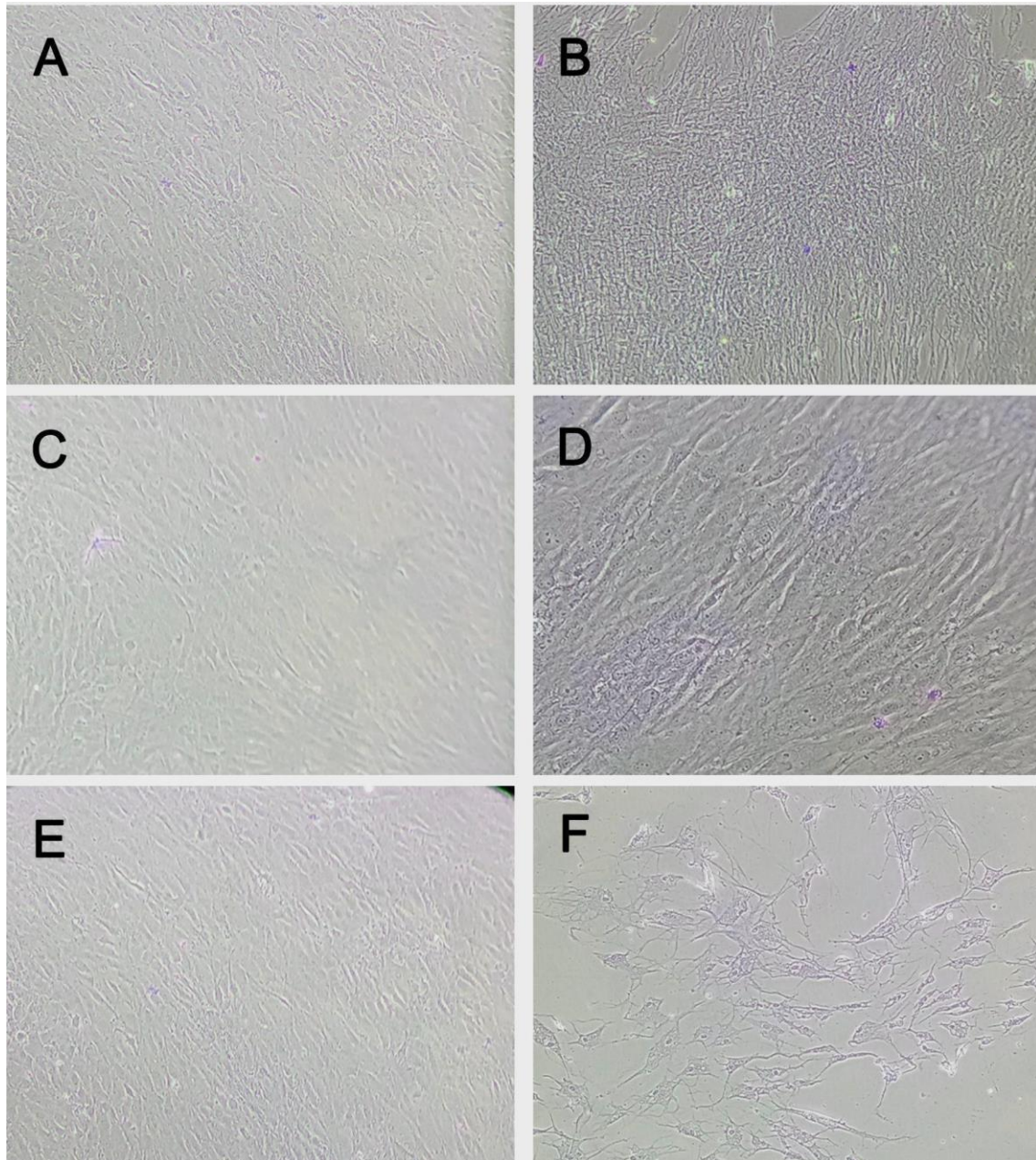


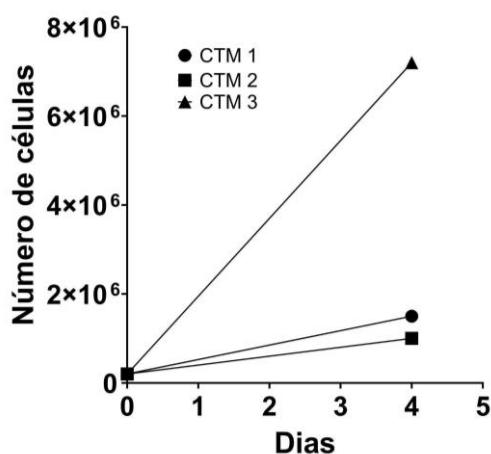
Figura 8. Diferenciação condrogênica de células-tronco mesenquimais (CTMs). As CTMs foram diferenciadas pelo período de 21 dias, quando foram coradas por meio de coloração de Alcian Blue. À esquerda, são apresentadas imagens representativas de células mantidas em meio de cultura basal, visualizadas em objetiva de 5x, sendo (A) CTM 1; (C) CTM 2 e (E) CTM 3. À direita, são apresentadas imagens representativas de células do mesmo doador mantidas em meio de diferenciação condrogênica, visualizadas em objetiva de 10x, sendo (B) CTM 1; (D) CTM 2 e (F) CTM 3.



6.2. Taxa proliferativa das CTM

A taxa proliferativa foi calculada através do plaqueamento de número conhecido de CTMs e contagem das células após 96 horas. Foram plaqueadas inicialmente 2×10^5 células de cada doador de CTM em garrafas de cultivo. Após 96h de cultivo, uma confluência de aproximadamente 80% foi atingida nas garrafas de células dos três doadores de CTMs. As células foram tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer. Observou-se que a CTM 3 teve maior nível de proliferação em relação à CTM 1 e 2 (Figura 9).

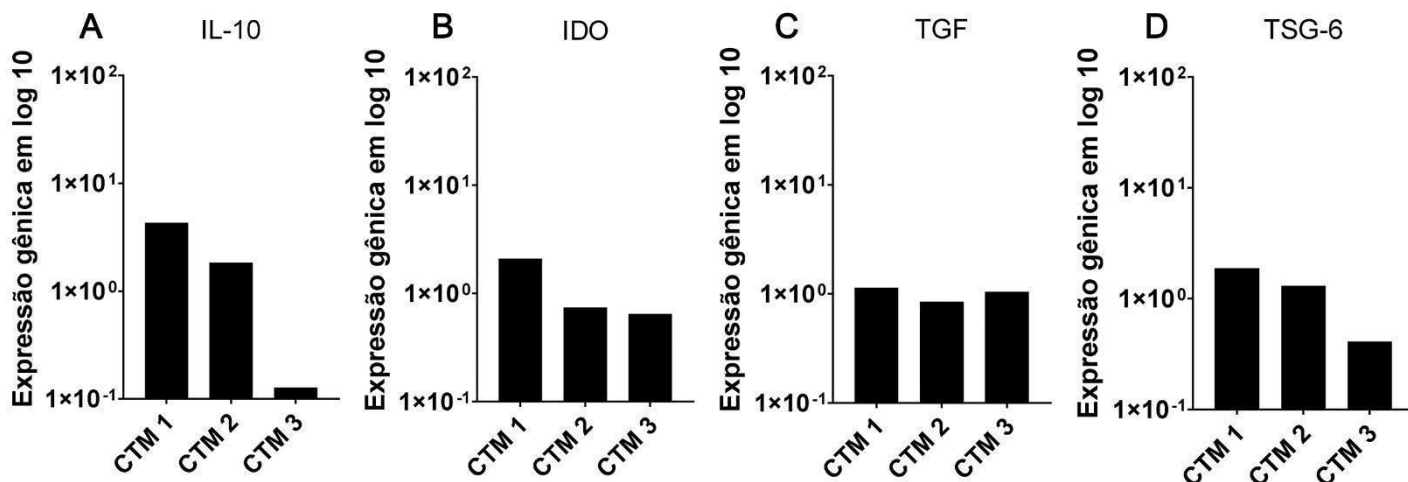
Figura 9. Gráfico representativo da taxa de proliferação das CTMs dos três doadores.



6.3. Assinatura imunológica das CTMs

Foi feito PCR em tempo real dos genes *GAPDH* que foi usado como controle, *IL-10*, *IDO*, *TGF- β* e *TSG-6*, com o objetivo de estabelecer o padrão da expressão de genes relacionados à capacidade imunomodulatória nas CTMs dos diferentes doadores (Figura 10). Observou-se que existe diferença nos níveis de expressão basal dos genes relacionados a imunomodulação entre as CTMs, sendo que a CTM 1 expressa maior nível *IL-10*, *IDO*, *TGF- β* e *TSG-6* quando comparada às CTMs dos outros doadores.

Figura 10. Gráfico representativo da expressão de genes relacionados a imunomodulação em amostras dos diferentes doadores de células-tronco mesenquimais (CTMs 1, 2 e 3), sendo, (A) Expressão gênica de *IL-10*; (B) Expressão gênica de *IDO*; (C) Expressão gênica de *TGF-β* e (D) Expressão gênica de *TSG-6*.



6.4. Ensaio de infecção de células-tronco mesenquimais por *Trypanosoma cruzi*

As CTMs caracterizadas foram utilizadas para o experimento de infecção por *Trypanosoma cruzi*. Para a infecção, foi escolhida a cepa Colombiana de *T. cruzi*. As CTM foram plaqueadas e divididas em três grupos experimentais:

1. células controle não infectadas;
2. células infectadas em proporção 1:1 (CTMs: parasitos);
3. células infectadas em proporção 1:5 (CTMs: parasitos).

A infecção foi mantida por 72 horas, até que os primeiros ninhos de amastigotas pudessem ser visualizados no grupo de infecção 1:5. A infecção das células foi bem-sucedida, porém foi detectada toxicidade celular a partir do 5.^o dia pós infecção no grupo infecção 1:5 e, a partir do 10.^o dia no grupo infecção 1:1. Aos 7 dias de infecção, o sobrenadante das culturas foi coletado e as células, tripsinizadas para isolamento de RNA, com o intuito de avaliar alterações de expressão gênica e carga parasitária. As demais células foram criopreservadas ou replaqueadas para observação até o 14.^o dia. Porém, as células infectadas perderam a viabilidade antes de completar 14 dias de infecção. Não foram detectadas diferenças significativas entre as replicatas

biológicas. Os resultados obtidos mostram, portanto, que foi possível observar a infecção das CTMs por *T. cruzi* tanto na proporção de 1:1 (Figura 11) como 1:5 (Figura 11).

Figura 11. Cultivo de CTMs dos três doadores, após 7 dias de infecção por *T. cruzi* na concentração de 1:1 (CTMs: parasitos). (a) CTM 1, (b) CTM 2 e (c) CTM 3, visualizadas em objetiva de 40x. As setas apontam os parasitos visualizados nas amostras.

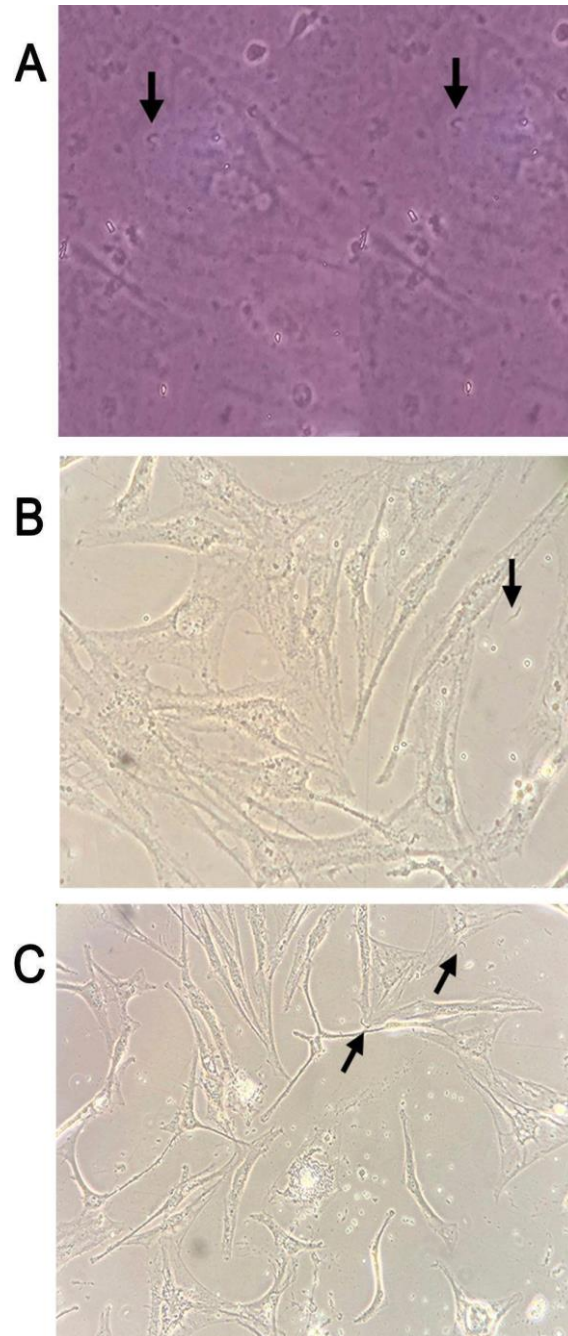
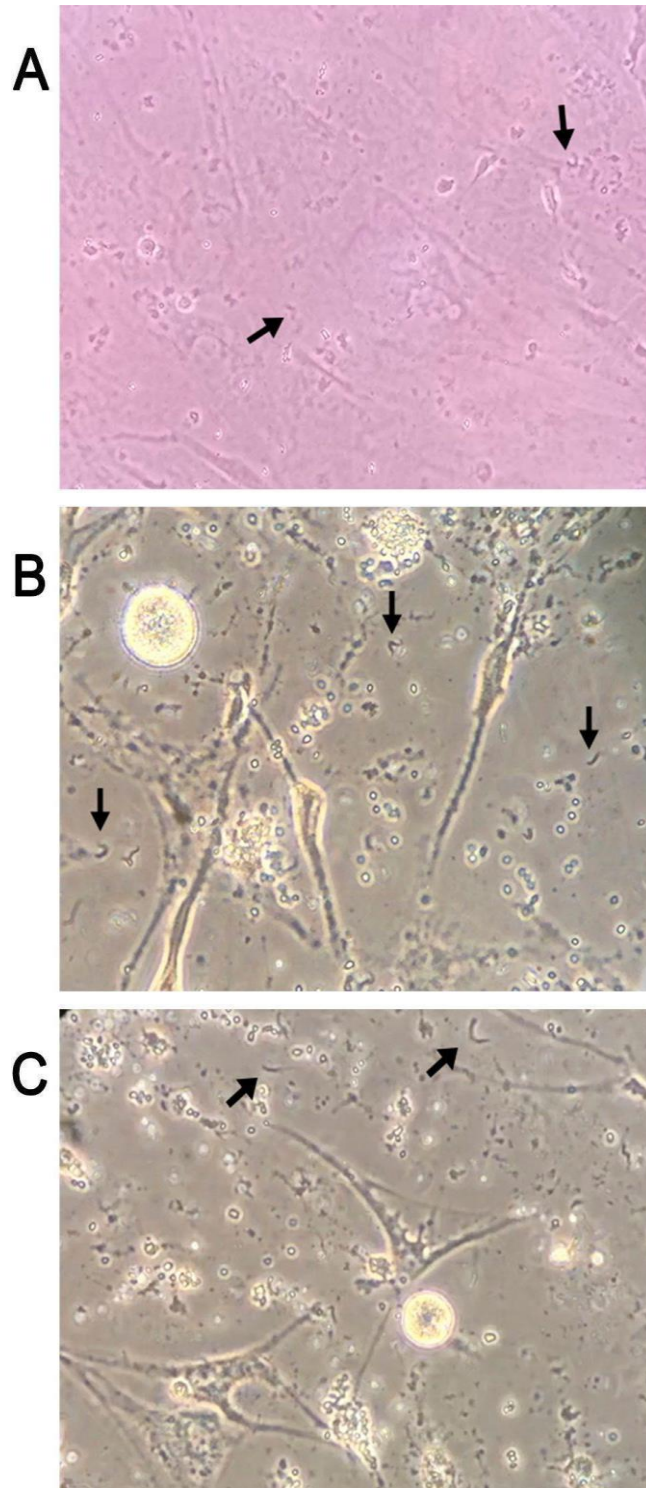


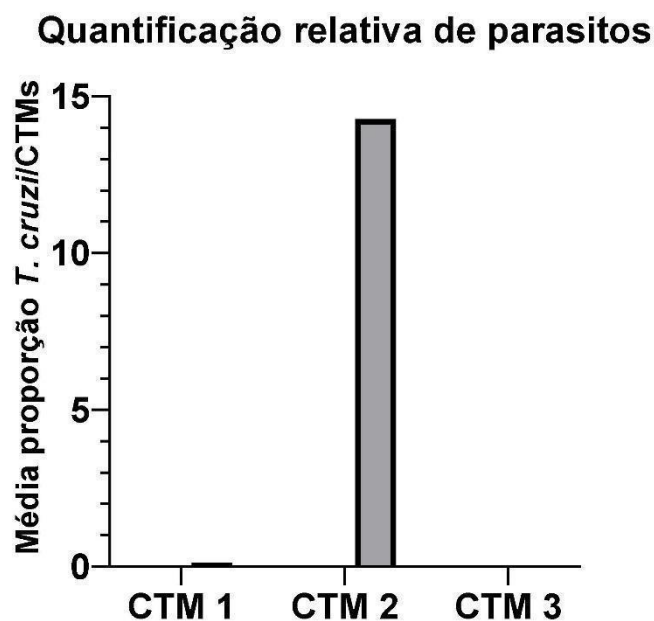
Figura 12. Cultivo de CTMs dos três doadores, após 7 dias de infecção por *T. cruzi* na concentração de 1:5 (CTMs: parasitos). (a) CTM 1, (b) CTM 2 e (c) CTM 3, visualizadas em objetiva de 40x. As setas apontam os parasitos visualizados nas amostras.



6.5. Determinação da carga parasitária

Com o objetivo de confirmar a infecção observada microscopicamente e determinar a carga parasitária das amostras de CTMs dos três doadores infectadas por *T. cruzi*, foi feito PCR em tempo real para detecção e quantificação relativa do gene *Tc40* que está presente em todas as fases da infecção pelo parasito (Figura 13).

Figura 13. Gráfico representativo da expressão do gene *Tc40* em amostras dos três doadores de CTMs infectados pelo *T. cruzi*.



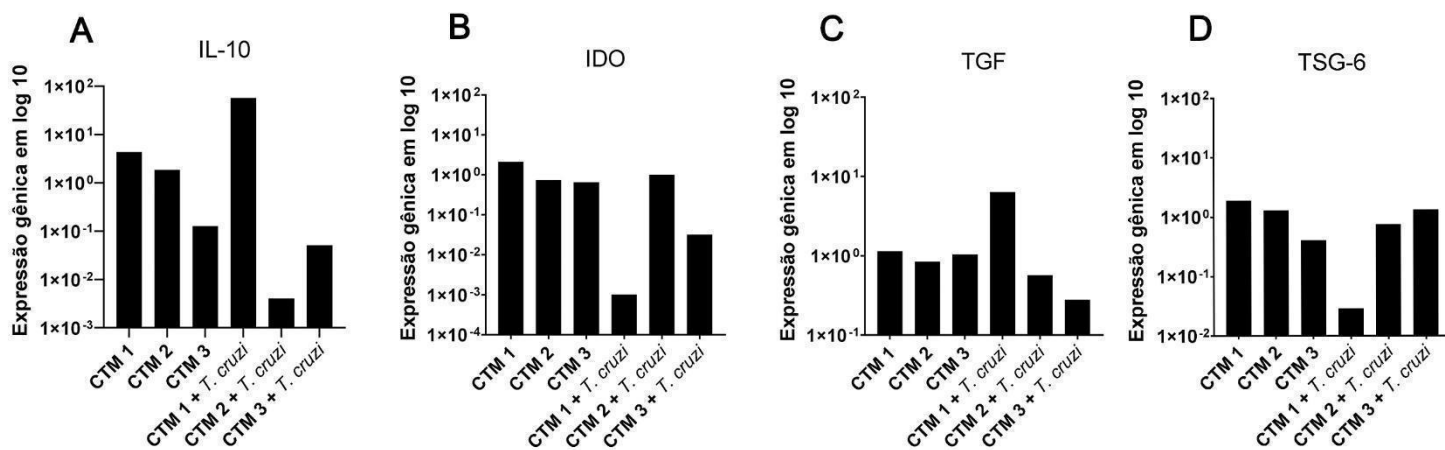
Foi possível perceber que houve variação na quantificação da carga parasitária entre as amostras de CTMs infectadas, apesar da mesma proporção CTMs: parasitos ter sido utilizada inicialmente. Enquanto a parasitemia pode ser detectada e quantificada nas amostras de CTM 1 e CTM 2 infectadas, as amostras de CTM 3, mesmo tendo parasitos visualizados por microscopia, não tiveram o cDNA do parasito detectado por meio de qRT-PCR.

6.6. Avaliação da expressão de genes associados à imunorregulação em células-tronco mesenquimais infectadas por *Trypanosoma cruzi*

A fim de avaliar se a infecção das CTMs mudaria a expressão de citocinas secretadas por essas células, foi feito PCR em tempo real dos genes *GAPDH* que foi usado como controle, *IL-10*, *IDO*, *TGF- β* e *TSG-6*. Após a infecção, enquanto as CTM 1 apresentaram aumento no nível de expressão de

IL-10 e *TGF- β* , CTM 2 e 3 tiveram diminuição da expressão desse gene. Por outro lado, *IDO* teve seu nível de expressão aumentado após a infecção por *T. cruzi* na CTM 2, evento não observado nas demais amostras. Por fim, enquanto CTM 1 e 2 tiveram diminuição da expressão de *TSG-6* após a infecção por *T. cruzi*, as CTM 3 apresentaram aumento na expressão desse gene. Foi possível observar, portanto, que existe diferença na expressão dos genes avaliados entre os doadores de CTMs, o que seria sugestivo de uma possível variação de potencial ou perfil imunorregulatório entre as células dos diferentes doadores após a infecção.

Figura 14. Gráfico representativo da expressão gênica de citocinas em amostras dos três doadores de CTMs não infectados e infectados por *T. cruzi*. (A) Expressão gênica de *IL-10* em CTMs não infectados e infectados pelo *T. cruzi*; (B) Expressão gênica de *IDO* em CTMs não infectados e infectados pelo *T. cruzi*; (C) Expressão gênica de *TGF- β* em CTMs não infectados e infectados pelo *T. cruzi* e (D) Expressão gênica de *TSG-6* em CTMs não infectados e infectados pelo *T. cruzi*.

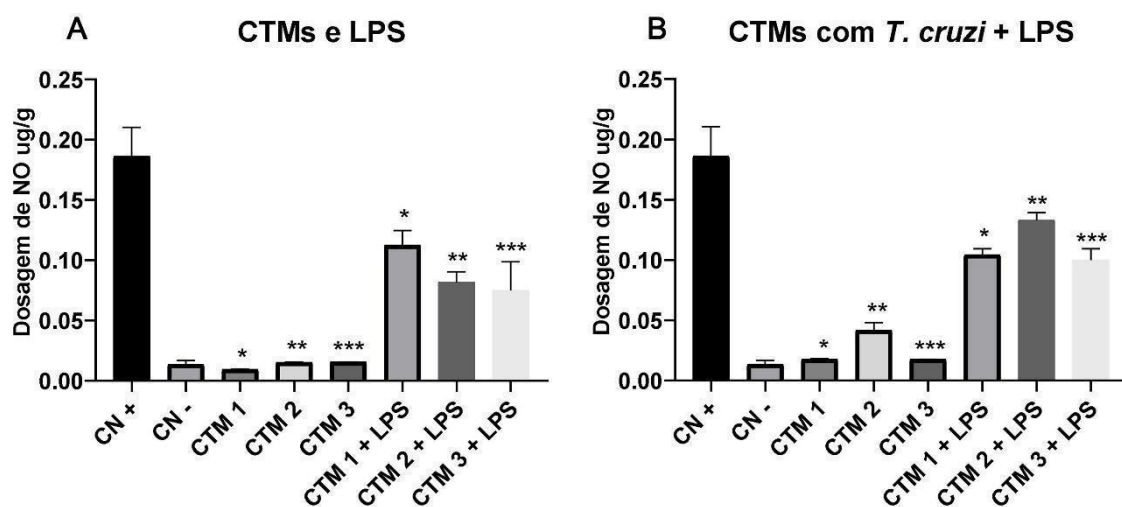


6.7. Avaliação da produção de óxido nítrico em macrófagos estimulados com LPS e tratados com o sobrenadante de CTMs infectadas ou não por *T. cruzi*

As células U937 foram diferenciadas em macrófagos e tratadas com sobrenadante de CTMs infectadas por *T. cruzi* e com sobrenadante de CTMs controle (não infectadas). Após estímulo feito com LPS, foi feita a dosagem de NO de modo a avaliar se o tratamento de macrófagos com sobrenadante de

CTMs infectadas ou não era capaz de alterar os níveis de secreção de NO (Figura 15).

Figura 15. Gráfico da comparação da secreção de óxido nítrico (NO) entre os grupos de macrófagos tratados com sobrenadante de CTMs infectadas e não infectadas por *T. cruzi*. (A) Macrófagos tratados com sobrenadante de CTMs não infectadas por *T. cruzi*, estimulados e não estimulados por LPS; (B) Macrófagos tratados com sobrenadante de CTMs infectadas por *T. cruzi*, estimulados e não estimulados por LPS. CN+: controle positivo composto por macrófagos estimulados por LPS. CN-: controle negativo composto por macrófagos sem tratamento.



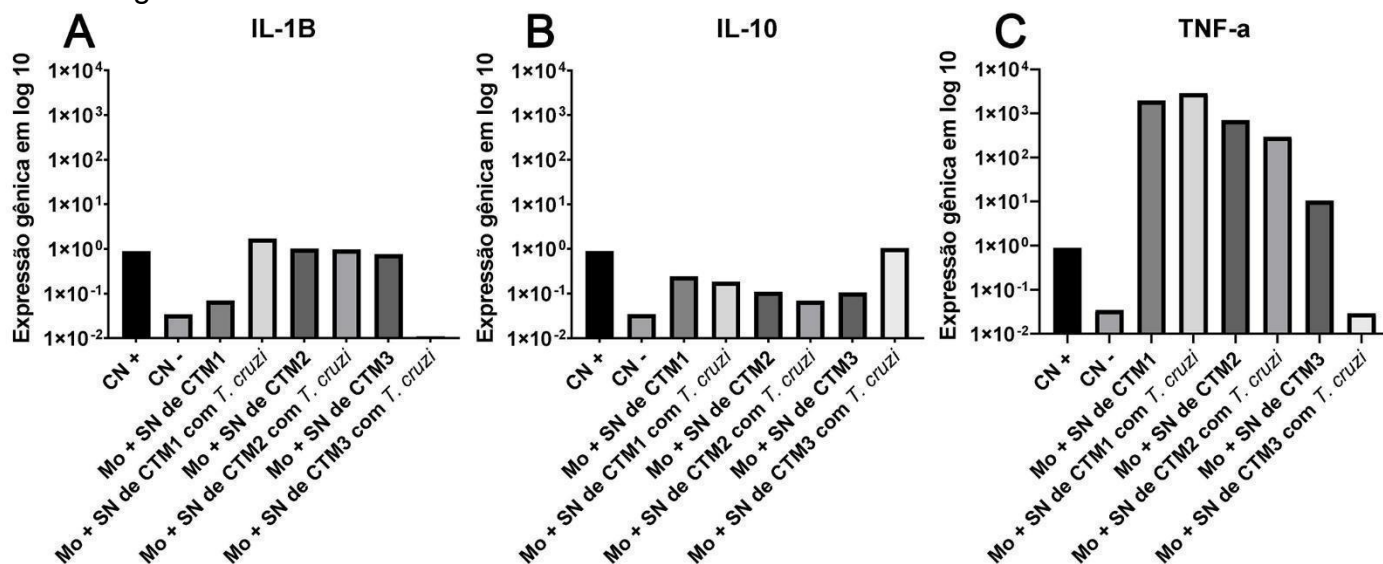
Foi possível observar que a secreção de NO foi aumentada no controle positivo do experimento e também em todos os grupos que foram estimulados por LPS. Foi possível observar também que o tratamento com o sobrenadante de CTMs diminuiu os níveis de produção de NO em todas as amostras estimuladas com LPS, independente do doador ou status de infecção por *T. cruzi* das CTM. A análise estatística foi feita através da comparação entre o grupo de macrófagos tratados com sobrenadante de CTMs não infectadas, não estimulados e o mesmo grupo, sendo estimulado por LPS, sendo feita a uma análise para cada doador de CTMs. Nos grupos de macrófagos tratados com o sobrenadante de CTMs infectadas por *T. cruzi*, a análise estatística foi feita da mesma forma, através da comparação entre o grupo estimulado e o grupo não estimulado, em cada doador de CTM. Observou-se que houve diferença estatística entre os grupos, com valor de $p < 0,0001$ nos grupos de macrófagos tratados com o sobrenadante de CTMs infectadas por *T. cruzi*, e também nos

grupos com o sobrenadante de CTMs não infectadas, com valor de $p < 0,0001$. Todos os sobrenadantes de CTMs foram capazes de promover a diminuição na produção de NO, mesmo na presença da infecção pelo *T. cruzi*.

6.8. Avaliação da expressão gênica em macrófagos

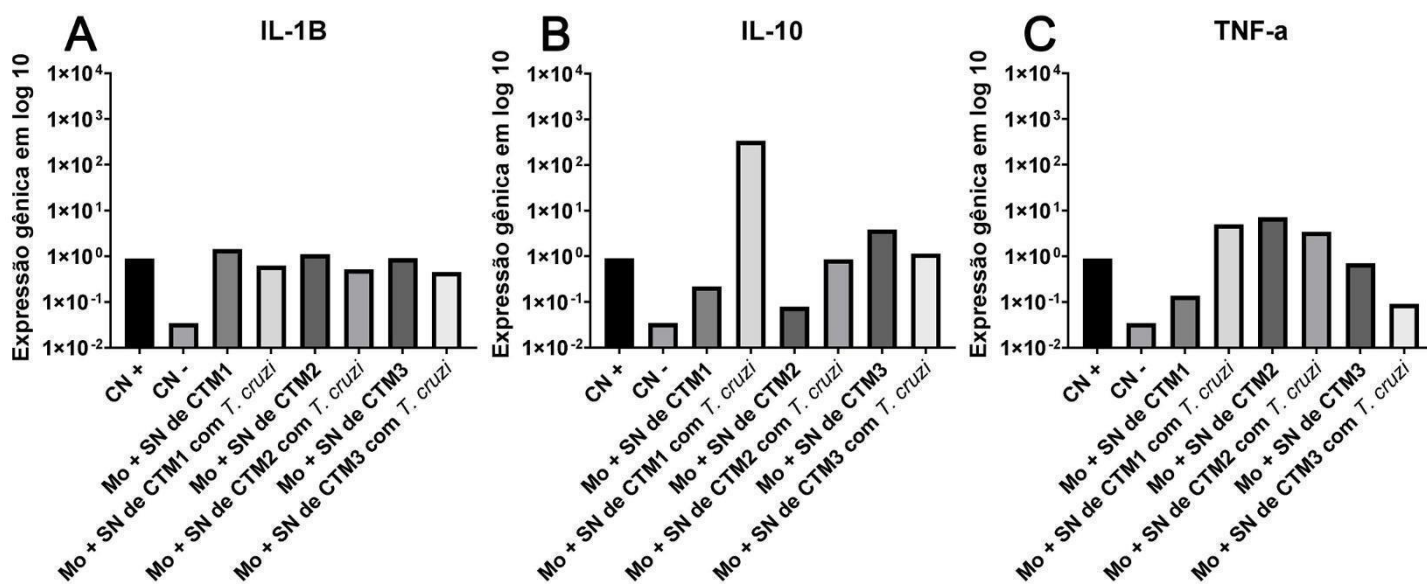
Com o objetivo de avaliar a polarização de macrófagos estimulados e não estimulados por LPS e tratados com o sobrenadante de CTMs infectadas e não infectadas por *T. cruzi*, foi realizada análise da expressão dos genes *IL-1 β* , *TNF- α* e *IL-10* (Figura 17 e 18). Observou-se uma variação grande entre os doadores na expressão de todos os genes. Na ausência de estímulo por LPS (Figura 17), os macrófagos tratados com sobrenadante de CTM 1 infectadas tiveram aumento da expressão de *IL-1 β* , quando comparados ao grupo que recebeu sobrenadante destas células não infectadas, o posto do que foi observado nas amostras tratadas com sobrenadantes derivados de CTM 3. Por outro lado, as amostras de macrófagos tratadas com sobrenadante de CTM 2 infectadas e não infectadas tiveram expressão semelhante de *IL-1 β* . Considerando a expressão de *IL-10*, apenas as amostras tratadas com o sobrenadante de CTM 3 infectadas por *T. cruzi* tiveram aumento de expressão do gene em relação à amostra incubada com sobrenadante de CTM não infectada. Considerando a expressão de *TNF- α* , amostras incubadas com o sobrenadante de CTM 1 infectada tiveram maior expressão do gene do que as amostras incubadas com o sobrenadante de CTM 1 não infectada, observação contrária aos dados de CTM 2 e CTM 3.

Figura 16. Gráficos representativos da expressão gênica de macrófagos tratados com sobrenadantes de CTMs infectadas e não infectadas por *T. cruzi*. (A) Expressão gênica de *IL-1β*; (B) Expressão gênica de *IL-10* e (C) Expressão gênica de *TNF-α*.



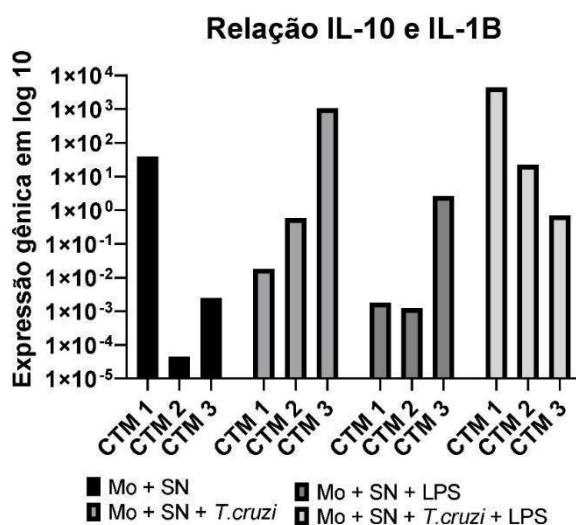
Considerando as amostras de macrófagos estimulados com LPS e tratados com sobrenadantes de CTM (Figura 17), observou-se que a expressão de *IL-1β* não sofreu grandes alterações, independente da condição experimental. Por outro lado, *IL-10* teve sua expressão aumentada nas amostras de macrófagos estimuladas por LPS e tratadas com o sobrenadante de CTM infectada em relação às amostras incubadas com o sobrenadante de CTM não infectada, tanto na amostra de CTM 1 quanto CTM 2. Já a expressão de *TNF-α* foi menor nas amostras de macrófagos estimulados por LPS e tratados com o sobrenadante de CTM 2 e 3 infectadas, quando comparadas às amostras estimuladas com LPS e incubadas com sobrenadante de CTMs não infectadas.

Figura 17. Gráficos representativos da expressão gênica de macrófagos tratados com sobrenadantes de CTMs infectadas e não infectadas por *T. cruzi* estimulados por LPS. (A) Expressão gênica de *IL-1β*; (B) Expressão gênica de *IL-10* e (C) Expressão gênica de *TNF-α*.



Uma vez que macrófagos M1 são caracterizados pela alta expressão de *IL-1β* após estímulo, e macrófagos M2 são caracterizados pela alta expressão de *IL-10*, realizou-se a análise da razão da expressão destes genes, com o intuito de se avaliar o perfil adquiridos pelos macrófagos estimulados por LPS e tratados com os sobrenadantes de CTM (Figura 18). Nas amostras tratadas com o sobrenadante de CTM 1, observou-se uma possível polarização M1 no grupo estimulado com LPS, e possível polarização M2 no grupo estimulado com LPS e tratado com o sobrenadante de CTM infectada. Considerando as amostras tratadas com os sobrenadantes de CTM 2, observou-se possível polarização M1 nos macrófagos estimulados com LPS e tratados com o sobrenadante de CTM 2. Nas amostras estimuladas pelo sobrenadante de CTM 3, observou-se possível polarização M1 de macrófagos sem estímulo de LPS e tratados com o sobrenadante de CTM não infectadas. Após infecção das CTM 3 por *T. cruzi*, a razão *IL-10/IL-1β* foi revertida, sugerindo polarização M2 nas amostras sem estímulo com LPS.

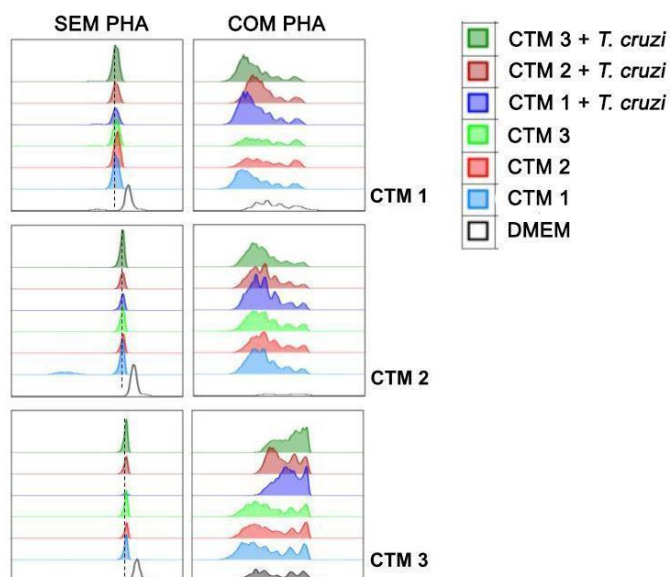
Figura 18. Gráficos representativos da razão entre a expressão gênica de *IL-10* e *IL-1 β* (*IL-10/IL-1 β*) em macrófagos tratados com sobrenadantes de CTMs infectadas e não infectadas por *T. cruzi*, estimuladas e não estimuladas por LPS.



6.9. Ensaio de proliferação de PBMCs estimuladas com fitohemaglutinina e tratadas com o sobrenadante de CTMs infectadas ou não por *T. cruzi*

Este experimento teve como objetivo avaliar a taxa de proliferação de linfócitos T estimulados ou não por PHA. Após o isolamento de PBMCs de três doadores, as células foram marcadas com CFSE, plaqueadas e tratadas com sobrenadante de CTMs infectadas ou não por *T. cruzi*. Amostras pareadas foram incubadas com PHA ou mantidas em meio basal. As análises foram feitas por citometria de fluxo (Figura 19).

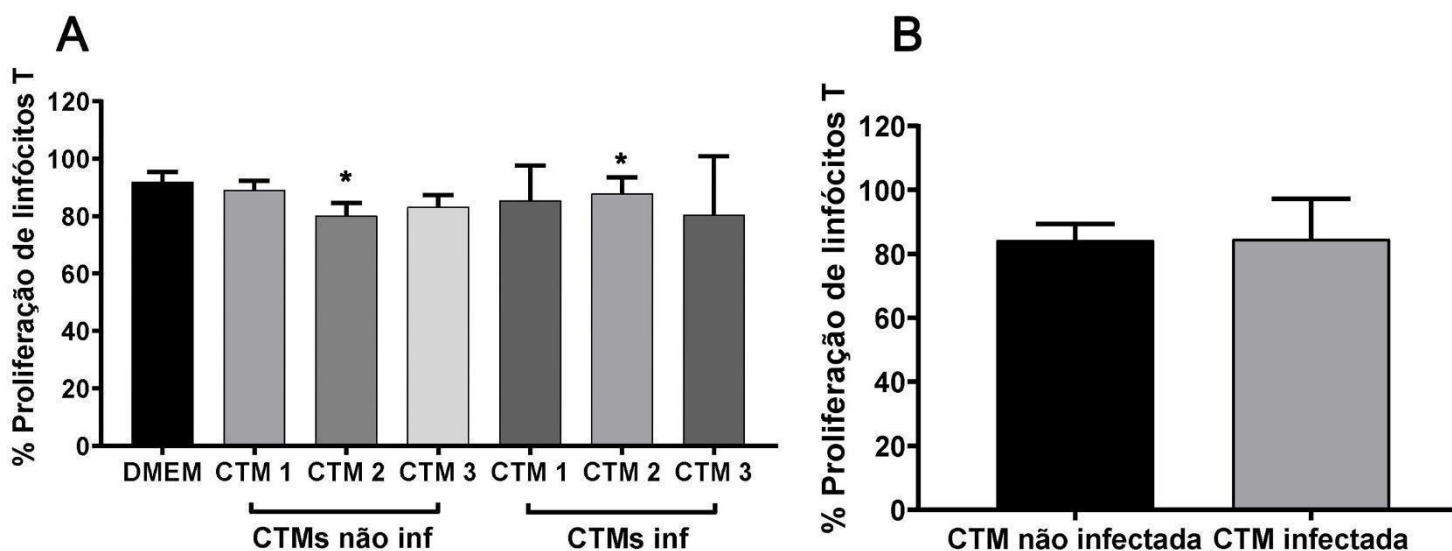
Figura 19. Histogramas representativos da população CD3+ CFSE+ em amostras de PBMCs. As PBMCs de 3 doadores foram marcadas com CFSE, estimuladas com PHA, incubadas com sobrenadante de CTMs e marcadas com anticorpo anti-CD3 para a verificação da proliferação de linfócitos T.



Ao fazer a análise inicial dos histogramas, observou-se que os picos de todos os 6 grupos com sobrenadante (SN) sem PHA (independente das CTMs terem sido infectadas ou não) estavam deslocados para a esquerda quando comparados com o grupo DMEM sem PHA (50% DMEM 50% RPMI). Portanto, o grupo SN sem PHA foi utilizado para normalizar os dados e como controle para prosseguir com a análise do grupo com PHA, partindo do fato de todos os picos estarem alinhados verticalmente (linha pontilhada em preto; figura 19).

Foi possível observar diferenças entre os resultados obtidos a partir de PBMCs e CTMs dos diferentes doadores. Tomados juntos, os dados derivados dos três doadores de CTMs mostram que não houve diferença entre a capacidade de imunomodulação parácrina de CTMs controle versus infectadas por *T. cruzi* (Figura 20 B). Porém, quando analisados de maneira qualitativa considerando as médias dos dados de cada doador, foi possível notar que o potencial imunomodulatório parácrino de CTM 1 e 3 foi realçado após infecção pelo *T. cruzi*, enquanto o potencial imunossupressor parácrino da CTM 2 foi comprometido após infecção (Figura 20 A).

Figura 20. Gráficos representativos de proliferação de linfócitos T em amostras de PBMCs estimuladas por PHA e tratados com sobrenadante de CTMs infectadas e não infectadas por *T. cruzi*. (A) PBMCs estimulados por PHA, e tratadas com sobrenadante de CTMs infectadas e não infectadas por *T. cruzi* dos três doadores de CTMs (CTM 1, 2 e 3), e (B) Comparação entre o tratamento feito com sobrenadantes de CTMs não infectadas e infectadas por *T. cruzi*.



Em relação aos doadores de CTMs, foi possível observar variação entre as amostras derivadas de doadores diferentes, sendo que as amostras de dois doadores tiveram a proliferação de linfócitos menor no grupo tratado com sobrenadante de CTMs infectado por *T. cruzi*. O outro doador apresentou comportamento oposto, tendo a proliferação diminuída no grupo tratado com sobrenadante de CTMs não infectadas

6.10. Avaliação da expressão gênica em PBMCs

Com o objetivo de investigar se o sobrenadante das CTMs infectadas ou não por *T. cruzi* alteraria o microambiente de PBMCs, realizou-se isolamento de RNA e análise de expressão de genes por meio de qRT-PCR.

Foi possível perceber que os grupos de PBMCs que foram tratados com os sobrenadantes das CTM 1, 2 e 3 apresentaram expressão alta de *IL-10* e *TGF-β*. Quando os mesmos grupos foram estimulados por PHA, houve diminuição na expressão de todos os genes. Além disso, o sobrenadante de

CTMs infectadas levou a menor expressão de *IL-10* comparado aos grupos tratados com sobrenadante de CTMs não infectadas.

Figura 21. Gráficos representativos da expressão gênica de PBMCs tratados com sobrenadantes de CTMs infectadas e não infectadas por *T. cruzi*. (A) Expressão gênica de *IL-10*; (B) Expressão gênica de *TGF-β*; (C) Expressão gênica de *INF-γ* e (D) Expressão gênica de *TNF-α*.

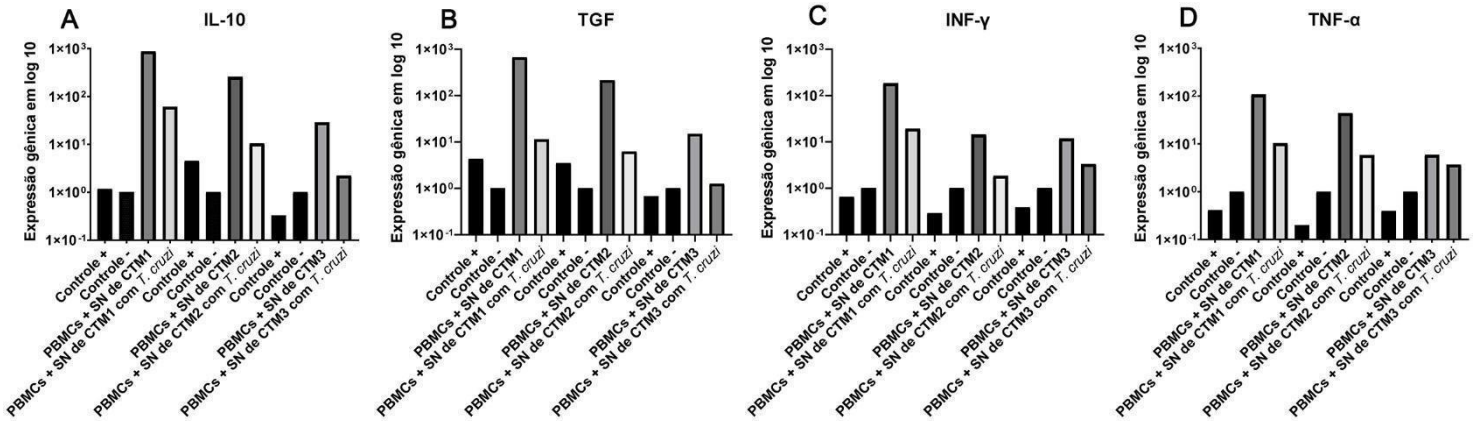
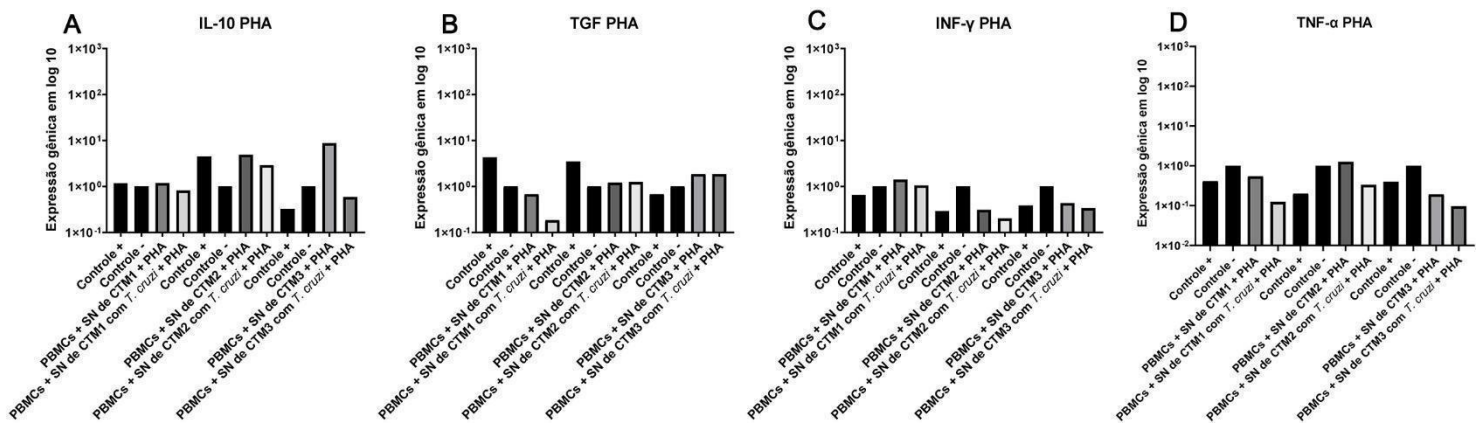


Figura 22. Gráficos representativos da expressão gênica de PBMCs tratados com sobrenadantes de CTMs infectadas e não infectadas por *T. cruzi* e estimulados por PHA. (A) Expressão gênica de *IL-10*; (B) Expressão gênica de *TGF-β*; (C) Expressão gênica de *INF-γ* e (D) Expressão gênica de *TNF-α*.



Portanto, foi possível perceber que existem diferentes níveis de expressão entre as amostras de PBMCs que foram tratadas com os sobrenadantes das CTMs dos três doadores. Quando os PBMCs foram tratados com sobrenadantes das CTMs infectadas pelo *T. cruzi*, houve diferença no perfil de expressão dos genes associados a imunomodulação.

7. Discussão

A patogênese da doença de Chagas é complexa, portanto, se faz necessária uma melhor compreensão dos mecanismos celulares e moleculares que coordenam e promovem as alterações fisiopatológicas observadas clinicamente. O tecido adiposo atua diretamente na homeostase metabólica e no desenvolvimento de doenças humanas (Choe et al., 2016). Além de seu papel como depósito de triglicerídeos, também atua no controle do gasto energético e da inflamação, por meio da secreção de fatores como a leptina que atua nos receptores de superfície expressos em neurônios e atuam na inibição do apetite e estimulam a saciedade. O tecido adiposo promove também a oxidação lipídica e a biogênese mitocondrial que acelera o gasto energético nos tecidos por sinalização local e regulação de fatores derivados do cérebro (Khodamoradi et al., 2022). A adiponectina sintetizada no tecido adiposo é encontrada em abundância no sangue exerce efeitos antiobesidade e anti diabetes e alivia a resistência à insulina através da estimulação da oxidação lipídica e das respostas anti-inflamatórias (Jung et al., 2021). O tecido adiposo secreta citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e MCP-1, e citocinas anti-inflamatórias, sintetizadas pelas células do sistema imune que residem no tecido adiposo (Choe et al., 2016). Os macrófagos são o tipo de células mais frequentes entre os leucócitos do tecido adiposo, constituindo quase 50% do total de células imunes (Nagajyothi et al., 2009). No contexto da doença de Chagas, o tecido adiposo atua como reservatório para o *T. cruzi*, e essa persistência altera as funções do tecido adiposo, regulando a lipólise e a inflamação (Nagajyothi et al., 2019). Portanto, é possível que os eventos ocorridos no tecido adiposo de pacientes com doença de Chagas impactem seu prognóstico e história clínica.

Estudos demonstram que as CTMs derivadas da medula óssea, cordão umbilical e do tecido adiposo promovem regeneração tecidual e regulam o sistema imunológico por meio de dois mecanismos principais: diretamente pela comunicação celular e indiretamente pela secreção de mediadores solúveis, fatores de crescimento e vesículas extracelulares (Al-Ghadban et al., 2020). No contexto da doença de Chagas, as CTMs têm sido investigadas como alternativas terapêuticas em modelos pré-clínico e clínico. Em modelos murinos

de cardiomiopatia chagásica crônica, foi demonstrado que o uso de células mononucleares da medula óssea tem a capacidade de diminuir a inflamação e a fibrose, e também reduzem os níveis de dilatação do ventrículo direito (Goldenberg et al., 2008). Já em seres humanos, os resultados são diferentes. Foi descrito por Vilas-Boas et al., 2006 os efeitos do transplante de CTMs da medula óssea em pacientes com insuficiência cardíaca, decorrente da doença de Chagas, incluíram um aumento da qualidade de vida e da capacidade funcional cardíaca desses pacientes após o transplante, ocasionando alívio sintomático, porém, não havendo resultados significativos referentes à diminuição do dano cardíaco. Posteriormente, Ribeiro Dos Santos et al., 2012 conduziu o primeiro estudo randomizado usando transplante autólogo de células mononucleares derivadas da medula óssea em pacientes com cardiomiopatia chagásica e concluiu que o tratamento através da injeção intracoronária de células mononucleares autólogas não é capaz de melhorar a função ventricular nem a qualidade de vida em pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica.

Apesar dos resultados clínicos obtidos até o momento, ainda é possível que o uso de CTMs poderia ter potencial terapêutico relevante para o tratamento da cardiomiopatia chagásica, justificando novos estudos (Guarita-Souza et al., 2006). Possivelmente, uma melhor compreensão dos resultados obtidos em modelos murinos permitirá a otimização da eficácia terapêutica da terapia com CTMs para a doença de Chagas. Além disso, os resultados obtidos até o momento mostram que ainda é necessário compreender melhor como as CTMs podem contribuir para a melhora clínica de pacientes com doença de Chagas. Mostram ainda que pouco ou nada se sabe sobre o que acontece quando as CTMs encontram o *T. cruzi* no organismo dos pacientes tratados. Apesar de a parasitemia ser baixa durante a fase crônica da doença de Chagas (Coura et al., 2011.), é possível que as CTMs infundidas nos pacientes sejam parasitadas e tenham suas funções alteradas, ajudando a justificar a ausência de resultados relevantes na clínica.

Os vasos sanguíneos são compostos por uma camada interna de células endoteliais que revestem a parede dos vasos e por células perivasculares periféricas também conhecidas como pericitos. Atualmente, considera-se que

CTMs são encontradas como pericitos nos mais diversos tecidos do organismo (Ahmed et al., 2018), se apresentando como células multipotentes heterogêneas, semelhantes a outros tipos de células-tronco, que atuam como um sistema de reparo em resposta à lesão, mantendo a integridade estrutural dos vasos sanguíneos (Courtney et al., 2020). Sendo assim, é possível que as CTMs estejam envolvidas na fisiopatologia da doença de Chagas, assim como já foi observado em doenças inflamatórias sistêmicas como a artrite reumatoide (Lopez-Santalla et al., 2020) e diabetes (Wang et al., 2021), dentre outros. Porém, esta hipótese ainda não foi testada até o momento. Desta forma, neste trabalho, realizou-se a infecção de CTMs derivadas do tecido adiposo por *T. cruzi* com o intuito de avaliar as consequências para a função imunomodulatória parácrina das CTMs.

As CTMs foram obtidas do tecido adiposo de três doadores saudáveis sendo isoladas conforme foi descrito por de Carvalho et al., 2015. A Sociedade Internacional de Terapia Celular propõe uma série de critérios para permitir a identificação das células-tronco mesenquimais (Dominici et al., 2006). Os critérios são a capacidade de adesão ao plástico, a expressão de marcadores específicos e o potencial de diferenciação multipotente. A capacidade de aderência à superfície de cultivo foi verificada durante o processo de cultivo e pode ser visualizada na figura 4.

Como não há um marcador exclusivamente expresso por CTMs, a sua identificação imunofenotípica se dá por meio da avaliação de uma combinação de marcadores positivos e negativos. Conforme imunofenótipo estabelecido pela Sociedade Internacional de Terapia Celular, a população de CTMs, independente de seu tecido de origem, deve apresentar expressão >95% de marcadores de superfície como o CD105, CD73, CD90 e CD44. O CD105 é uma proteína transmembranar que compõe o complexo de sinalização por TGF- β e desempenha um papel importante na angiogênese (Mafra et al., 2016). Embora o CD105 venha sendo considerado um importante marcador de CTMs, a literatura mostra que a sua expressão varia dependendo da fonte das CTMs e do tempo de cultivo *in vitro*, sendo assim, um marcador com expressão

heterogênea (Anderson et al., 2013). O CD73 é uma proteína de superfície que tem um papel importante na ativação e na sinalização adenosinérgica (Gao et al., 2014). É um dos marcadores clássicos que definem especificamente a população de CTMs, e pode apresentar um padrão de expressão heterogênea, que pode estar associada à propriedade reparadora, uma vez que a adenosina extracelular catalisada pela atividade de desfosforilação de CD73 tem se mostrado um regulador fundamental da resposta imune local. Esse padrão não uniforme de expressão está associado à propriedade reparadora diversa, por meio do produto catalítico de adenosina extracelular, e consegue moldar a resposta imune local (Tan et al., 2019). Já o CD90 é um antígeno de superfície que está envolvido nos processos de comunicação célula a célula (Dominici et al., 2006). É uma glicoproteína que está ancorada em glicosilfosfatidilinositol sendo detectada pela primeira vez em células T de camundongos; Participa da ativação de células T, liberação de vesículas, apoptose em células e cicatrização de feridas, entre outros. Além disso, regula a adesão de fibroblastos e a organização do citoesqueleto e a migração celular. Estudos recentes sugerem que o CD90 desempenha um papel na carcinogênese e também foi proposto como um marcador de células-tronco cancerígenas (Moraes et al., 2016). O CD44 é uma glicoproteína que está presente na superfície da célula e costuma ser expressa em células do sistema imune, tendo um papel importante nos processos inflamatórios (Zhou et al., 2021). É considerado uma das mais importantes moléculas de adesão, responsável pelo extravasamento de células T ativadas em locais de inflamação, além da ligação com ácido hialurônico, que facilita a migração e adesão de diversos tipos celulares, como as CTMs. A expressão de CD44 tem influência na diferenciação de CTMs (Moraes, D., 2018). Desta forma, estes marcadores possuem diversos papéis biológicos não apenas nas CTMs, mas em diversos tipos celulares.

A identificação das CTMs inclui ainda a avaliação de um painel de marcadores que deve apresentar expressão abaixo de 2% que tem o objetivo de assegurar que as populações de CTMs com as quais se trabalha não estejam contaminadas com outras populações celulares. Este painel de marcadores negativos é composto por um grupo de proteínas de superfície como o CD45,

que é um marcador de leucócitos; CD34, expresso em células hematopoiéticas progenitoras e células endoteliais; CD14 e CD11b, expressos em monócitos e macrófagos; CD19, marcador de células B, e; a molécula de HLA-DR, expresso em CTMs apenas em condições específicas (Dominici et al., 2006).

Os valores referentes à expressão de cada um desses marcadores foram apresentados nas tabelas 2 e 3, e foi possível perceber uma variação nas porcentagens de expressão entre os doadores de CTMs. É admissível que exista essa variância entre doadores, que decorre da individualidade de cada doador, do tecido originário, e também da qualidade do isolamento dessas células (Lin et al., 2013; Yang, 2018). A expressão dos marcadores que devem apresentar valores <2% foi feita através de um pool de anticorpos, sendo assim, a discussão é limitada. Considerando que os anticorpos do pool podem identificar células diferentes, a positividade das CTM 1 para os marcadores negativos acima de 2% não é suficiente para desqualificar tal amostra biológica. De fato, alguns trabalhos mais atuais consideram como 5% o limite máximo aceitável para a expressão dos marcadores considerados negativos em populações de CTMs (Mckinnirey et al., 2021).

Entre as amostras de CTMs isoladas e caracterizadas neste trabalho, a CTM 2 apresentou nível de expressão do CD90 abaixo do esperado. A baixa expressão de CD90 já foi associada a menor capacidade imunomodulatória, que pode estar relacionada a baixa produção de IL-10 que costuma ocorrer em condições de baixa expressão de CD90 (Campioni et al., 2009). Porém, neste trabalho não se investigou a fundo se as diferenças biológicas encontradas entre as CTMs de diferentes doadores relacionam-se diretamente a esta diferença imunofenotípica ou se estariam associadas a outras características biológicas não avaliadas.

Além da avaliação da capacidade de adesão ao plástico e imunofenótipo específico, a caracterização de uma população de CTMs também demanda a validação funcional das células, por meio da verificação do potencial de diferenciação multipotente. Para tanto, as CTMs dos três doadores foram estimuladas com meio basal acrescido de componentes indutores, específicos

para cada tipo de diferenciação, conforme foi descrito no item 5.4.3.4. Foi feita a diferenciação adipogênica e condrogênica que teve duração de 21 dias.

Os resultados obtidos através das diferentes colorações indicaram que as células dos três doadores foram capazes de se diferenciar mediante estímulo específico, apresentando certas diferenças qualitativas entre elas. Nos poços induzidos à diferenciação adipogênica, foi possível observar a presença de gotículas lipídicas de forma bem nítida nas células derivadas dos três doadores. As células do grupo controle, mantidas em meio basal, não apresentaram esse acúmulo intracelular de lipídeos, excluindo a possibilidade de contaminação da amostra com adipócitos ou diferenciação espontânea. Nos poços induzidos à diferenciação condrogênica, foi possível observar a formação de matriz extracelular por agregados celulares densos e coloração leve de azul de alcian, indicativo de deposição de matriz extracelular (Hamid et al., 2012) rica em glicosaminoglicanos sulfatados e não sulfatados, proteoglicanos grandes e pequenos e colágenos, tipicamente secretada por condrócitos (Wang et al., 2008). Apesar de ser considerada um parâmetro qualitativo essencial para a caracterização de populações de CTMs, a capacidade de diferenciação de CTMs obtidas de diferentes doadores é variável. Diferentes autores demonstram que a multipotencialidade de CTMs é influenciada pela idade do doador e sexo, dentre outros (Chamberlain et al., 2007). É relevante salientar ainda, que, apesar de atenderem a determinados pré-requisitos para sua identificação, as CTMs não são uma população homogênea de células (Liu et al., 2019). Por mais que diversos trabalhos investiguem CTMs que atendem aos critérios de identificação determinados pela Sociedade Internacional de Terapia Celular, importantes diferenças funcionais podem ser observadas entre CTMs isoladas de diferentes doadores. Portanto, a caracterização de outras características das CTMs pode ser relevante nos mais diferentes estudos. Neste trabalho, a expressão basal de genes associados à imunorregulação foi determinada, com o intuito de se conhecer melhor as características de cada amostra de CTMs investigadas.

Caracterizou-se, neste trabalho, a expressão de mediadores anti-inflamatórios como, TGF- β ,IDO e IL-10, e a partir dos valores referentes a expressão de cada mediador em cada doador de CTM, foi possível estabelecer

o que denominamos "assinatura imunológica". As CTMs tiveram a sua capacidade imunomodulatória inicialmente verificada por ensaios de modulação de proliferação de células T, mostrando então que dispõem da capacidade de suprimir a proliferação (Bartholomew et al., 2002). As CTMs liberam citocinas anti-inflamatórias como, TGF- β , e IL-10 e mediadores como PGE2 e IDO para controlar o processo inflamatório, por meio de ação supressora, e o controle do prolongamento da inflamação (Hermansyah et al., 2021). A fim de investigar os processos associados aos ensaios funcionais de imunomodulação envolvendo macrófagos e PBMCs, foi feita uma avaliação da expressão de diferentes genes por PCR em tempo real.

Foi possível observar que a CTM 1 apresenta uma expressão basal relativamente alta de *IL-10*, *IDO*, *TGF- β* e *TSG-6*, quando comparada às demais CTM investigadas. As CTM 2 e 3 apresentaram valores de expressão menores de *IDO*, *TGF- β* e *TSG-6* em relação a CTM 1. A CTM 2 tem nível intermediário de expressão de *IL-10* e *TSG-6*, quando comparada a CTM 1 e 3. Observou-se ainda que os níveis de expressão de *TGF- β* apresentaram menor variação entre os três doadores e que a CTM 3 foi a que apresentou os menores níveis de expressão basal de *IL-10* e *TSG-6* entre as amostras analisadas.

A *IL-10* é uma citocina produzida por várias células do sistema imune, e tem um papel importante nos processos de imunomodulação e imunorregulação. Ela pode atuar na inibição das células T auxiliares 1, reduzindo o nível de citocinas como a *IL-6* e *IFN- γ* (Acosta et al., 2019). Em estudos recentes, observou-se ainda um potencial importante dos efeitos anti-inflamatórios da *IL-10* na promoção de polarização M2 dos macrófagos do tecido adiposo (Xie et al., 2014).

A IDO é uma enzima intracelular que atua na degradação do triptofano nos microambientes de tecidos locais e gera catabólitos com ação imunorreguladora. O triptofano é um aminoácido necessário para a função e proliferação de células T, sua eliminação restringindo os processos imunológicos relacionados a essas células (Wei et al., 2017). A IDO é também capaz de induzir a conversão de células T CD4+ virgens em células T reguladoras

altamente supressoras (Huang et al., 2022). É uma das principais enzimas atuantes no processo imunorregulador das CTMs, sendo que a expressão da IDO é induzida por sinais emitidos por um ambiente inflamatório, que contém, por exemplo, altos níveis de INF- γ (Zheng et al., 2017).

O TGF- β regula muitos processos celulares, como a diferenciação de adipócitos, inflamação entre outros. Alguns estudos mostram que o processo de inflamação prolongada pode induzir células de macrófagos tipo 2 (M2) a liberar vários fatores de crescimento, especialmente TGF- β (Meng et al., 2016). Ele também atua como um sensor molecular, que pode aumentar ou diminuir a proliferação celular de maneira dependente ao estímulo que recebe do ambiente, e precisa ser ativado no lugar e momento específico para recrutar células-tronco/progenitoras para participar dos estímulos de regeneração/remodelação de tecidos (Xu et al., 2018).

A proteína 6 estimulada pelo TNF- α ou gene 6 estimulado por citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa TNF (TSG-6) é uma proteína produzida pelas células do sistema imune e por células estromais. O TSG-6 possui potentes propriedades anti-inflamatórias, e atua na inibição da migração de neutrófilos e na inibição da sinalização inflamatória, contribuindo para a regulação negativa das redes de protease (Romano et al., 2019).

Neste trabalho foi possível perceber que existe uma diferença clara nos níveis de expressão basal dos genes relacionados a imunomodulação entre as CTMs derivadas de diferentes doadores. Estudos anteriores já demonstraram que essa diferença pode decorrer devido a vários fatores, entre eles, a idade, sexo e as condições de isolamento das células (Chamberlain et al., 2007). Por exemplo, as CTMs de doadores do sexo feminino tendem a apresentar um potencial de imunossupressão mais potente, quando analisadas em condições de cultivo *in vitro* (Mckinnirey et al., 2021).

As CTMs atuam nos processos inflamatórios através da comunicação célula-célula, ou por mensageiros como as vesículas extracelulares (Seo et al., 2019). Alguns trabalhos relataram que existem diferenças nos perfis de expressão de citocinas de acordo com o tecido originário das CTMs (Kyurkchiev

et al., 2014). As células do sistema imune secretam fatores que estimulam o processo inflamatório como TNF- α e IFN- γ , e quando as CTMs entram em contato com esses fatores pró-inflamatórios, tendem a aumentar a secreção de moléculas que atuam no processo de imunomodulação, tais como a IDO, TGF- β 1 e IL-10. Essas moléculas atuam diretamente no microambiente onde são liberadas, e tendem a modificá-lo, transformando o ambiente pró-inflamatório em anti-inflamatório (Mckinnirey et al., 2021).

Em CTMs, a expressão de IDO é geralmente induzida quando as CTMs são expostas ao IFN- γ . A IDO atua no catabolismo do triptofano, que tem participação importante no processo de ativação e proliferação de células T (Mckinnirey et al., 2021). Essa atuação imunossupressora da IDO pode variar entre os doadores de CTMs (François et al., 2012).

Após isolar, caracterizar e estabelecer a assinatura imunológica dos doadores de CTMs, foi feito um ensaio de infecção das células dos três doadores de CTMs com a cepa colombiana do *Trypanosoma cruzi*. A cepa colombiana é caracterizada pela lenta progressão da doença parasitária, atingindo altos níveis de formas parasitárias disseminadas desde o estágio inicial da infecção, e baixa mortalidade (Camandaroba et al., 2001). A infecção foi realizada conforme descrito no item 5.5. A infecção por *T. cruzi* induz alterações bioquímicas e morfológicas nas células do hospedeiro e do patógeno por uma série de processos de sinalização celular que levam ao recrutamento de lisossomos para a membrana plasmática das células, resultando na internalização do *T. cruzi* na célula alvo (Gachet-Castro et al., 2021). Este trabalho teve como objetivo avaliar as consequências da infecção por *T. cruzi* em CTMs humanas derivadas do tecido adiposo. A infecção das células foi bem-sucedida nas diferentes proporções CTM: parasitos testados, porém foi observada toxicidade celular a partir do 5.º dia após infecção no grupo com infecção de 1:5 e, a partir do 10.º dia no grupo com infecção 1:1. Foi preparado um meio condicionado das CTMs dos três doadores infectados por *T. cruzi* e não infectados a fim de realizar ensaios de proliferação de células T em PBMCs e realizar a dosagem de NO em macrófagos tratados com os sobrenadantes.

Para tanto, foi primeiramente realizada a demonstração da infecção por meio de visualização microscópica de ninhos de amastigotas intracelulares e também a detecção de material genético do parasita nas culturas de CTMs infectadas, por meio de PCR em tempo real, com o objetivo de quantificar a carga parasitária. Esta avaliação foi realizada com a detecção e quantificação relativa do gene Tc40 de *T. cruzi*. O clone de DNA recombinante Tc40 codifica um antígeno imunodominante que está presente em todas as fases do desenvolvimento do *T. cruzi*, e codifica um polipeptídeo de 100 kDa altamente conservado nas cepas G e colombiana do *T. cruzi*. Este antígeno tende a reagir especificamente com anticorpos que estão presentes em todas as fases da doença de Chagas, portanto foi considerado um gene adequado para ser utilizado para a detecção e quantificação de *T. cruzi* nas amostras de CTMs humanas infectadas (Lesénéchal et al., 1997). Nesta avaliação, foi possível estimar a carga parasitária nas culturas de CTMs. Novamente, observou-se variação entre as CTMs obtidas de diferentes doadores, que apresentaram carga parasitária variável. As amostras de CTM 1 e a CTM 2 apresentaram o equivalente a 14 e 1 parasitos por CTM. Já a amostra de CTM 3 apresentou nível indetectável do gene Tc40.

Com o objetivo de verificar se a infecção das CTMs dos três doadores por *T. cruzi* comprometeria sua capacidade de imunomodulação parácrina, foram feitos dois ensaios. O primeiro deles foi realizado com o intuito de se avaliar o nível de ativação de células U937 diferenciadas em macrófagos por LPS, de acordo com a produção de NO. Células de linhagens de células monocíticas como U937 e a THP-1 são amplamente usadas como modelo experimental de estudos que focam em macrófagos humanos, pois podem ser diferenciadas após estimulação específica (Song et al., 2015). As células monocíticas podem ser diferenciadas em macrófagos ou células dendríticas de acordo com os estímulos que recebem, sendo capazes de adotar diversos aspectos de sua morfologia e propriedades funcionais (Nemati et al., 2019).

É descrito que o mecanismo do PMA que induz a diferenciação monócito-macrófago envolve a ativação de *NF- κ B*, através da via da proteína quinase C, e também ativa a sinalização *RhoA/ROCK* durante a diferenciação monócito-

macrófago (Yang et al., 2017). O tratamento de células U937 com PMA pode direcionar os monócitos para a diferenciação em macrófagos, processo acompanhado pela adesão celular à superfície de cultivo, uma diminuição da taxa proliferativa (Chimal-Ramirez et al., 2016), além de uma série de outras alterações funcionais já bem estabelecidas na literatura, como a expressão de CD68, SR-A, *ROCK1* e *ROCK2* e a fosforilação de *MYPT1* (Yang et al., 2017), capacidade de exercer atividade fagocitária (Prasad et al., 2020) e polarização nos fenótipos M1 e M2 (Smith et al., 2018).

Os perfis M1 e M2 são considerados extremos de uma ampla plasticidade fenotípica de macrófagos (Tedesco et al., 2018). Os macrófagos M1 atuam na produção de citocinas pró-inflamatórias e mediam a resistência a patógenos por fortes propriedades microbidas, contribuindo também para a destruição tecidual (Fleetwood et al., 2017). Tem sua característica definida pela alta capacidade de secretar citocinas como IL-1 β , TNF- α , IL-12 e IL-18; fenotipicamente, expressam altos níveis do complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC-II), CD68 e moléculas coestimuladoras como CD80 e CD86 (Billiau et al., 2009). Os macrófagos M1 também regulam positivamente a expressão da proteína intracelular supressora da sinalização da citocina 3, e ativam a sintase do óxido nítrico induzível (iNOS) gerando NO, assim, os macrófagos M1, quando estimulados, podem exacerbar os processos inflamatórios (Okamoto et al., 2004). Já os macrófagos M2 são normalmente caracterizados através da expressão do receptor de manose do macrófago (MMR), chamado CD206, e pela regulação positiva da glicoproteína de membrana CD200R (Jaguin et al., 2013). Eles são ativados por uma via oposta à via clássica, e quando na presença de estímulos gerados por CSF-1, IL-4, IL-10, TGF- β e IL-13, ou de infecções por fungos e helmintos, tendem a liberar *IL-10* em altas concentrações e *IL-12* em pequenas quantidades (Jenkins et al., 2013).

Os macrófagos são capazes de reconhecer diferentes componentes bacterianos incluindo o LPS através dos receptores de reconhecimento de padrões como o receptor Toll-like (*TLR*). O reconhecimento desses componentes bacterianos, induz sinais celulares necessários para a resposta

imune inata, e os sinais responsáveis pela expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF- α , a IL-1 β e a IL-6, e polarização M1 (Ueno et al., 2021).

Neste trabalho, macrófagos derivados da linhagem U937 foram tratados com sobrenadantes de CTMs infectadas ou não por *T. cruzi*, e estimulados por LPS, com o intuito de avaliar como esses tratamentos iriam interferir no processo de ativação e polarização macrofágica. Foi feita a dosagem de NO de todos os grupos experimentais. Na ausência de estimulação com LPS, os grupos de macrófagos que foram tratados com sobrenadante de CTMs infectadas e não infectadas por *T. cruzi*, apresentaram secreção de NO em níveis baixos, quando comparado às amostras estimuladas por LPS.

Quando se observa os níveis de secreção de NO, no grupo que foi tratado com o sobrenadante de CTMs infectadas, percebe-se diferenças entre as CTMs 1 e 3. Nos grupos não estimulados pelo LPS, os macrófagos tratados com o sobrenadante das CTMs 1 e 3 apresentaram o menor nível de secreção de NO. O grupo tratado com o sobrenadante da CTM 2 foi o que apresentou maior secreção de NO na ausência do estímulo por LPS. Quando esses mesmos grupos foram estimulados por LPS, a liberação de NO foi maior. O grupo tratado com o sobrenadante da CTM 2 foi o que apresentou o maior nível de liberação de NO. Os grupos tratados com os sobrenadantes das CTM 1 e 3 apresentaram níveis de liberação de NO, semelhantes. Nos grupos experimentais que foram tratados com o sobrenadante de CTMs infectadas pelo *T. cruzi* e estimulados com LPS, foi possível perceber um comprometimento da capacidade de supressão da liberação de NO nos sobrenadantes das CTM 2 e 3 infectadas, em comparação aos sobrenadantes destas células não infectadas. No grupo tratado com o sobrenadante da CTM 1 infectada e não infectada, teve um nível de liberação de NO semelhante, apesar de demonstrar um leve aumento da capacidade de supressão da liberação de NO pelo sobrenadante das CTM 1 infectadas por *T. cruzi*. Foi possível observar, portanto, diferenças individuais entre as replicatas biológicas, mas mesmo assim, é possível perceber que infecção por *T. cruzi* é capaz de alterar a capacidade de secreção de óxido nítrico em algumas amostras biológicas de CTMs, fazendo com que as CTMs modulem

de forma menos eficiente a função macrófágica, mesmo mediante ao estímulo do LPS.

Para ampliar as análises desses grupos experimentais, foi feito PCR em tempo real com o objetivo de avaliar a expressão gênica de citocinas pró e anti-inflamatórias expressas em macrófagos e indicativas de polarização M1 e M2. É importante salientar que a estimulação de macrófagos por LPS induz uma ativação e polarização M1, caracterizada pelo fenótipo pró-inflamatório com habilidades de matar patógenos (Orecchioni et al., 2019). Para a avaliação da expressão gênica, os genes *IL-1 β* e *TNF- α* , e *IL-10* foram avaliados, e o gene *GAPDH* foi usado como controle. A literatura relata que um dos fatores que pode inibir a expressão de *TNF- α* , é a *IL-10*, que será produzida pelos macrófagos durante a ativação por LPS (Baer et al., 1998; de Waal Malefyt et al., 1991).

Quando os macrófagos são tratados com sobrenadante de CTMs não infectadas, a expressão de todos os genes apresenta níveis baixos, no entanto, quando o mesmo grupo é estimulado por LPS, percebe-se um leve aumento na expressão. Agora quando os macrófagos são tratados com o sobrenadante de CTMs infectadas pelo *T. cruzi*, a expressão de *TNF- α* é maior entre os doadores 1 e 2 de CTMs, e quando esses mesmos grupos são estimulados por LPS, é possível perceber que o doador 3 de CTM, expressa mais *IL-10*. De acordo com a literatura, a polarização M1 é caracterizada pela produção de níveis altos de citocinas pró-inflamatórias, tais como a *IL-1 β* e o *TNF- α* (Davis et al., 2013). Um estado predominantemente pró-inflamatório é apresentado pela expressão de *TNF- α* . O estado de cicatrização tecidual é caracterizado pela expressão de *IL-10* após estimulação com LPS. Os macrófagos mudam seu estado de polarização com base em diversos estímulos a que são expostos (Fleetwood et al., 2007).

A literatura relata que quando as CTMs são co-cultivadas com macrófagos, percebe-se uma indução a polarização para o fenótipo M2, e como consequência, a expressão de citocinas pró-inflamatórias como o *TNF- α* , *IL-1 β* , *IFN- γ* , é reduzida (Wang et al., 2018). Além disso, foi demonstrado em um modelo murino de colite, que as CTMs regulam negativamente a proliferação de

células TH1, ativam Tregs e aumentam a expressão de IL-10 que vão atuar em conjunto aos macrófagos ativados (González et al., 2008).

No contexto da doença de Chagas, a interação do *T. cruzi* com macrófagos induz a um aumento substancial na expressão e secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF- α , IL-1 β , IL-6 (Koo et al., 2016). Quando os macrófagos são infectados pelo *T. cruzi*, eles produzem IL-12, que é um mediador para a produção de IFN- γ através da ativação de células NK e da indução de células Th1 (Lopez, Marcos et al., 2018) . O IFN- γ será necessário no processo de ativação da expressão de macrófagos, na ativação de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), na NADPH oxidase (NOX2), e na produção de NO (Castro et al., 2018). O TNF- α também pode fornecer um segundo sinal estimulando a produção de NO/ROS em macrófagos ativados por IFN- γ , bem como em miócitos cardíacos infectados e, assim, aumentar a função tripanocida (Lopez, Marcos et al., 2018). Portanto, em doadores nos quais o sobrenadante das CTMs promoveram polarização M1, é possível que a infecção pelo *T. cruzi* esteja promovendo o aumento da regulação de genes relacionados à resposta pró-inflamatória. Nos doadores nos quais o sobrenadante das CTMs promoveram polarização M2, é possível que a presença do *T. cruzi* tenha um efeito potencializador no efeito anti-inflamatório das CTM infectadas.

Ainda com o objetivo de verificar se a infecção das CTMs por *T. cruzi* comprometeria sua capacidade de imunomodulação parácrina, foi feito um ensaio utilizando PBMCs, que foram isolados de três doadores. Essas PBMCs foram tratadas com o sobrenadante de CTMs infectadas e não infectadas por *T. cruzi* e estimulados por PHA. Uma das maneiras de se fazer a avaliação das propriedades associadas à imunomodulação é através da avaliação da supressão da proliferação de leucócitos efetores. A maioria dos leucócitos efetores, como linfócitos T e os monócitos, têm sua capacidade de proliferação aumentada quando estimulados ou ativados (Hsu et al., 2015). A função imunomoduladora pode ser avaliada quando a supressão da proliferação é evidenciada. A marcação dessas células pelo CFSE permite a avaliação da proliferação de populações celulares específicas (Quah et al., 2007). O CFSE é um corante celular fluorescente que pode ser avaliado por análise de citometria

de fluxo. Durante o processo de divisão celular, a intensidade desse marcador celular diminui proporcionalmente; através da diminuição gradual da intensidade, é possível realizar a determinação dos níveis de proliferação celular, e avaliar até 8 divisões celulares (Hsu et al., 2015).

Após isolar as PBMCs de três doadores distintos e marcar essas células com CFSE, um dos grupos experimentais foi tratado com o mitógeno PHA. Os mitógenos, também são chamados ativadores de linfócitos policlonais, e são capazes de induzir a proliferação através do processo de mitose (Wimer et al., 1996). Os mitógenos atuam através de ligações com os receptores de membrana, e ativam a adenilato ciclase (seguida pela síntese de adenosina monofosfato cíclico) ou guanilato ciclase (seguida pela síntese de guanosina monofosfato cíclico), que faz com que as células produzam citocinas específicas para montar a resposta imune (Watrang et al., 2012). A PHA é obtida através do extrato de lectina do feijão-vermelho, e dispõe de atividades de aglutinação celular e mitogênicas bem potentes (Goossens et al., 1994). As subunidades da PHA, são reativas de leucócitos (L) e reativas de eritrócitos (E). A subunidade L, tem uma afinidade grande pelos receptores de superfície dos linfócitos, e uma pequena afinidade pelos eritrócitos, sendo assim, é responsável pelas propriedades mitogênicas das isolectinas, já a subunidade E, é responsável pelas propriedades aglutinantes dos eritrócitos (Hamelryck et al., 1996).

Na análise por citometria de fluxo foi possível perceber que todos os grupos que foram tratados com sobrenadante de CTMs e não estimulados por PHA, independentemente de terem sido infectadas ou não pelo *T. cruzi*, apresentaram picos que não indicavam proliferação de linfócitos T, no entanto, quando esse grupo foi comparado ao controle, todos teriam um nível de proliferação maior que 90%. Desta forma, os grupos de PBMCs, tratados com sobrenadante e CTMs infectados e não infectados que não sofreram estímulo pelo PHA, foram utilizados como controle para prosseguir com a análise do grupo com PHA. Nos grupos que foram estimulados por PHA, percebeu-se que o tratamento com o sobrenadante das CTMs que foram infectadas pelo *T. cruzi*, são capazes de aumentar a proliferação de PBMC. No entanto, houve diferença nos níveis de proliferação entre os doadores de CTMs. A expressão gênica dos

grupos de PBMCs tratados com sobrenadantes de CTMs infectados pelo *T. cruzi* apresentou níveis baixos de expressão de todos os genes, mesmo na presença do estímulo por PHA.

Tomados juntos, os resultados deste trabalho demonstram a infecção de CTMs por *T. cruzi* e as alterações funcionais desencadeadas pelo parasitismo. Considerando as replicatas biológicas das CTM e PBMCs utilizadas no trabalho, os dados obtidos refletem a diversidade entre as amostras, já descritas na literatura. Esta diversidade é compatível com os diferentes perfis inflamatórios de cada doador de CTM e PBMC, além da diversidade da história clínica de pacientes com doença de Chagas.

8. Conclusão, perspectivas e limitações

Este trabalho foi realizado durante o período da pandemia de COVID-19. A interrupção das atividades presenciais na Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília limitou o período disponível para a execução da parte prática desta dissertação. Dentre as limitações estão a grande variação entre os resultados obtidos nas diferentes amostras biológicas de CTMs e PBMCs, além da baixa carga parasitária encontrada em uma das amostras de CTMs. Ainda assim, os achados do presente trabalho permitem sugerir que as CTMs do tecido adiposo de humanos saudáveis podem ser infectadas pelo parasito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. A infecção atinge níveis altos de toxicidade celular a partir do 14.^o dia de infecção, fazendo com que as CTMs percam sua viabilidade. Como o presente trabalho foi realizado *in vitro*, futuras avaliações *in vivo* da infecção de CTMs endógenas por *T. cruzi* é relevante. Os dados obtidos demonstram também existência de diferenças individuais no imunofenótipo, taxa proliferativa, e na expressão de genes relacionados à capacidade imunodulatória entre as CTMs derivadas de diferentes doadores. Essa diversidade permanece em evidência em todos os ensaios realizados, fazendo com que seja necessário o aumento do número de doadores e uma melhor caracterização de suas particularidades biológicas, como idade, sexo, obesidade, comorbidades, etc, para que seja possível compreender o impacto da infecção de *T. cruzi* sobre

estas células. Considerando que o secretoma das CTM é composto por uma diversidade de moléculas e vesículas extracelulares, a investigação do impacto da infecção por *T. cruzi* sobre a composição deste secretoma também é uma perspectiva deste estudo. Em última instância, será relevante compreender se as alterações observadas em populações de CTMs infectadas por *T. cruzi* impactam o prognóstico da infecção.

9. Referências

Abdi, R., Fiorina, P., Adra, C. N., Atkinson, M., & Sayegh, M. H. (2008). Immunomodulation by mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes. *Diabetes*, 57(7), 1759–1767. <https://doi.org/10.2337/db08-0180>

Abuhab, A., Trindade, E., Aulicino, G. B., Fujii, S., Bocchi, E. A., & Bacal, F. (2013). Chagas' cardiomyopathy: the economic burden of an expensive and neglected disease. *International journal of cardiology*, 168(3), 2375–2380. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.01.262>

Aboalola, D., & Han, V. (2017). Different Effects of Insulin-Like Growth Factor-1 and Insulin-Like Growth Factor-2 on Myogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem cells international*, 2017, 8286248. <https://doi.org/10.1155/2017/8286248>

Abomaray, F. M., Al Jumah, M. A., Alsaad, K. O., Jawdat, D., Al Khaldi, A., AlAskar, A. S., Al Harthy, S., Al Subayyil, A. M., Khatlani, T., Alawad, A. O., Alkushi, A., Kalionis, B., & Abumaree, M. H. (2016). Phenotypic and Functional Characterization of Mesenchymal Stem/Multipotent Stromal Cells from Decidua Basalis of Human Term Placenta. *Stem cells international*, 2016, 5184601. <https://doi.org/10.1155/2016/5184601>

Acevedo, G. R., Girard, M. C., & Gómez, K. A. (2018). The Unsolved Jigsaw Puzzle of the Immune Response in Chagas Disease. *Frontiers in immunology*, 9, 1929. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01929>

Acosta JR, Tavira B, Douagi I, Kulyté A, Arner P, Rydén M, Laurencikiene J. Human-Specific Function of IL-10 in Adipose Tissue Linked to Insulin Resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2019 Oct 1;104(10):4552-4562. doi: 10.1210/jc.2019-00341.

Afizah, H., Yang, Z., Hui, J. H., Ouyang, H. W., & Lee, E. H. (2007). A comparison between the chondrogenic potential of human bone marrow stem cells (BMSCs) and adipose-derived stem cells (ADSCs) taken from the same donors. *Tissue engineering*, 13(4), 659–666. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.0118>

Anderson, P., Carrillo-Gálvez, A. B., García-Pérez, A., Cobo, M., & Martín, F. (2013). CD105 (endoglin)-negative murine mesenchymal stromal cells define a new multipotent subpopulation with distinct differentiation and immunomodulatory capacities. *PloS one*, 8(10), e76979. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076979>

Alexandre-Ramos DS, Silva-Carvalho AÉ, Lacerda MG, Serejo TRT, Franco OL, Pereira RW, Carvalho JL, Neves FAR, Saldanha-Araujo F. LL-37 treatment on human peripheral blood mononuclear cells modulates immune response and promotes regulatory T-cells generation. *Biomed Pharmacother.* 2018 Dec; 108:1584-1590. doi: 10.1016/j.biopha.2018.10.014.

Al-Ghadban, S., & Bunnell, B. A. (2020). Adipose Tissue-Derived Stem Cells: Immunomodulatory Effects and Therapeutic Potential. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 35(2), 125–133. <https://doi.org/10.1152/physiol.00021.2019>

Aliberti, J. C., Cardoso, M. A., Martins, G. A., Gazzinelli, R. T., Vieira, L. Q., & Silva, J. S. (1996). Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infection and immunity*, 64(6), 1961–1967. <https://doi.org/10.1128/iai.64.6.1961-1967.1996>

Andrade, J. P., Marin Neto, J. A., Paola, A. A., Vilas-Boas, F., Oliveira, G. M., Bacal, F., Bocchi, E. A., Almeida, D. R., Fragata Filho, A. A., Moreira,

M., Xavier, S. S., Oliveira Junior, W. A., & Dias, J. C. (2011). I Latin American Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas' heart disease: executive summary. *Arquivos brasileiros de cardiologia*, 96(6), 434–442. <https://doi.org/10.1590/s0066-782x2011000600002>

Andrade, S. G., & Magalhães, J. B. (1997). Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 30(1), 27–35. <https://doi.org/10.1590/s0037-86821997000100006>

Andrade V, Andrade SG, Barrai Netto M, Pontes AL, Castro R. Avaliação do comportamento de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi* na infecção de seis linhagens isogênicas de camundongos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1985 Jul-Set.18(3): 143-154.

Andrade V, Brodskyn C, Andrade SG. Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 77:796-799, 1983.

Andrade, Z. A., & Silva, H. R. (1995). Parasitism of adipocytes by *Trypanosoma cruzi*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 90(4), 521–522. <https://doi.org/10.1590/s0074-02761995000400018>

Ahmed, T. A., & El-Badri, N. (2018). Pericytes: The Role of Multipotent Stem Cells in Vascular Maintenance and Regenerative Medicine. *Advances in experimental medicine and biology*, 1079, 69–86. https://doi.org/10.1007/5584_2017_138

Andrzejewska A, Lukomska B, Janowski M. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost. *Stem Cells Journals*. 2019 Apr. doi.org/10.1002/stem.3016.

Aggarwal, S., & Pittenger, M. F. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 105(4), 1815–1822. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1559>

Aqmasheh, S., Shamsasanjan, K., Akbarzadehlaleh, P., Pashoutan Sarvar, D., & Timari, H. (2017). Effects of Mesenchymal Stem Cell Derivatives on Hematopoiesis and Hematopoietic Stem Cells. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 7(2), 165–177. <https://doi.org/10.15171/apb.2017.021>

Bartholomew, A., Sturgeon, C., Siatskas, M., Ferrer, K., McIntosh, K., Patil, S., Hardy, W., Devine, S., Ucker, D., Deans, R., Moseley, A., & Hoffman, R. (2002). Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Experimental hematology*, 30(1), 42–48. [https://doi.org/10.1016/s0301-472x\(01\)00769-x](https://doi.org/10.1016/s0301-472x(01)00769-x)

Baer M, Dillner A, Schwartz RC, Sedon C, Nedospasov S, Johnson PF. Tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages is attenuated by an autocrine factor that preferentially induces NF-kappaB p50. *Mol Cell Biol*. 1998 Oct;18(10):5678-89. doi: 10.1128/MCB.18.10.5678.

Baer, P. C., Koch, B., Hickmann, E., Schubert, R., Cinatl, J., Jr, Hauser, I. A., & Geiger, H. (2019). Isolation, Characterization, Differentiation and Immunomodulatory Capacity of Mesenchymal Stromal/Stem Cells from Human Perirenal Adipose Tissue. *Cells*, 8(11), 0. <https://doi.org/10.3390/cells8111346>

Boháčová, P., & Holáň, V. (2018). Mesenchymal stem cells and type 1 diabetes treatment. *Mezenchymální kmenové buňky a léčba diabetu 1. typu*. *Vnitřní lékařství*, 64(7-8), 725–728.

Bai, L., Lennon, D. P., Caplan, A. I., DeChant, A., Hecker, J., Kranso, J., Zaremba, A., & Miller, R. H. (2012). Hepatocyte growth factor mediates mesenchymal stem cell-induced recovery in multiple sclerosis models. *Nature neuroscience*, 15(6), 862–870. <https://doi.org/10.1038/nn.3109>

Baraniak, P. R., & McDevitt, T. C. (2010). Stem cell paracrine actions and tissue regeneration. *Regenerative medicine*, 5(1), 121–143. <https://doi.org/10.2217/rme.09.74>

Bern, C., Martin, D. L., & Gilman, R. H. (2011). Acute and congenital Chagas disease. *Advances in parasitology*, 75, 19–47. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385863-4.00002-2>

Bern, C., Messenger, L. A., Whitman, J. D., & Maguire, J. H. (2019). Chagas Disease in the United States: a Public Health Approach. *Clinical microbiology reviews*, 33(1), e00023-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00023-19>

Bernardo, M. E., & Fibbe, W. E. (2013). Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell stem cell*, 13(4), 392–402. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.09.006>

Billiau, A., & Matthys, P. (2009). Interferon-gamma: a historical perspective. *Cytokine & growth factor reviews*, 20(2), 97–113. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.02.004>

Bonney, K. M., Luthringer, D. J., Kim, S. A., Garg, N. J., & Engman, D. M. (2019). Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. *Annual review of pathology*, 14, 421–447. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020117-043711>

Bouffi, C., Bony, C., Courties, G., Jorgensen, C., & Noël, D. (2010). IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. *PloS one*, 5(12), e14247. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014247>

Boscardin, S. B., Torrecilhas, A. C., Manarin, R., Revelli, S., Rey, E. G., Tonelli, R. R., & Silber, A. M. (2010). Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. *Journal of cellular and molecular*

medicine, 14(6B), 1373–1384. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01007.x>

Bozzi A, Sayed N, Matsa E, Sass G, Neofytou E, V.Clemons K, Correa-Oliveira R, A. Stevens D, and C. Wu J. Using Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes as a Model to Study *Trypanosoma cruzi* Infection. Stem Cell Reports. 2019;12. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.04.017>.

Brenière, S. F., Waleckx, E., & Barnabé, C. (2016). Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. PLoS neglected tropical diseases, 10(8), e0004792. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004792>

Bruder, S. P., Jaiswal, N., & Haynesworth, S. E. (1997). Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. Journal of cellular biochemistry, 64(2), 278–294. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4644\(199702\)64:2<278::aid-jcb11>3.0.co;2-f](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4644(199702)64:2<278::aid-jcb11>3.0.co;2-f)

Cabral-Piccin, M. P., Guillermo, L. V., Vellozo, N. S., Filardy, A. A., Pereira-Marques, S. T., Rigoni, T. S., Pereira-Manfro, W. F., DosReis, G. A., & Lopes, M. F. (2016). Apoptotic CD8 T-lymphocytes disable macrophage-mediated immunity to *Trypanosoma cruzi* infection. Cell death & disease, 7(5), e2232. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.135>

Camandaroba, E. L., Campos, R. F., Magalhães, J. B., & Andrade, S. G. (2001). Clonal structure of *Trypanosoma cruzi* Colombian strain (biodeme Type III): biological, isoenzymic and histopathological analysis of seven isolated clones. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 34(2), 151–157. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822001000200001>

Camandaroba, Edson Luiz Paes et al. Clonal structure of *Trypanosoma cruzi* Colombian strain (biodeme Type III): biological, isoenzymic and

histopathological analysis of seven isolated clones. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* [online]. 2001, v. 34, n. 2, pp. 151-157. doi.org/10.1590/S0037-86822001000200001.

Camandaroba, E., Thé, T. S., Pessina, D. H., & Andrade, S. G. (2006). *Trypanosoma cruzi*: clones isolated from the Colombian strain, reproduce the parental strain characteristics, with ubiquitous histotropism. *International journal of experimental pathology*, 87(3), 209–217. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2006.00476.x>

Campioni, D., Rizzo, R., Stignani, M., Melchiorri, L., Ferrari, L., Moretti, S., Russo, A., Bagnara, G. P., Bonsi, L., Alviano, F., Lanzoni, G., Cuneo, A., Baricordi, O. R., & Lanza, F. (2009). A decreased positivity for CD90 on human mesenchymal stromal cells (MSCs) is associated with a loss of immunosuppressive activity by MSCs. *Cytometry. Part B, Clinical cytometry*, 76(3), 225–230. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20461>

Capilla-González, V., López-Beas, J., Escacena, N., Aguilera, Y., de la Cuesta, A., Ruiz-Salmerón, R., Martín, F., Hmadcha, A., & Soria, B. (2018). PDGF Restores the Defective Phenotype of Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells from Diabetic Patients. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 26(11), 2696–2709. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.08.011>

Caradonna, K. L., & Burleigh, B. A. (2011). Mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Advances in parasitology*, 76, 33–61. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385895-5.00002-5>

Castro, F., Cardoso, A. P., Gonçalves, R. M., Serre, K., & Oliveira, M. J. (2018). Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. *Frontiers in immunology*, 9, 847. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00847>

Cerbán, F. M., Stempin, C. C., Volpini, X., Carrera Silva, E. A., Gea, S., & Motran, C. C. (2020). Signaling pathways that regulate *Trypanosoma cruzi*

infection and immune response. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1866(5), 165707. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165707>

Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., & Middleton, J. (2007). Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 25(11), 2739–2749. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0197>

Choe, S. S., Huh, J. Y., Hwang, I. J., Kim, J. I., & Kim, J. B. (2016). Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Frontiers in endocrinology*, 7, 30. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00030>

Claudio-da-Silva César, Baptista Leandra Santos, Carias Rosana Bizon Vieira, Menezes Neto Hélio da Cunha, Borojevic Radovan. Cultura autóloga de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo para o tratamento de ríctides faciais. *Rev. Col. Bras. Cir.* 2009 Aug; 36(4): 288-291. doi.org/10.1590/S0100-69912009000400003.

Combs, T. P., Nagajyothi, Mukherjee, S., de Almeida, C. J., Jelicks, L. A., Schubert, W., Lin, Y., Jayabalan, D. S., Zhao, D., Braunstein, V. L., Landskroner-Eiger, S., Cordero, A., Factor, S. M., Weiss, L. M., Lisanti, M. P., Tanowitz, H. B., & Scherer, P. E. (2005). The adipocyte as an important target cell for *Trypanosoma cruzi* infection. *The Journal of biological chemistry*, 280(25), 24085–24094. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412802200>

Contreras, R. A., Figueroa, F. E., Djouad, F., & Luz-Crawford, P. (2016). Mesenchymal Stem Cells Regulate the Innate and Adaptive Immune Responses Dampening Arthritis Progression. *Stem cells international*, 2016, 3162743. <https://doi.org/10.1155/2016/3162743>

Corselli, M., Chin, C. J., Parekh, C., Sahaghian, A., Wang, W., Ge, S., Evseenko, D., Wang, X., Montelatici, E., Lazzari, L., Crooks, G. M., & Péault, B. (2013). Perivascular support of human hematopoietic stem/progenitor

cells. *Blood*, 121(15), 2891–2901. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-08-451864>

Costa, R. P., Gollob, K. J., Fonseca, L. L., Rocha, M. O., Chaves, A. C., Medrano-Mercado, N., Araújo-Jorge, T. C., Antas, P. R., Colley, D. G., Correa-Oliveira, R., Gazzinelli, G., Carvalho-Parra, J., & Dutra, W. O. (2000). T-cell repertoire analysis in acute and chronic human Chagas' disease: differential frequencies of Vbeta5 expressing T cells. *Scandinavian journal of immunology*, 51(5), 511–519. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.2000.00706.x>

Coura, J. R., & Borges-Pereira, J. (2011). Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(6), 641–645. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762011000600001>

Courtney, J. M., & Sutherland, B. A. (2020). Harnessing the stem cell properties of pericytes to repair the brain. *Neural regeneration research*, 15(6), 1021–1022. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.270301>

Covarrubias Charles, Ferreira Daniele & Yoshida Nobuko. Interaction with host factors exacerbates *Trypanosoma cruzi* cell invasion capacity upon oral infection. *International journal for parasitology*. (2008). 37. 1609-16. Doi: 10.1016/j.ijpara.2007.05.013.

Dalal, J., Gandy, K., & Domen, J. (2012). Role of mesenchymal stem cell therapy in Crohn's disease. *Pediatric research*, 71(4 Pt 2), 445–451. <https://doi.org/10.1038/pr.2011.56>

Dantas R. O. (2021). Management of Esophageal Dysphagia in Chagas Disease. *Dysphagia*, 36(3), 517–522. <https://doi.org/10.1007/s00455-021-10297-1>

Danisovic, L., Varga, I., Polák, S., Ulicná, M., Hlavacková, L., Böhmer, D., & Vojtassák, J. (2009). Comparison of in vitro chondrogenic potential of

human mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *General physiology and biophysics*, 28(1), 56–62.

Davis MJ, Tsang TM, Qiu Y, Dayrit JK, Freij JB, Huffnagle GB, Olszewski MA. Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. *mBio*. 2013 Jun 18;4(3):e00264-13. doi: 10.1128/mBio.00264-13.

de Carvalho JL, Zonari A, de Paula AC, Martins TM, Gomes DA, Goes AM. Production of Human Endothelial Cells Free from Soluble Xenogeneic Antigens for Bioartificial Small Diameter Vascular Graft Endothelization. *Biomed Res Int*. 2015;2015:652474. doi: 10.1155/2015/652474.

de Kretser D. (2007). Totipotent, pluripotent or unipotent stem cells: a complex regulatory enigma and fascinating biology. *Journal of law and medicine*, 15(2), 212–218.

de Meis, J., Barreto de Albuquerque, J., Silva Dos Santos, D., Farias-de-Oliveira, D. A., Berbert, L. R., Cotta-de-Almeida, V., & Savino, W. (2013). *Trypanosoma cruzi* Entrance through Systemic or Mucosal Infection Sites Differentially Modulates Regional Immune Response Following Acute Infection in Mice. *Frontiers in immunology*, 4, 216. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00216>

de Pablos Torr  LM, Renata Moreira L, Osuna A. Extracellular Vesicles in Chagas Disease: A New Passenger for an Old Disease. *Front Microbiol*. 2018 Jun 1;9:1190. doi: 10.3389/fmicb.2018.01190.

de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med*. 1991 Nov 1;174(5):1209-20. doi: 10.1084/jem.174.5.1209.

Dennis, J. E., Carbillet, J. P., Caplan, A. I., & Charbord, P. (2002). The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. *Cells, tissues, organs*, 170(2-3), 73–82. <https://doi.org/10.1159/000046182>

Deng A, Zhang H, Hu M, Liu S, Gao Q, Wang Y, Guo C. Knockdown of Indian hedgehog protein induces an inhibition of cell growth and differentiation in osteoblast MC3T3-E1 cells. *Mol Med Rep*. 2017 Dec;16(6):7987-7992. doi: 10.3892/mmr.2017.7669.

Dias JCP, Schofield CJ. The evolution of Chagas disease (American Trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* [Internet]. 1999 Sep; 94(Suppl 1): 103-121. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761999000700011>.

Dias João Carlos Pinto, Ramos Jr. Alberto Novaes, Gontijo Eliane Dias, Luquetti Alejandro, Shikanai-Yasuda Maria Aparecida, Coura José Rodrigues et al . II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. *Epidemiol. Serv. Saúde*. 2016 Jun; 25(spe): 7-86. <http://dx.doi.org/10.5123/s1679-49742016000500002>.

Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*. 2011;20(1):5-14. doi: 10.3727/096368910X.

do Carmo Neto, J. R., da Costa, A., Braga, Y., Lucio, F. H., Dos Santos Martins, A., Dos Reis, M. A., de Oliveira, F. A., Celes, M., da Silva, M. V., Oliveira, M., & Machado, J. R. (2022). The Colombian Strain of *Trypanosoma cruzi* Induces a Proinflammatory Profile, Neuronal Death, and Collagen Deposition in the Intestine of C57BL/6 Mice Both during the Acute and Early Chronic Phase. *Mediators of inflammation*, 2022, 7641357. <https://doi.org/10.1155/2022/7641357>

Dos Reis, G. A., Ribeiro-Gomes, F. L., Guillermo, L. V., & Lopes, M. F. (2007). Cross-talk between apoptosis and cytokines in the regulation of parasitic infection. *Cytokine & growth factor reviews*, 18(1-2), 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2007.01.009>

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7. doi: 10.1080/14653240600855905.

Dumolin, Peter C.; Burleigh, Barbara A. Stress-induced proliferation and cell cycle plasticity of intracellular *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *mBio*, [S. l.], v. 9, n. 4, 2018. Doi: 10.1128/mBio.00673-18.

Dutra, W. O., & Gollob, K. J. (2008). Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Current opinion in infectious diseases*, 21(3), 287–292. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e3282f88b80>

El Gharib, A., & Dantas, R. O. (2021). Cross-Sectional Study of Swallowing Phases in Cases of Megaesophagus Caused by Chagas Disease. *Gastroenterology research*, 14(5), 290–295. <https://doi.org/10.14740/gr1458>

Federici EE, Abelman WB, Neva FA. Chronic and progressive myocarditis and myositis in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi* *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 13:272-280, 1964.

Ferreira, A. V., Segatto, M., Menezes, Z., Macedo, A. M., Gelape, C., de Oliveira Andrade, L., Nagajyothi, F., Scherer, P. E., Teixeira, M. M., & Tanowitz, H. B. (2011). Evidence for *Trypanosoma cruzi* in adipose tissue in human chronic Chagas disease. *Microbes and infection*, 13(12-13), 1002–1005. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.06.002>

Fleetwood AJ, Lawrence T, Hamilton JA, Cook AD. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. *J Immunol*. (2007) 178:5245–52. doi: 10.4049/jimmunol.178.8.5245.

François, M., Romieu-Mourez, R., Li, M., & Galipeau, J. (2012). Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 20(1), 187–195. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.189>

Franzè, E., Laudisi, F., Di Grazia, A. *et al.* Macrophages produce and functionally respond to interleukin-34 in colon cancer. *Cell Death Discov.* **6**, 117 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41420-020-00350-7>.

Fink, Trine, and Vladimir Zachar. “Adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells.” *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* vol. 698 (2011): 243-51. doi:10.1007/978-1-60761-999-4_19

Fijany A, Sayadi LR, Khoshab N, Banyard DA, Shaterian A, Alexander M, Lakey JRT, Paydar KZ, Evans GRD, Widgerow AD. Mesenchymal stem cell dysfunction in diabetes. *Mol Biol Rep.* 2019 Feb;46(1):1459-1475. doi: 10.1007/s11033-018-4516-x.

Fujimura, J., Ogawa, R., Mizuno, H., Fukunaga, Y., & Suzuki, H. (2005). Neural differentiation of adipose-derived stem cells isolated from GFP transgenic mice. *Biochemical and biophysical research communications*, 333(1), 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.05.096>

Gachet-Castro, C., Freitas-Castro, F., Gonzáles-Córdova, R. A., da Fonseca, C. K., Gomes, M. D., Ishikawa-Ankerhold, H. C., & Baqui, M. (2021). Modulation of the Host Nuclear Compartment by *Trypanosoma cruzi* Uncovers Effects on Host Transcription and Splicing Machinery. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 718028. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.718028>

G, Yu F, Lei T, Gao H, Li P, Sun Y, Huang H, Mu Q. Bone marrow mesenchymal stem cell therapy in ischemic stroke: mechanisms of action and treatment optimization strategies. *Neural Regen Res.* 2016 Jun;11(6):1015-24. doi: 10.4103/1673-5374.184506.

Gao F, Chiu SM, Motan DA, Zhang Z, Chen L, Ji HL, Tse HF, Fu QL, Lian Q. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death Dis.* 2016 Jan 21;7(1):e2062. doi: 10.1038/cddis.2015.327.

Gao ZW, Dong K, Zhang HZ. The roles of CD73 in cancer. *Biomed Res Int.* 2014;2014:460654. doi: 10.1155/2014/460654.

Ghannam, S., Bouffi, C., Djouad, F., Jorgensen, C., & Noël, D. (2010). Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem cell research & therapy*, 1(1), 2. <https://doi.org/10.1186/scrt2>

Gibaldi, D., Vilar-Pereira, G., Pereira, I. R., Silva, A. A., Barrios, L. C., Ramos, I. P., Mata Dos Santos, H. A., Gazzinelli, R., & Lannes-Vieira, J. (2020). CCL3/Macrophage Inflammatory Protein-1 α Is Dually Involved in Parasite Persistence and Induction of a TNF- and IFN γ -Enriched Inflammatory Milieu in *Trypanosoma cruzi*-Induced Chronic Cardiomyopathy. *Frontiers in immunology*, 11, 306. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00306>

Glass, C. K., & Natoli, G. (2016). Molecular control of activation and priming in macrophages. *Nature immunology*, 17(1), 26–33. <https://doi.org/10.1038/ni.3306>

Goldenberg RC, Jelicks LA, Fortes FS, Weiss LM, Rocha LL, Zhao D, Carvalho AC, Spray DC, Tanowitz HB. Bone marrow cell therapy ameliorates and reverses chagasic cardiomyopathy in a mouse model. *J Infect Dis.* 2008 Feb 15;197(4):544-7. doi: 10.1086/526793.

González MA, Gonzalez-Rey E, Rico L, Büscher D, Delgado M. Adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses. *Gastroenterology* 136: 978–989, 2009.

González, M. A., Gonzalez-Rey, E., Rico, L., Büscher, D., & Delgado, M. (2009). Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis and rheumatism*, 60(4), 1006–1019. <https://doi.org/10.1002/art.24405>

Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982 Oct;126(1):131-8. doi: 10.1016/0003-2697(82)90118-x. PMID: 7181105.

Goossens A, Geremia R, Bauw G, Van Montagu M, Angenon G. Isolation and characterisation of arcelin-5 proteins and cDNAs. *Eur J Biochem*. 1994;225(3):787-795. doi:10.1111/j.1432-1033.1994.0787b.x

Guarita-Souza LC, Carvalho KA, Woitowicz V, Rebelatto C, Senegaglia A, Hansen P, Miyague N, Francisco JC, Olandoski M, Faria-Neto JR, Brofman P. Simultaneous autologous transplantation of cocultured mesenchymal stem cells and skeletal myoblasts improves ventricular function in a murine model of Chagas disease. *Circulation*. 2006 Jul 4;114(1 Suppl):I120-4. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.000646.

György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, László V, Pállinger E, Pap E, Kittel A, Nagy G, Falus A, Buzás EI. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci*. 2011 Aug;68(16):2667-88. doi: 10.1007/s00018-011-0689-3.

Hamelryck, T. W., Dao-Thi, M. H., Poortmans, F., Chrispeels, M. J., Wyns, L., & Loris, R. (1996). The crystallographic structure of phytohemagglutinin-L. *The Journal of biological chemistry*, 271(34), 20479–20485. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.34.20479>

Hamid, A. A. et al. Characterization of human adipose-derived stem cells and expression of chondrogenic genes during induction of cartilage differentiation. *CLINICS*, v. 67, n. 2, p. 99–106, 2012.

Hanna, H., Mir, L. M., & Andre, F. M. (2018). In vitro osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells generates cell layers with distinct properties. *Stem cell research & therapy*, 9(1), 203. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0942-x>

Hearing SD, Norman M, Probert CS, Haslam N, Dayan CM. Predicting therapeutic outcome in severe ulcerative colitis by measuring in vitro steroid sensitivity of proliferating peripheral blood lymphocytes. *Gut*. 1999 Sep;45(3):382-8. doi: 10.1136/gut.45.3.382.

He, J., Huang, Y., Liu, J., Lan, Z., Tang, X., & Hu, Z. (2021). The Efficacy of Mesenchymal Stem Cell Therapies in Rodent Models of Multiple Sclerosis: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in immunology*, 12, 711362. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.711362>

Hermansyah D, Putra A, Muhar AM, Retnaningsih, Wirastuti K, Dirja BT. Mesenchymal Stem Cells Suppress TGF- β Release to Decrease α -SMA Expression in Ameliorating CCl₄-Induced Liver Fibrosis. *Med Arch*. 2021 Feb;75(1):16-22. doi: 10.5455/medarh.2021.75.16-22.

Hmadcha, A., Martin-Montalvo, A., Gauthier, B. R., Soria, B., & Capilla-Gonzalez, V. (2020). Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells for Cancer Therapy. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 43. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00043>

Hoogduijn, M. J., & Lombardo, E. (2019). Mesenchymal Stromal Cells Anno 2019: Dawn of the Therapeutic Era? Concise Review. *Stem cells translational medicine*, 8(11), 1126–1134. <https://doi.org/10.1002/sctm.19-0073>

Hsu, P. J., Liu, K. J., Chao, Y. Y., Sytwu, H. K., & Yen, B. L. (2015). Assessment of the Immunomodulatory Properties of Human Mesenchymal Stem Cells (MSCs). *Journal of visualized experiments : JoVE*, (106), e53265. <https://doi.org/10.3791/53265>

Huang, F., Thokerunga, E., He, F. et al. Research progress of the application of mesenchymal stem cells in chronic inflammatory systemic diseases. *Stem Cell Res Ther* 13, 1 (2022). <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02613-1>

Irion CI, Paredes BD, Brasil GV, Cunha STD, Paula LF, Carvalho AR, Carvalho ACC, Carvalho AB, Goldenberg RCDS. Bone marrow cell migration to the heart in a chimeric mouse model of acute chagasic disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2017 Aug;112(8):551-560. doi: 10.1590/0074-02760160526.

Jaguin, M., Houlbert, N., Fardel, O., & Lecureur, V. (2013). Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cellular immunology*, 281(1), 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2013.01.010>

Jansen AM, Xavier SCDC, Roque ALR. Landmarks of the Knowledge and *Trypanosoma cruzi* Biology in the Wild Environment. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Feb 6; 10:10. doi: 10.3389/fcimb.2020.00010.

Jasmin, Jelicks LA, Koba W, Tanowitz HB, Mendez-Otero R, Campos de Carvalho AC, Spray DC. Mesenchymal bone marrow cell therapy in a mouse model of chagas disease. Where do the cells go? *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(12):e1971. doi: 10.1371/journal.pntd.0001971.

Jasmin, Jelicks LA, Tanowitz HB, Peters VM, Mendez-Otero R, de Carvalho ACC, Spray DC. Molecular imaging, biodistribution and efficacy of mesenchymal bone marrow cell therapy in a mouse model of Chagas disease. *Microbes Infect*. 2014 Nov;16(11):923-935. doi: 10.1016/j.micinf.2014.08.016.

Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol*. 2004 May;32(5):414-25. doi: 10.1016/j.exphem.2004.02.004.

Jenkins, S. J., Ruckerl, D., Thomas, G. D., Hewitson, J. P., Duncan, S., Brombacher, F., Maizels, R. M., Hume, D. A., & Allen, J. E. (2013). IL-4 directly signals tissue-resident macrophages to proliferate beyond homeostatic levels controlled by CSF-1. *The Journal of experimental medicine*, 210(11), 2477–2491. <https://doi.org/10.1084/jem.20121999>

Jung, H. N., & Jung, C. H. (2021). The Role of Anti-Inflammatory Adipokines in Cardiometabolic Disorders: Moving beyond Adiponectin. *International journal of molecular sciences*, 22(24), 13529. <https://doi.org/10.3390/ijms222413529>

Karina Chimal-Ramirez, G., Adriana Espinoza-Sanchez, N., Chavez-Sanchez, L., Arriaga-Pizano, L., and Fuentes-Panana, EM (2016). A diferenciação de monócitos em relação à atividade protumoral não se correlaciona com os fenótipos M1 ou M2. *J. Immunol. Res.* doi: 10.1155/2016/6031486.

Kastrinaki MC, Sidiropoulos P, Roche S, Ringe J, Lehmann S, Kritikos H, Vlahava VM, Delorme B, Eliopoulos GD, Jorgensen C, Charbord P, Häupl T, Boumpas DT, Papadaki HA. Functional, molecular and proteomic characterisation of bone marrow mesenchymal stem cells in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2008 Jun;67(6):741-9. doi: 10.1136/ard.2007.076174.

Kean, T. J., Lin, P., Caplan, A. I., & Dennis, J. E. (2013). MSCs: Delivery Routes and Engraftment, Cell-Targeting Strategies, and Immune Modulation. *Stem cells international*, 2013, 732742. <https://doi.org/10.1155/2013/732742>

Khodamoradi, K., Khosravizadeh, Z., Seetharam, D., Mallepalli, S., Farber, N., & Arora, H. (2022). The role of leptin and low testosterone in obesity. *International journal of impotence research*, 10.1038/s41443-022-00534-y. Advance online publication. <https://doi.org/10.1038/s41443-022-00534-y>

Koo, S. J., Chowdhury, I. H., Szczesny, B., Wan, X., & Garg, N. J. (2016). Macrophages Promote Oxidative Metabolism To Drive Nitric Oxide Generation in Response to *Trypanosoma cruzi*. *Infection and immunity*, 84(12), 3527–3541. <https://doi.org/10.1128/IAI.00809-16>

Kyurkchiev, D., Bochev, I., Ivanova-Todorova, E., Mourdjeva, M., Oreshkova, T., Belemezova, K., & Kyurkchiev, S. (2014). Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World journal of stem cells*, 6(5), 552–570. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i5.552>

Lange-Consiglio, A., Romele, P., Magatti, M. et al. Priming with inflammatory cytokines is not a prerequisite to increase immune-suppressive effects and responsiveness of equine amniotic mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther* 11, 99 (2020). <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01611-z>.

Larijani, B., Esfahani, E. N., Amini, P., Nikbin, B., Alimoghaddam, K., Amiri, S., Malekzadeh, R., Yazdi, N. M., Ghodsi, M., Dowlati, Y., Sahraian, M. A., & Ghavamzadeh, A. (2012). Stem cell therapy in treatment of different diseases. *Acta medica Iranica*, 50(2), 79–96.

Lee, B. Y., Bacon, K. M., Bottazzi, M. E., & Hotez, P. J. (2013). Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *The Lancet. Infectious diseases*, 13(4), 342–348. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70002-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70002-1)

Li, A., Guo, F., Pan, Q., Chen, S., Chen, J., Liu, H. F., & Pan, Q. (2021). Mesenchymal Stem Cell Therapy: Hope for Patients With Systemic Lupus Erythematosus. *Frontiers in immunology*, 12, 728190. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.728190>

Li, N., & Hua, J. (2017). Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 74(13), 2345–2360. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2473-5>

Lin, C.-S. et al. Commonly Used Mesenchymal Stem Cell Markers and Tracking Labels: Limitations and Challenges. *Histol Histopathol*, v. 28, n. 9, p. 1109–1116, 2013.

Lin, P., Ding, B., Wu, Y. et al. Mitogen-stimulated cell proliferation and cytokine production in major depressive disorder patients. *BMC Psychiatry* 18, 330 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12888-018-1906-5>.

Lingxiao Xu, Qiuyue Peng, Wenhua Xuan, Xiaoke Feng, Xiangqing Kong, Miaoja Zhang, Wenfeng Tan, Meilang Xue, Fang Wang, "Interleukin-29 Enhances Synovial Inflammation and Cartilage Degradation in Osteoarthritis", *Mediators of Inflammation*, vol. 2016, Article ID 9631510, 13 pages, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9631510>.

Liu, S., Guo, Y. L., Yang, J. Y., Wang, W., & Xu, J. (2018). Beijing da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Peking University. Health sciences, 50(6), 1014–1021.

Liu, W., Zhang, S., Gu, S., Sang, L., & Dai, C. (2015). Mesenchymal stem cells recruit macrophages to alleviate experimental colitis through TGFβ1. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 35(3), 858–865. <https://doi.org/10.1159/000369743>

Lopez, M., Tanowitz, H. B., & Garg, N. J. (2018). Pathogenesis of Chronic Chagas Disease: Macrophages, Mitochondria, and Oxidative Stress. *Current clinical microbiology reports*, 5(1), 45–54.

Lopez-Santalla, M., Fernandez-Perez, R., & Garin, M. I. (2020). Mesenchymal Stem/Stromal Cells for Rheumatoid Arthritis Treatment: An Update on Clinical Applications. *Cells*, 9(8), 1852. <https://doi.org/10.3390/cells9081852>

López-Vélez R, Norman FF, Bern C. 2019. American trypanosomiasis (Chagas disease), p 762–765. In Ryan ET, Hill DR, Solomon T, Endy TP,

Aronson N (ed), Hunter's tropical medicine and emerging infectious disease, 10th ed Elsevier, London, United Kingdom.

Machado, F. S., Dutra, W. O., Esper, L., Gollob, K. J., Teixeira, M. M., Factor, S. M., Weiss, L. M., Nagajyothi, F., Tanowitz, H. B., & Garg, N. J. (2012). Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Seminars in immunopathology*, 34(6), 753–770. <https://doi.org/10.1007/s00281-012-0351-7>

Mafra, Rodrigo Porpino et al. Expressão imunoistoquímica da endogлина (CD105) e do fator de von Willebrand em carcinoma epidermoide oral e sua relação com parâmetros clinicopatológicos. *Jornal Vascular Brasileiro* [online]. 2016, v. 15, n. doi.org/10.1590/1677-5449.008615.

Mahmoud, M., Abu-Shahba, N., Azmy, O., & El-Badri, N. (2019). Impact of Diabetes Mellitus on Human Mesenchymal Stromal Cell Biology and Functionality: Implications for Autologous Transplantation. *Stem cell reviews and reports*, 15(2), 194–217. <https://doi.org/10.1007/s12015-018-9869-y>

Mathers, C. D., Ezzati, M., & Lopez, A. D. (2007). Measuring the burden of neglected tropical diseases: the global burden of disease framework. *PLoS neglected tropical diseases*, 1(2), e114. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000114>

Marin-Neto, J. A., Almeida Filho, O. C., Pazin-Filho, A., & Maciel, B. C. (2002). Forma indeterminada da moléstia de chagas: proposta de novos critérios de caracterização e perspectivas de tratamento Precoce da cardiomiopatia [Indeterminate form of Chagas' disease. Proposal of new diagnostic criteria and perspectives for early treatment of cardiomyopathy]. *Arquivos brasileiros de cardiologia*, 79(6), 623–627. <https://doi.org/10.1590/s0066-782x2002001500008>

Martins, T.M.d.M., de Paula, A.C.C., Gomes, D.A. *et al.* Alkaline Phosphatase Expression/Activity and Multilineage Differentiation Potential are the Differences Between Fibroblasts and Orbital Fat-Derived Stem Cells

– A Study in Animal Serum-Free Culture Conditions. *Stem Cell Rev and Rep* **10**, 697–711 (2014). <https://doi.org/10.1007/s12015-014-9529-9>.

Mazini, L., Rochette, L., Admou, B., Amal, S., & Malka, G. (2020). Hopes and Limits of Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs) and Mesenchymal Stem Cells (MSCs) in Wound Healing. *International journal of molecular sciences*, *21*(4), 1306. <https://doi.org/10.3390/ijms21041306>

Mckinnirey, F., Herbert, B., Vesey, G. et al. Immune modulation via adipose derived Mesenchymal Stem cells is driven by donor sex in vitro. *Sci Rep* *11*, 12454 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91870-4>

Meisel, R., Heseler, K., Nau, J., Schmidt, S. K., Leineweber, M., Pudelko, S., Wenning, J., Zimmermann, A., Hengel, H., Sinzger, C., Degistirici, Ö., Sorg, R. V., & Däubener, W. (2014). Cytomegalovirus infection impairs immunosuppressive and antimicrobial effector functions of human multipotent mesenchymal stromal cells. *Mediators of inflammation*, *2014*, 898630. <https://doi.org/10.1155/2014/898630>

Mello DB, Ramos IP, Mesquita FC, Brasil GV, Rocha NN, Takiya CM, Lima AP, Campos de Carvalho AC, Goldenberg RS, Carvalho AB. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stromal Cells Protect Mice Infected with *Trypanosoma cruzi* from Cardiac Damage through Modulation of Anti-parasite Immunity. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Aug 6;9(8):e0003945. doi: 10.1371/journal.pntd.0003945.

Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol*. 2016 Jun;12(6):325-38. doi: 10.1038/nrneph.2016.48.

Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J., & Hill, A. M. (2000). M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), *164*(12), 6166–6173. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6166>

Molina JAP, Molina I. Review Chagas disease. The Lancet. 2018 Jan. doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4.

Moraes, D. What the relationship between CD90 e CD44 in Mesenchymal Stem Cells? Cytotherapy, 20(5), S47. (2018). doi:10.1016/j.jcyt.2018.02.124

Moraes, D.A., Sibov, T.T., Pavon, L.F. et al. A reduction in CD90 (THY-1) expression results in increased differentiation of mesenchymal stromal cells. Stem Cell Res Ther 7, 97 (2016). <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0359-3>

Moreira, A., Kahlenberg, S., & Hornsby, P. (2017). Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for diabetes. Journal of molecular endocrinology, 59(3), R109–R120. <https://doi.org/10.1530/JME-17-0117>

Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. Nature reviews. Immunology, 8(12), 958–969. <https://doi.org/10.1038/nri2448>

Nagajyothi, F., Desruisseaux, M. S., Weiss, L. M., Chua, S., Albanese, C., Machado, F. S., Esper, L., Lisanti, M. P., Teixeira, M. M., Scherer, P. E., & Tanowitz, H. B. (2009). Chagas disease, adipose tissue and the metabolic syndrome. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 104 Suppl 1(Suppl 1), 219–225. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762009000900028>

Nagajyothi, J. F., & Weiss, L. M. (2019). Advances in understanding the role of adipose tissue and mitochondrial oxidative stress in *Trypanosoma cruzi* infection. F1000Research, 8, F1000 Faculty Rev-1152. <https://doi.org/10.12688/f1000research.19190.1>

Najar, M., Krayem, M., Meuleman, N., Bron, D., & Lagneaux, L. (2017). Mesenchymal Stromal Cells and Toll-Like Receptor Priming: A Critical Review. Immune network, 17(2), 89–102. <https://doi.org/10.4110/in.2017.17.2.89>

Nemati S, Alizadeh Sardroud H, Baradar Khoshfetrat A, Khaksar M, Ahmadi M, Amini H, Saberianpour S, Delkhosh A, Akbar Movassaghpour A, Rahbarghazi R. The effect of alginate-gelatin encapsulation on the maturation of human myelomonocytic cell line U937. *J Tissue Eng Regen Med*. 2019 Jan;13(1):25-35. doi: 10.1002/term.2765.

Nogueira PM, Ribeiro K, Silveira AC, Campos JH, Martins-Filho OA, Bela SR, Campos MA, Pessoa NL, Colli W, Alves MJ, Soares RP, Torrecilhas AC. Vesicles from different *Trypanosoma cruzi* strains trigger differential innate and chronic immune responses. *J Extracell Vesicles*. 2015 Nov 26; 4:28734. doi: 10.3402/jev.v4.28734.

Nunes, M. C., Dones, W., Morillo, C. A., Encina, J. J., Ribeiro, A. L., & Council on Chagas Disease of the Interamerican Society of Cardiology (2013). Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(9), 767–776. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.05.046>

Nunes, M., Beaton, A., Acquatella, H., Bern, C., Bolger, A. F., Echeverría, L. E., Dutra, W. O., Gascon, J., Morillo, C. A., Oliveira-Filho, J., Ribeiro, A., Marin-Neto, J. A., & American Heart Association Rheumatic Fever, Endocarditis and Kawasaki Disease Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young; Council on Cardiovascular and Stroke Nursing; and Stroke Council (2018). Chagas Cardiomyopathy: An Update of Current Clinical Knowledge and Management: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*, 138(12), e169–e209. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000599>

Nunes, M. P., Andrade, R. M., Lopes, M. F., & DosReis, G. A. (1998). Activation-induced T cell death exacerbates *Trypanosoma cruzi* replication in macrophages cocultured with CD4+ T lymphocytes from infected hosts. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 160(3), 1313–1319.

Osorio L, Ríos I, Gutiérrez B, González J. Virulence factors of *Trypanosoma cruzi*: who is who? *Microbes Infect.* 2012 Dec;14(15):1390-402. doi: 10.1016/j.micinf.2012.09.003.

Orecchioni, M., Ghosheh, Y., Pramod, A. B., & Ley, K. (2019). Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Frontiers in immunology*, 10, 1084. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01084>

Okamoto, T., Gohil, K., Finkelstein, E. I., Bove, P., Akaike, T., & van der Vliet, A. (2004). Multiple contributing roles for NOS2 in LPS-induced acute airway inflammation in mice. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 286(1), L198–L209. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00136.2003>

Passos, L., Magalhães, L., Soares, R. P., Marques, A. F., Nunes, M., Gollob, K. J., & Dutra, W. O. (2017). Specific activation of CD4- CD8- double-negative T cells by *Trypanosoma cruzi*-derived glycolipids induces a proinflammatory profile associated with cardiomyopathy in Chagas patients. *Clinical and experimental immunology*, 190(1), 122–132. <https://doi.org/10.1111/cei.12992>

Pendleton, C., Li, Q., Chesler, D. A., Yuan, K., Guerrero-Cazares, H., & Quinones-Hinojosa, A. (2013). Mesenchymal stem cells derived from adipose tissue vs bone marrow: in vitro comparison of their tropism towards gliomas. *PloS one*, 8(3), e58198. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058198>

Pérez-Antón, E., Egui, A., Thomas, M. C., Puerta, C. J., González, J. M., Cuéllar, A., Segovia, M., & López, M. C. (2018). Impact of benznidazole treatment on the functional response of *Trypanosoma cruzi* antigen-specific CD4+CD8+ T cells in chronic Chagas disease patients. *PLoS neglected tropical diseases*, 12(5), e0006480. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006480>

Potten, C. S., & Loeffler, M. (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* (Cambridge, England), 110(4), 1001–1020.

Prasad A, Sedlářová M, Balukova A, Ovsii A, Rác M, Křupka M, Kasai S, Pospíšil P. Reactive Oxygen Species Imaging in U937 Cells. *Front Physiol.* 2020 Oct 15;11:552569. doi: 10.3389/fphys.2020.552569. PMID: 33178031; PMCID: PMC7593787.

Prata A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet. Infectious diseases*, 1(2), 92–100. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(01\)00065-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00065-2)

Prockop D. J. (2013). Concise review: two negative feedback loops place mesenchymal stem/stromal cells at the center of early regulators of inflammation. *Stem cells* (Dayton, Ohio), 31(10), 2042–2046. <https://doi.org/10.1002/stem.1400>

Quah, B. J., Warren, H. S., & Parish, C. R. (2007). Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nature protocols*, 2(9), 2049–2056. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.296>

Retana Moreira L, Rodríguez Serrano F, Osuna A. Extracellular vesicles of *Trypanosoma cruzi* tissue-culture cell-derived trypomastigotes: Induction of physiological changes in non-parasitized culture cells. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019 Feb 21;13(2):e0007163. doi: 10.1371/journal.pntd.0007163.

Ren, G., Zhao, X., Zhang, L., Zhang, J., L'Huillier, A., Ling, W., Roberts, A. I., Le, A. D., Shi, S., Shao, C., & Shi, Y. (2010). Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 184(5), 2321–2328. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902023>

Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A. I., Zhao, R. C., & Shi, Y. (2008). Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell stem cell*, 2(2), 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.11.014>

Ribeiro Dos Santos R, Rassi S, Feitosa G, Grecco OT, Rassi A Jr, da Cunha AB, de Carvalho VB, Guarita-Souza LC, de Oliveira W Jr, Tura BR, Soares MB, Campos de Carvalho AC; Chagas Arm of the MiHeart Study Investigators. Cell therapy in Chagas cardiomyopathy (Chagas arm of the multicenter randomized trial of cell therapy in cardiopathies study): a multicenter randomized trial. *Circulation*. 2012 May 22;125(20):2454-61. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.067785.

Romano B, Elangovan S, Erreni M, Sala E, Petti L, Kunderfranco P, Massimino L, Restelli S, Sinha S, Lucchetti D, Anselmo A, Colombo FS, Stravalaci M, Arena V, D'Alessio S, Ungaro F, Inforzato A, Izzo AA, Sgambato A, Day AJ, Vetrano S. TNF-Stimulated Gene-6 Is a Key Regulator in Switching Stemness and Biological Properties of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*. 2019 Jul;37(7):973-987. doi: 10.1002/stem.3010.

Rose, Ester; Carvalho, Juliana Lott; Hecht, Mariana. Mechanisms of DNA repair in *Trypanosoma cruzi*: What do we know so far?. [S. l.]: Elsevier B.V., 2020. doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102873

Rossette MC, Moraes DC, Sacramento EK, Romano-Silva MA, Carvalho JL, Gomes DA, Caldas H, Friedman E, Bastos-Rodrigues L, De Marco L. The In Vitro and In Vivo Antiangiogenic Effects of Flavokawain B. *Phytother Res*. 2017 Oct;31(10):1607-1613. doi: 10.1002/ptr.5891.

Rossi Izadora Volpato, Gavinho Bruno, Ramirez Marcel Ivan. Isolation and Characterization of Extracellular Vesicles Derived from *Trypanosoma cruzi*. Springer Nature. 2019. doi.org/10.1007/978-1-4939-9148-8_7.

Sacchetti, B., Funari, A., Michienzi, S., Di Cesare, S., Piersanti, S., Saggio, I., Tagliafico, E., Ferrari, S., Robey, P. G., Riminucci, M., & Bianco,

P. (2007). Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*, 131(2), 324–336. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.025>

Sahu, K. K., Siddiqui, A. D., & Cerny, J. (2021). Mesenchymal Stem Cells in COVID-19: A Journey from Bench to Bedside. *Laboratory medicine*, 52(1), 24–35. <https://doi.org/10.1093/labmed/lmaa049>

Schipper, B. M., Marra, K. G., Zhang, W., Donnenberg, A. D., & Rubin, J. P. (2008). Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose-derived stem cells. *Annals of plastic surgery*, 60(5), 538–544. <https://doi.org/10.1097/SAP.0b013e3181723bbe>

Salgado, A. J., Reis, R. L., Sousa, N. J., & Gimble, J. M. (2010). Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Current stem cell research & therapy*, 5(2), 103–110. <https://doi.org/10.2174/157488810791268564>

Samsonraj RM, Raghunath M, Nurcombe V, Hui JH, van Wijnen AJ, Cool SM. Concise Review: Multifaceted Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells for Use in Regenerative Medicine. *Stem Cells Transl Med*. 2017 Dec;6(12):2173-2185. doi: 10.1002/sctm.17-0129.

Smith, S.R., Schaaf, K., Rajabalee, N. et al. The phosphatase PPM1A controls monocyte-to-macrophage differentiation. *Sci Rep* 8, 902 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18832-7>

Santos, E. S., Silva, D., Dos Reis, B., Barreto, B. C., Cardoso, C., Ribeiro Dos Santos, R., Meira, C. S., & Soares, M. (2021). Immunomodulation for the Treatment of Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy: A New Approach to an Old Enemy. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 765879. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.765879>

Seo, Y., Shin, K. H., Kim, H. H., & Kim, H. S. (2019). Current Advances in Red Blood Cell Generation Using Stem Cells from Diverse Sources. *Stem cells international*, 2019, 9281329. <https://doi.org/10.1155/2019/9281329>

Serejo, T., Silva-Carvalho, A. É., Braga, L., Neves, F., Pereira, R. W., Carvalho, J. L., & Saldanha-Araujo, F. (2019). Assessment of the Immunosuppressive Potential of INF- γ Licensed Adipose Mesenchymal Stem Cells, Their Secretome and Extracellular Vesicles. *Cells*, 8(1), 22. <https://doi.org/10.3390/cells8010022>

Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res*. 2003 Apr;18(4):696-704. doi: 10.1359/jbmr.2003.18.4.696.

Shoemaker, J. P., & Hoffman, R. V., Jr (1974). *Trypanosoma cruzi*: possible stimulatory factor(s) on brown adipose tissue of mice. *Experimental parasitology*, 35(2), 272–274. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(74\)90033-2](https://doi.org/10.1016/0014-4894(74)90033-2)

Silva-Carvalho AÉ, Rodrigues LP, Schiavinato JL, Alborghetti MR, Bettarello G, Simões BP, Neves FAR, Panepucci RA, de Carvalho JL, Saldanha-Araujo F. GVHD-derived plasma as a priming strategy of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2020 Apr 16;11(1):156. doi: 10.1186/s13287-020-01659-x.

Silva, E. M., Guillermo, L. V., Ribeiro-Gomes, F. L., De Meis, J., Nunes, M. P., Senra, J. F., Soares, M. B., DosReis, G. A., & Lopes, M. F. (2007). Caspase inhibition reduces lymphocyte apoptosis and improves host immune responses to *Trypanosoma cruzi* infection. *European journal of immunology*, 37(3), 738–746. <https://doi.org/10.1002/eji.200636790>

Soares MB, Lima RS, Souza BS, Vasconcelos JF, Rocha LL, Dos Santos RR, Iacobas S, Goldenberg RC, Lisanti MP, Iacobas DA, Tanowitz HB, Spray DC, Campos de Carvalho AC. Reversion of gene expression alterations in hearts of mice with chronic chagasic cardiomyopathy after transplantation of

bone marrow cells. *Cell Cycle*. 2011 May 1;10(9):1448-55. doi: 10.4161/cc.10.9.15487.

Somoza, M., Bertelli, A., Pratto, C. A., Verdun, R. E., Campetella, O., & Mucci, J. (2022). *Trypanosoma cruzi* Induces B Cells That Regulate the CD4+ T Cell Response. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 789373. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.789373>

Song Mg, Ryoo Ig, Choi Hy, Choi Bh, Kim ST, et al. (2015) NRF2 Signaling Negatively Regulates Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA)-Induced Differentiation of Human Monocytic U937 Cells into Pro-Inflammatory Macrophages. *PLOS ONE* 10(7): e0134235. doi.org/10.1371/journal.pone.0134235.

Song, N., Scholtemeijer, M., & Shah, K. (2020). Mesenchymal Stem Cell Immunomodulation: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Trends in pharmacological sciences*, 41(9), 653–664. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.06.009>

Souza BS, Azevedo CM, d Lima RS, Kaneto CM, Vasconcelos JF, Guimarães ET, dos Santos RR, Soares MB. Bone marrow cells migrate to the heart and skeletal muscle and participate in tissue repair after *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Int J Exp Pathol*. 2014 Oct;95(5):321-9. doi: 10.1111/iep.12089.

Souza Cristiano Freitas de, Napoli Priscila de, Han Sang Won, Lima Valter Correia de, & Carvalho Antonio Carlos de Camargo. Células-tronco mesenquimais: células ideais para a regeneração cardíaca? *Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva*. 2010. 18(3), 344-353. <https://doi.org/10.1590/S2179-83972010000300019>.

Sukoyan, M. A., Vatolin, S. Y., Golubitsa, A. N., Zhelezova, A. I., Semenova, L. A., & Serov, O. L. (1993). Embryonic stem cells derived from morulae, inner cell mass, and blastocysts of mink: comparisons of their

pluripotencies. *Molecular reproduction and development*, 36(2), 148–158.
<https://doi.org/10.1002/mrd.1080360205>

Su, J., Chen, X., Huang, Y., Li, W., Li, J., Cao, K., Cao, G., Zhang, L., Li, F., Roberts, A. I., Kang, H., Yu, P., Ren, G., Ji, W., Wang, Y., & Shi, Y. (2014). Phylogenetic distinction of iNOS and IDO function in mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression in mammalian species. *Cell death and differentiation*, 21(3), 388–396. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.149>

Sun LY, Zhang HY, Feng XB, Hou YY, Lu LW, Fan LM. Abnormality of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2007;16(2):121-8. doi: 10.1177/0961203306075793.

Skelly, D. A., Ronald, J., & Akey, J. M. (2009). Inherited variation in gene expression. *Annual review of genomics and human genetics*, 10, 313–332. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-082908-150121>

Tan, K., Zhu, H., Zhang, J., Ouyang, W., Tang, J., Zhang, Y., Qiu, L., Liu, X., Ding, Z., & Deng, X. (2019). CD73 Expression on Mesenchymal Stem Cells Dictates the Reparative Properties via Its Anti-Inflammatory Activity. *Stem cells international*, 2019, 8717694. <https://doi.org/10.1155/2019/8717694>

Tarleton R. L. (2015). CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Seminars in immunopathology*, 37(3), 233–238. <https://doi.org/10.1007/s00281-015-0481-9>

Tedesco, S., De Majo, F., Kim, J., Trenti, A., Trevisi, L., Fadini, G. P., Bolego, C., Zandstra, P. W., Cignarella, A., & Vitiello, L. (2018). Convenience versus Biological Significance: Are PMA-Differentiated THP-1 Cells a Reliable Substitute for Blood-Derived Macrophages When Studying in Vitro Polarization?. *Frontiers in pharmacology*, 9, 71. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00071>

Teixeira, A. R., Hecht, M. M., Guimaro, M. C., Sousa, A. O., & Nitz, N. (2011). Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. *Clinical microbiology reviews*, 24(3), 592–630. <https://doi.org/10.1128/CMR.00063-10>

Teixeira, D. E., Benchimol, M., Crepaldi, P. H., & de Souza, W. (2012). Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(8), e1749. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001749>

Tyler, K. M., & Engman, D. M. (2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International journal for parasitology*, 31(5-6), 472–481. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(01\)00153-9](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(01)00153-9)

Ullah, M., Hamouda, H., Stich, S., Sittinger, M., & Ringe, J. (2012). A reliable protocol for the isolation of viable, chondrogenically differentiated human mesenchymal stem cells from high-density pellet cultures. *Bio Research open access*, 1(6), 297–305. <https://doi.org/10.1089/biores.2012.0279>

Vilas-Boas, F., Feitosa, G. S., Soares, M. B., Mota, A., Pinho-Filho, J. A., Almeida, A. J., Andrade, M. V., Carvalho, H. G., Dourado-Oliveira, A., & Ribeiro-dos-Santos, R. (2006). Resultados iniciais do transplante de células de medula óssea para o miocárdio de pacientes com insuficiência cardíaca de etiologia Chagásica [Early results of bone marrow cell transplantation to the myocardium of patients with heart failure due to Chagas disease]. *Arquivos brasileiros de cardiologia*, 87(2), 159–166. <https://doi.org/10.1590/s0066-782x2006001500014>

Vishnubalaji, R., Al-Nbaheen, M., Kadalmani, B., Aldahmash, A., & Ramesh, T. (2012). Comparative investigation of the differentiation capability of bone-marrow- and adipose-derived mesenchymal stem cells by qualitative and quantitative analysis. *Cell and tissue research*, 347(2), 419–427. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1306-3>

Vizoso, F. J., Eiro, N., Costa, L., Esparza, P., Landin, M., Diaz-Rodriguez, P., Schneider, J., & Perez-Fernandez, R. (2019). Mesenchymal Stem Cells in Homeostasis and Systemic Diseases: Hypothesis, Evidences, and Therapeutic Opportunities. *International journal of molecular sciences*, 20(15), 3738. <https://doi.org/10.3390/ijms20153738>

Wang, M., Yuan, Q., & Xie, L. (2018). Mesenchymal Stem Cell-Based Immunomodulation: Properties and Clinical Application. *Stem cells international*, 2018, 3057624. <https://doi.org/10.1155/2018/3057624>

Wang, Q. G., El Haj, A. J., & Kuiper, N. J. (2008). Glycosaminoglycans in the pericellular matrix of chondrons and chondrocytes. *Journal of anatomy*, 213(3), 266–273. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2008.00942.x>

Wang, Y., Shan, S. K., Guo, B., Li, F., Zheng, M. H., Lei, L. M., Xu, Q. S., Ullah, M., Xu, F., Lin, X., & Yuan, L. Q. (2021). The Multi-Therapeutic Role of MSCs in Diabetic Nephropathy. *Frontiers in endocrinology*, 12, 671566. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.671566>

Wattrang, E., Palm, A. K., & Wagner, B. (2012). Cytokine production and proliferation upon in vitro oligodeoxyribonucleotide stimulation of equine peripheral blood mononuclear cells. *Veterinary immunology and immunopathology*, 146(2), 113–124. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.02.004>

Wesley M, Moraes A, Rosa AC, Lott Carvalho J, Shiroma T, Vital T, Dias N, de Carvalho B, do Amaral Rabello D, Borges TKDS, Dallago B, Nitz N, Hagström L, Hecht M. Correlation of Parasite Burden, kDNA Integration, Autoreactive Antibodies, and Cytokine Pattern in the Pathophysiology of Chagas Disease. *Front Microbiol.* 2019 Aug 21; 10:1856. doi: 10.3389/fmicb.2019.01856.

Wimer B. M. (1996). Putative effects of mitogenic lectin therapy corroborated by alloactivation data. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*, 11(1), 57–75. <https://doi.org/10.1089/cbr.1996.11.57>

Wynn, T. A., & Vannella, K. M. (2016). Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity*, 44(3), 450–462. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.015>

Xie L, Fu Q, Ortega TM, Zhou L, Rasmussen D, O'Keefe J, Zhang KK, Chapes SK. Overexpression of IL-10 in C2D macrophages promotes a macrophage phenotypic switch in adipose tissue environments. *PLoS One*. 2014 Jan 21;9(1):e86541. doi: 10.1371/journal.pone.0086541.

Xu, X., Zheng, L., Yuan, Q. et al. Transforming growth factor- β in stem cells and tissue homeostasis. *Bone Res* 6, 2 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41413-017-0005-4>

Yang, J., Ren, X. J., Chen, X. T., Jiang, Y. F., Han, Z. B., Han, Z. C., Li, X. R., & Zhang, X. M. (2021). Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells treatment for refractory uveitis: a case series. *International journal of ophthalmology*, 14(11), 1784–1790. <https://doi.org/10.18240/ijo.2021.11.20>

Yang L, Dai F, Tang L, Le Y, Yao W. Macrophage differentiation induced by PMA is mediated by activation of RhoA/ROCK signaling. *J Toxicol Sci*. 2017;42(6):763-771. doi: 10.2131/jts.42.763. PMID: 29142175.

Yang, Y. K. et al. Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro. *Stem Cell Research & Therapy*, 2018.

Yoshida N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An Acad Bras Cienc*. 2006 Mar;78(1):87-111. doi: 10.1590/s0001-37652006000100010.

Yoshida N. Surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. 1983 May;40(2):836-9. doi: 10.1128/IAI.40.2.836-839.1983.

Yun JH, Lee DH, Jeong HS, Kim HS, Ye SK, Cho CH. STAT3 activation in microglia exacerbates hippocampal neuronal apoptosis in diabetic brains. *J Cell Physiol.* 2021 Oct;236(10):7058-7070. doi: 10.1002/jcp.30373.

Zanluqui NG, Wowk PF, Pinge-Filho P (2015) Macrophage Polarization in Chagas Disease. *J Clin Cell Immunol* 6: 317. doi:10.4172/2155-9899.1000317

Zajdel, A., Kałucka, M., Kokoszka-Mikołaj, E., & Wilczok, A. (2017). Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue and Wharton's jelly of the umbilical cord. *Acta Biochimica Polonica*, 64(2), 365–369. https://doi.org/10.18388/abp.2016_1488

Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., & Rybak, Z. (2019). Stem cells: past, present, and future. *Stem cell research & therapy*, 10(1), 68. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>

Zingales B. (2018). *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta tropica*, 184, 38–52. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017>

Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, et al. (2012) The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol* 12(2):240-53

Zhang, L., & Tarleton, R. L. (1999). Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. *The Journal of infectious diseases*, 180(2), 480–486. <https://doi.org/10.1086/314889>

Zhang, Q. Z., Su, W. R., Shi, S. H., Wilder-Smith, P., Xiang, A. P., Wong, A., Nguyen, A. L., Kwon, C. W., & Le, A. D. (2010). Human gingiva-derived mesenchymal stem cells elicit polarization of m2 macrophages and enhance

cutaneous wound healing. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 28(10), 1856–1868.
<https://doi.org/10.1002/stem.503>

Zheng, G., Qiu, G., Ge, M., He, J., Huang, L., Chen, P., Wang, W., Xu, Q., Hu, Y., Shu, Q., & Xu, J. (2017). Células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo humano aliviam a bronquiolite obliterativa em um modelo murino viaIDO. *Pesquisa respiratória*, 18 (1), 119.
<https://doi.org/10.1186/s12931-017-0599-5>.

Zhou, L., Hao, Q., Sugita, S. et al. Role of CD44 in increasing the potency of mesenchymal stem cell extracellular vesicles by hyaluronic acid in severe pneumonia. *Stem Cell Res Ther* 12, 293 (2021).
<https://doi.org/10.1186/s13287-021-02329-2>

Zhou, X., Jin, N., Wang, F. et al. Mesenchymal stem cells: a promising way in therapies of graft-versus-host disease. *Cancer Cell Int* 20, 114 (2020).
<https://doi.org/10.1186/s12935-020-01193-z>

Zuo Q, Wu R, Xiao X, Yang C, Yang Y, Wang C, Lin L, Kong AN. The dietary flavone luteolin epigenetically activates the Nrf2 pathway and blocks cell transformation in human colorectal cancer HCT116 cells. *J Cell Biochem*. 2018 Nov;119(11):9573-9582. doi: 10.1002/jcb.27275.

Apêndice I: Tabelas com os valores de expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

Figura 1: Valores de expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) de genes relacionados a imunomodulação das amostras de diferentes doadores de células-tronco mesenquimais, denominados de assinatura imunológica. Valores de expressão genica obtidos através de qRT-PCR foram normalizados pelo gene controle *GAPDH*.

		Gene alvo	Gene referência			
		Ct IL-10	Ct GAPDH	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ - Expressão relativa
Amostra	CTM1	30,3586502	21,4392777	8,919	-2,102	4,292
MEDIA				11,021		
Amostra	CTM2	28,5393848	18,3921814	10,147	-0,874	1,832
MEDIA				11,021		
Amostra	CTM3	31,6284332	17,6305313	13,998	2,977	0,127
MEDIA				11,021		
		Ct IDO	Ct GAPDH	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ - Expressão relativa
Amostra	CTM1	30,6170273	21,4392777	9,17774963	-1,066484456	2,09432372
MEDIA				10,2442341		
Amostra	CTM2	29,0708752	18,3921814	10,6786938	0,434459681	0,74
MEDIA				10,2442341		
Amostra	CTM3	28,5067902	17,6305313	10,8762589	0,63202476	0,645
MEDIA				10,2442341		
		Ct TGF- β	Ct GAPDH	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ - Expressão relativa
Amostra	CTM1	29,4660454	21,4392777	8,02676773	-0,185092926	1,137
MEDIA				8,21186066		
Amostra	CTM2	26,8464737	18,3921814	8,4542923	0,24243164	0,845
MEDIA				8,21186066		
Amostra	CTM3	25,7850533	17,6305313	8,15452194	-0,057338715	1,041
MEDIA				8,21186066		
		Ct TSG-6	Ct GAPDH	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ - Expressão relativa
Amostra	CTM1	29,5291882	21,4392777	8,08991051	-0,909894308	1,879
MEDIA				8,99980482		
Amostra	CTM2	27,012167	18,3921814	8,61998558	-0,379819235	1,301
MEDIA				8,99980482		
Amostra	CTM3	27,9200497	17,6305313	10,2895184	1,289713541	0,409
MEDIA				8,99980482		

Figura 2: Valores de expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) da carga parasitaria de amostras de diferentes doadores de células-tronco mesenquimais, infectadas por *T. cruzi*, obtidos através de qRT-PCR. Extração do RNA a partir de 10^6 epimastigotas de Colombiana.

	Amostra	Qde log	Ct	Ct Mean
10^6	2000	3,30103	20,5057	20,3742
10^6	2000	3,30103	19,9929	20,3742
10^5	200	2,30103	22,9978	23,1099
10^5	200	2,30103	23,2221	23,1099
10^4	20	1,30103	26,5296	26,4014
10^4	20	1,30103	26,2732	26,4014
10^3	2	0,30103	30,1876	29,9912
10^3	2	0,30103	29,7948	29,9912
10^2	0,2	-0,699	33,5617	33,6473
10^2	0,2	-0,699	33,7328	33,6473
10	0,02	-1,699	36,6531	36,6531

Equação da reta: $x = (-1)*((y-31,037)/(3,3552))$
 Eff = 98,63%

Amostras	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ - Expressão relativa
CTM 1	Undetermined
CTM 2	Undetermined
CTM 3	Undetermined
CTM 1 – Infectada por <i>T. cruzi</i>	34,75447
CTM 2 – Infectada por <i>T. cruzi</i>	27,55599
CTM 3 – Infectada por <i>T. cruzi</i>	Undetermined

Figura 3: Valores de expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) de genes relacionados a imunomodulação das amostras de diferentes doadores de células-tronco mesenquimais, infectadas por *T. cruzi*. Valores de expressão genica obtidos através de qRT-PCR foram normalizados pelo gene controle *GAPDH*.

		Gene alvo	Gene referência			
		Ct IL-10	Ct GAPDH	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ - Expressão relativa
Amostra	CTM 1 + <i>T. cruzi</i>	31,671	30,924	0,747	-5,827	56,758
MEDIA				6,574		
Amostra	CTM 2 + <i>T. cruzi</i>	37,6607704	22,9729652	14,688	8,114	0,004
MEDIA				6,574		
Amostra	CTM 3 + <i>T. cruzi</i>	30,7055817	19,8452988	10,86	4,286	0,051
MEDIA				6,574		
		Ct IDO	Ct GAPDH	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ - Expressão relativa
Amostra	CTM 1 + <i>T. cruzi</i>	45	30,924	14,076	4,986	0,031550666
MEDIA				9,08955511		
Amostra	CTM 2 + <i>T. cruzi</i>	27,0890503	22,9729652	4,11608505	-4,973470053	31,417
MEDIA				9,08955511		
Amostra	CTM 3 + <i>T. cruzi</i>	28,9221382	19,8452988	9,07683945	-0,012715658	1,009
MEDIA				9,08955511		
		Ct TGF-β	Ct GAPDH	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ - Expressão relativa
Amostra	CTM 1 + <i>T. cruzi</i>	35,9109993	30,924	4,987	-2,662	6,33
MEDIA				7,649		
Amostra	CTM 2 + <i>T. cruzi</i>	31,4379768	22,9729652	8,4650116	0,816011597	0,568
MEDIA				7,649		
Amostra	CTM 3 + <i>T. cruzi</i>	29,3396606	19,8452988	9,49436188	1,845361877	0,278
MEDIA				7,649		
		Ct TSG6	Ct GAPDH	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ - Expressão relativa
Amostra	CTM 1 + <i>T. cruzi</i>	45	30,924	14,076	5,113	0,028901747
MEDIA				8,96304131		
Amostra	CTM 2 + <i>T. cruzi</i>	32,3441582	22,9729652	9,37119293	0,408151626	0,754
MEDIA				8,96304131		
Amostra	CTM 3 + <i>T. cruzi</i>	28,4001885	19,8452988	8,55488968	-0,408151627	1,327
MEDIA				8,96304131		

Figura 4: Valores de expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) de macrófagos tratados com sobrenadante de células-tronco mesenquimais infectadas e não infectadas por *T. cruzi* estimulados e não estimulados por LPS. Valores de expressão genica obtidos através de qRT-PCR foram normalizados pelo gene controle negativo.

			IL-1 β		GAPDH		ΔCr	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ Expressão relativa												TNF- α		GAPDH		ΔCr	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ Expressão relativa
			Gene Alvo	Gene ref	Gene Alvo	Gene ref															Gene Alvo	Gene ref	Gene Alvo	Gene ref			
CTM 1	Amostra	Mo + SN de CTM 1	23,95810428	22,24682535	1,709	3,857	0,069			CTM 1	Amostra	Mo + SN de CTM 1	29,328	22,24693	7,081	2,046	0,242			CTM 1	Amostra	Mo + SN de CTM 1	26,563	21,595	0,826	-10,929	1950,232
	Controle	Controle	24,16983141	26,31764221	-2,148						Controle	Controle	31,24	25,737	11,755						Controle	Controle	31,24	25,737	11,755		
	Amostra	Mo + SN de CTM 1 com <i>T. cruzi</i>	18,04418182	20,95825498	-2,912	-0,764	1,699				Amostra	Mo + SN de CTM 1 com <i>T. cruzi</i>	28,434	20,95625	7,478	2,443	0,184				Amostra	Mo + SN de CTM 1 com <i>T. cruzi</i>	25,479	19,485	-0,258	-11,47	2836,429
	Controle	Controle	24,16983141	26,31764221	-2,148						Controle	Controle	31,35276	26,31764	5,035						Controle	Controle	31,24	25,737	11,212		
	Amostra	Mo + SN de CTM 1 + LPS	17,92008044	20,58374786	-2,661	-0,513	1,427				Amostra	Mo + SN de CTM 1 + LPS	27,81454	20,58375	7,231	2,196	0,218				Amostra	Mo + SN de CTM 1 + LPS	24,787	20,028	-0,95	2,874	0,136438
	Controle	Controle	24,16983141	26,31764221	-2,148						Controle	Controle	31,35276	26,31764	5,035						Controle	Controle	31,24	25,737	-3,823		
CTM 2	Amostra	Mo + SN de CTM 2	20,06494604	22,168	-2,103	0,045	0,969			CTM 2	Amostra	Mo + SN de CTM 2	31,055	22,168	8,887	3,852	0,069			CTM 2	Amostra	Mo + SN de CTM 2	33,692	35,063	7,955	-2,298	4,917619
	Controle	Controle	24,16993141	26,31764221	-2,148				Controle		Controle	31,35276	26,31764	5,035					Controle		Controle	31,24	25,737	10,253			
	Amostra	Mo + SN de CTM 2 com <i>T. cruzi</i>	21,51275635	23,79507828	-2,282	-0,135	1,098				Amostra	Mo + SN de CTM 2 com <i>T. cruzi</i>	29,9421	21,70894	8,233	3,198	0,109				Amostra	Mo + SN de CTM 2 com <i>T. cruzi</i>	25,407	20,987	-0,33	-9,438	693,5855
	Controle	Controle	24,16993141	26,31764221	-2,148						Controle	Controle	31,35276	26,31764	5,035						Controle	Controle	31,24	25,737	9,108		
	Amostra	Mo + SN de CTM 2 + LPS	25,34994398	26,52270508	-1,173	0,975	0,509				Amostra	Mo + SN de CTM 2 + LPS	32,505	23,79508	8,71	3,675	0,078				Amostra	Mo + SN de CTM 2 + LPS	25,779	22,132	0,042	-8,198	293,7551
	Controle	Controle	24,16993141	26,31764221	-2,148						Controle	Controle	31,35276	26,31764	5,035						Controle	Controle	31,24	25,737	8,24		
CTM 3	Amostra	Mo + SN de CTM 3	20,94026947	22,67838952	-1,738	0,41	0,753			CTM 3	Amostra	Mo + SN de CTM 3	30,948	22,67837	8,27	3,235	0,106			CTM 3	Amostra	Mo + SN de CTM 3	34,162	26,622	8,425	5,122	0,028714
	Controle	Controle	24,16983141	26,31764221	-2,148				Controle		Controle	31,35276	26,31764	5,035					Controle		Controle	31,24	25,737	4,618			
	Amostra	Mo + SN de CTM 3 com <i>T. cruzi</i>	31,308	26,99447441	4,314	6,462	0,011				Amostra	Mo + SN de CTM 3 com <i>T. cruzi</i>	31,97558	26,99447	4,981	-0,054	1,038				Amostra	Mo + SN de CTM 3 com <i>T. cruzi</i>	34,162	26,622	8,425	5,122	0,028714
	Controle	Controle	24,16983141	26,31764221	-2,148						Controle	Controle	31,35276	26,31764	5,035						Controle	Controle	31,24	25,737	3,303		
	Amostra	Mo + SN de CTM 3 + LPS	26,9053154	28,90077782	-1,995	0,152	0,9				Amostra	Mo + SN de CTM 3 + LPS	31,99886	28,90078	3,098	-1,937	3,829				Amostra	Mo + SN de CTM 3 + LPS	31,441	27,937	5,704	0,516	0,699357
	Controle	Controle	24,16983141	26,31764221	-2,148						Controle	Controle	31,35276	26,31764	5,035						Controle	Controle	31,24	25,737	5,188		
CTM 3	Amostra	Mo + SN de CTM 3 com <i>T. cruzi</i> + LPS	25,95237732	26,95039934	-0,998	1,15	0,451			Amostra	Mo + SN de CTM 3 com <i>T. cruzi</i> + LPS	31,79606	26,95036	4,846	-0,189	1,14			Amostra	Mo + SN de CTM 3 com <i>T. cruzi</i> + LPS	34,509	26,052	8,772	3,477	0,089812		
	Controle	Controle	24,16983141	26,31764221	-2,148					Controle	Controle	31,35276	26,31764	5,035					Controle	Controle	31,24	25,737	5,295				

Figura 5: Valores de expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) de PBMCs tratados com sobrenadante de células-tronco mesenquimais infectadas e não infectadas por *T. cruzi* estimulados e não estimulados por PHA. Valores de expressão genica obtidos através de qRT-PCR foram normalizados pelo gene controle negativo.

	IL-10						TNF- α						INF- γ								
	Gene Alvo	Gene ref	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ Expressão relativa		Gene Alvo	Gene ref	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ Expressão relativa		Gene Alvo	Gene ref	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ Expressão relativa				
CTM 1	Amostra	PBMCs + SN de CTM 1	25,875	18,698	8,177	-0,233	1,175	Amostra	PBMCs + SN de CTM 1	23,345	18,698	4,647	1,29	0,409	Amostra	PBMCs + SN de CTM 1	25,129	18,698	6,432	0,63	0,646
	Controle	Controle-	28,365	19,955	8,41	5,938	1	Controle	Controle-	23,313	19,955	3,358	3,372	1	Controle	Controle-	25,671	19,87	5,802	4,27	1
	Amostra	PBMCs + SN de CTM 1 com <i>T. cruzi</i>	29,818	27,346	2,472	-5,938	61,289	Amostra	PBMCs + SN de CTM 1 com <i>T. cruzi</i>	27,332	27,346	-0,014	-3,372	10,354	Amostra	PBMCs + SN de CTM 1 com <i>T. cruzi</i>	28,878	27,346	1,532	-4,27	19,289
	Controle	Controle-	28,365	19,955	8,41		1	Controle	Controle-	23,313	19,955	3,358		1	Controle	Controle-	25,671	19,87	5,802		1
	Amostra	PBMCs + SN de CTM 1 + PHA	32,108	23,403	8,704	0,295	0,815	Amostra	PBMCs + SN de CTM 1 + PHA	29,771	23,403	6,368	3,01	0,124	Amostra	PBMCs + SN de CTM 1 + PHA	29,127	23,403	5,723	-0,078	1,056
	Controle	Controle-	28,365	19,955	8,41		1	Controle	Controle-	23,313	19,955	3,358		1	Controle	Controle-	25,671	19,87	5,802		1
CTM 1	Amostra	PBMCs + SN de CTM 1 com <i>T. cruzi</i> + PHA	28,761	30,121	-1,361	-9,77	873,312	Amostra	PBMCs + SN de CTM 1 com <i>T. cruzi</i> + PHA	26,722	30,121	-3,399	-6,757	108,177	Amostra	PBMCs + SN de CTM 1 com <i>T. cruzi</i> + PHA	29,258	30,985	-1,727	-7,528	184,609
	Controle	Controle-	28,365	19,955	8,41		1	Controle	Controle-	23,313	19,955	3,358		1	Controle	Controle-	25,671	19,87	5,802		1
	Amostra	PBMCs + SN de CTM 2	31,901	25,598	6,303	-2,174	4,513	Amostra	PBMCs + SN de CTM 2	31,88	25,598	6,282	2,319	0,2	Amostra	PBMCs + SN de CTM 2	31,361	25,602	5,759	1,781	0,291
	Controle	Controle-	27,588	19,11	8,477	3,382	1	Controle	Controle-	23,074	19,11	3,963	2,542	1	Controle	Controle-	23,318	19,34	3,978	0,889	1
	Amostra	PBMCs + SN de CTM 2 com <i>T. cruzi</i>	32,163	27,068	5,095	-3,382	10,425	Amostra	PBMCs + SN de CTM 2 com <i>T. cruzi</i>	28,489	27,068	1,422	-2,542	5,823	Amostra	PBMCs + SN de CTM 2 com <i>T. cruzi</i>	30,157	27,068	3,089	-0,889	1,852
	Controle	Controle-	27,588	19,11	8,477		1	Controle	Controle-	23,074	19,11	3,963		1	Controle	Controle-	23,318	19,34	3,978		1
CTM 2	Amostra	PBMCs + SN de CTM 2 + PHA	27,156	20,225	6,931	-1,546	2,92	Amostra	PBMCs + SN de CTM 2 + PHA	25,772	20,225	5,547	1,584	0,334	Amostra	PBMCs + SN de CTM 2 + PHA	26,509	20,225	6,284	2,306	0,202
	Controle	Controle-	27,588	19,11	8,477		1	Controle	Controle-	23,074	19,11	3,963		1	Controle	Controle-	23,318	19,34	3,978		1
	Amostra	PBMCs + SN de CTM 2 com <i>T. cruzi</i> + PHA	33,775	33,305	0,47	-8,007	257,297	Amostra	PBMCs + SN de CTM 2 com <i>T. cruzi</i> + PHA	31,805	33,305	-1,501	-5,464	44,14	Amostra	PBMCs + SN de CTM 2 com <i>T. cruzi</i> + PHA	32,624	32,5	0,124	-3,854	14,462
	Controle	Controle-	27,588	19,11	8,477		1	Controle	Controle-	23,074	19,11	3,963		1	Controle	Controle-	23,318	19,34	3,978		1
	Amostra	PBMCs + SN de CTM 3	27,874	17,974	9,9	1,615	0,326	Amostra	PBMCs + SN de CTM 3	23,022	17,974	5,048	1,34	0,395	Amostra	PBMCs + SN de CTM 3	24,543	17,885	6,659	1,381	0,384
	Controle	Controle-	28,088	19,803	8,285	1,149	1	Controle	Controle-	23,511	19,803	3,708	1,882	1	Controle	Controle-	24,973	19,696	5,277	1,74	1
CTM 3	Amostra	PBMCs + SN de CTM 3 com <i>T. cruzi</i>	30,343	23,208	7,135	-1,149	2,218	Amostra	PBMCs + SN de CTM 3 com <i>T. cruzi</i>	25,033	23,208	1,825	-1,882	3,687	Amostra	PBMCs + SN de CTM 3 com <i>T. cruzi</i>	26,745	23,208	3,537	-1,74	3,341
	Controle	Controle-	28,088	19,803	8,285		1	Controle	Controle-	23,511	19,803	3,708		1	Controle	Controle-	24,973	19,696	5,277		1
	Amostra	PBMCs + SN de CTM 3 + PHA	30,213	21,167	9,046	0,761	0,59	Amostra	PBMCs + SN de CTM 3 + PHA	28,259	21,167	7,092	3,385	0,096	Amostra	PBMCs + SN de CTM 3 + PHA	28,019	21,167	6,852	1,574	0,336
	Controle	Controle-	28,088	19,803	8,285		1	Controle	Controle-	23,511	19,803	3,708		1	Controle	Controle-	24,973	19,696	5,277		1
	Amostra	PBMCs + SN de CTM 3 com <i>T. cruzi</i> + PHA	32,359	28,932	3,427	-4,858	28,993	Amostra	PBMCs + SN de CTM 3 com <i>T. cruzi</i> + PHA	30,075	28,932	1,143	-2,565	5,918	Amostra	PBMCs + SN de CTM 3 com <i>T. cruzi</i> + PHA	30,647	28,932	1,715	-3,563	11,816
	Controle	Controle-	28,088	19,803	8,285		1	Controle	Controle-	23,511	19,803	3,708		1	Controle	Controle-	24,973	19,696	5,277		1

Anexo I: Certificado CEP

UNB - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE BRASÍLIA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Uso de células humanas para pesquisas in vitro, em substituição a experimentação animal.

Pesquisador: Juliana Lott de Carvalho

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 30175020.0.0000.5558

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília - UNB

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.954.541

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa em sua primeira versão que visa investigar o uso de células humanas para pesquisas in vitro em substituição à experimentação em animais. A pele é o maior órgão do corpo e tem funções essenciais ao organismo como proteger o organismo de insultos externos, homeostase de fluidos e detecção sensorial. Por este motivo, é o primeiro órgão insultado por substâncias tóxicas aplicadas topicamente, lesões mecânicas, infecções, dentre outros. Pesquisas envolvendo este órgão incluem a busca de agentes regenerativos, que limitem o comprometimento estético e funcional da pele com cicatrizes; a avaliação da capacidade de novos produtos (ex. peptídeos) penetrarem na pele; a pesquisa envolvendo o envelhecimento da pele e desenvolvimento de novos extratos com potencial cosmético. Entre os modelos de pesquisa que representem a pele disponíveis atualmente estão as linhagens celulares imortalizadas, as células primárias (diretamente isoladas de tecidos humanos) e os modelos animais. Dentre eles, as células primárias destacam-se pois não são artificialmente imortalizadas como as linhagens celulares imortalizadas são, e não apresentam questões éticas nem dissimilaridade genética, como os modelos animais. Portanto, as células humanas compõem os modelos que mais fielmente mimetizam a pele humana e são interessantes também por substituir os animais como modelo de pesquisa. 30 indivíduos de 18 a 60 anos, de ambos os sexos, consideradas aptos (com base nos exames indicados pelo médico responsável) que passarem por procedimento cirúrgico estético (lipoaspiração, abdominoplastia, blefaroplastia, ou outros), que assinarem o TCLE irão compor a

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1918 **E-mail:** cepfm@unb.br

Continuação do Parecer: 3.954.541

amostra. A estratégia de recrutamento será por meio de convite feito pela médica Dra. Márcia Moreira aos pacientes de sua clínica de cirurgia plástica que atenderem aos critérios de inclusão. Serão excluídos do estudo menores de 18 anos ou maiores de 60 anos e pacientes considerados inaptos a realizar o procedimento cirúrgico. A clínica Márcia Moreira Cirurgia Plástica, localizada em Brasília ficará responsável pela coleta do material humano (pele e tecido adiposo) que seria descartado. Será apresentado aos pacientes que irão realizar procedimentos de lipoaspiração, blefaroplastia, abdominoplastia, ou outros, o projeto de pesquisa e o TCLE. Evidencia-se que o procedimento de escolha dos indivíduos doadores das amostras não será alterado em nada em função do presente projeto. Apenas as amostras de tecido humano que seriam descartadas serão entregues à pesquisadora principal. Não haverá remuneração alguma à clínica ou aos pacientes. Os procedimentos para o isolamento das células da epiderme, derme e tecido adiposo estão detalhados no projeto de pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo da proposta é obter tecidos de pele e tecido adiposo humanos para isolamento, expansão, caracterização e utilização em pesquisa científica e tecnológica, aplicada sobretudo à testagem de novos cosméticos e medicamentos aplicados à pele humana.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O risco ou desconforto relatado pelo pesquisador é mínimo e que eventualmente será o da entrevista aplicada pela médica coletora do material. O risco atribuível às informações coletadas serão mitigadas pelo seu completo sigilo. Ademais, o procedimento cirúrgico pelo qual o paciente irá passar não será alterado de nenhuma forma em função da pesquisa, não acarretando nenhum risco adicional ao paciente neste estágio. Apenas após o procedimento, ao invés do excesso de tecido eventualmente retirado do paciente ser eliminado, este será encaminhado ao laboratório para isolamento de células e realização de pesquisa científica. Esta proposta poderá não trazer benefícios diretos ao paciente, mas as células obtidas a partir dos tecidos coletados serão de grande valia no desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos, cosméticos, objetos de pesquisa do grupo proponente. A proposta também propõe potencialmente salvar a vida de milhares de animais, que deixarão de ser usados em pesquisas para desenvolvimento destes produtos. O doador estará contribuindo para a evolução da ciência e desenvolvimento de produtos mais seguros e eficazes pelo simples gesto de doar os subprodutos da sua cirurgia, que normalmente seriam descartados. A participação na pesquisa não acarretará gasto ao paciente, sendo totalmente gratuita.

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1918 **E-mail:** cepfm@unb.br

Continuação do Parecer: 3.954.541

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de pesquisa prevê respeito ao participante em sua dignidade e autonomia, pondera os riscos e benefícios, garante o direito à privacidade das informações dos pacientes, bem como que o material biológico doado será utilizado exclusivamente na pesquisa. Por fim mostra o benefício social do desenvolvimento de um modelo para a testagem de drogas e medicamentos que trará um impacto socioambiental enorme frente à não utilização de experimentação em animais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados, em conformidade com a Resolução 466/CNS, os seguintes documentos: projeto detalhado da pesquisa, resumo estruturado, termo de ciência das instituições participantes, termo de compromisso dos pesquisadores, termo para utilização de dados individuais e institucionais, currículo lattes atualizado da pesquisadora principal, orçamento e cronograma atualizado. Cabe ressaltar que no projeto original consta o nome da pesquisadora associada, Dra. Márcia Moreira.

Recomendações:

Ajuntar ao processo o Currículo Lattes atualizado dos últimos 6 meses da Dra. Márcia Moreira.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto não apresenta impedimentos éticos. O parecer do colegiado foi pela aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

O colegiado em reunião extraordinária de 01/04/2020 aprovou o projeto. De acordo com a Resolução 466/2012-CONEP/CNS, itens X.1. - 3.b. e XI. -2.d, este Comitê chama a atenção da obrigatoriedade de envio do relatório parcial semestral e final do projeto de pesquisa para o CEP-FM, através de Notificações submetidas pela Plataforma Brasil, contados a partir da data de aprovação do protocolo de pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1070199.pdf	12/03/2020 10:46:59		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_Pesquisa_Brochura.pdf	12/03/2020 10:46:20	Juliana Lott de Carvalho	Aceito
Outros	Orcamento.pdf	12/03/2020 10:44:48	Juliana Lott de Carvalho	Aceito

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1918 **E-mail:** cepfm@unb.br

UNB - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE BRASÍLIA



Continuação do Parecer: 3.954.541

Cronograma	Cronograma.pdf	12/03/2020 10:33:44	Juliana Lott de Carvalho	Aceito
Declaração de Pesquisadores	12_Termo_de_Resp_e_Compromisso_Pesq_Responsvel.pdf	12/03/2020 10:24:16	Juliana Lott de Carvalho	Aceito
Outros	04_Carta_de_Encaminhamento_de_projetos.pdf	12/03/2020 10:22:33	Juliana Lott de Carvalho	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Juliana_Lott.pdf	12/03/2020 10:20:53	Juliana Lott de Carvalho	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_de_concordancia_institucional.pdf	12/03/2020 10:15:38	Juliana Lott de Carvalho	Aceito
Outros	Termo_concordancia_participante.pdf	12/03/2020 10:14:16	Juliana Lott de Carvalho	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_pdf.pdf	12/03/2020 10:12:51	Juliana Lott de Carvalho	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	12/03/2020 10:09:19	Juliana Lott de Carvalho	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BRASILIA, 04 de Abril de 2020

Assinado por:

Antônio Carlos Rodrigues da Cunha
(Coordenador(a))

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3107-1918 **E-mail:** cepfm@unb.br

Efeito do parasitismo por *Trypanosoma cruzi* sobre o potencial imunomodulatório parácrino de células-tronco

Effect of parasitism by *Trypanosoma cruzi* on the paracrine immunomodulatory potential of stem cells

Emãnuella Melgaço Garcez¹
Aline Moraes¹
Amanda Evelin Silva-Carvalho¹
Thuane Alencar²
Luciana Hagstrom Bex¹
Felipe Saldanha-Araujo¹
Mariana Hecht¹
Juliana Lott Carvalho¹

RESUMO

Objetivo: A doença de Chagas é uma infecção parasitária cujo agente etiológico é o protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. A doença impacta tecidos como a medula óssea e tecido adiposo, onde são encontradas as células-tronco mesenquimais (CTMs). Porém, até o momento, ainda não se caracterizou as consequências da infecção de CTMs pelo parasito. Portanto, neste trabalho investigamos o potencial de imunomodulação parácrina de populações de CTMs obtidas do tecido adiposo de doadores humanos saudáveis após a infecção *in vitro* por *T. cruzi*.

Metodologia: As CTMs foram isoladas do tecido adiposo de doadores saudáveis e caracterizadas, atendendo aos critérios de classificação da Sociedade Internacional de Terapia Celular. Foi estabelecida a assinatura imunológica de cada doador de CTM através da avaliação da expressão de mediadores anti-inflamatórios.

Resultados: Percebeu-se que existe diferença nos níveis de expressão basal dos genes relacionados à imunomodulação entre as CTMs de diferentes doadores. As CTMs foram infectadas pela cepa Colombiana de *T. cruzi*, na proporção 1:1 e 1:5 (CTMs: parasitos). A carga parasitária foi verificada através da detecção e

quantificação relativa do gene Tc40 e revelou variação entre as amostras. O meio condicionado entre o 5º e 7º dia de infecção das CTMs foi obtido e utilizado para realização de ensaios de dosagem de óxido nítrico (NO) em macrófagos estimulados ou não por LPS e proliferação de células T em amostras de células polimorfonucleares do sangue periférico estimuladas ou não por fitohemaglutinina (PHA). Observou-se que independente do status de infecção, o sobrenadante das CTM diminuiu o nível de liberação de NO induzido pelo LPS e a proliferação de linfócitos T induzida pela PHA. Apesar das variações individuais observadas, a infecção por *T. cruzi* comprometeu a capacidade modulatória do sobrenadante das CTMs sobre os macrófagos, mas não sobre os linfócitos T. Individualmente, a infecção pelo parasito promoveu tanto o aumento quanto a diminuição da atividade imunomodulatória parácrina das CTMs isoladas de diferentes doadores.

Conclusão: Os resultados demonstram que as CTMs podem ser parasitadas por *T. cruzi*, e que a infecção tem diferentes impactos sobre o potencial imunomodulatório das células derivadas de diferentes doadores.

DESCRITORES: *Trypanosoma cruzi*; Doença de chagas; Células-tronco mesenquimais; Tecido adiposo.

ABSTRACT

Objective: Chagas disease is a parasitic infection whose etiologic agent is the hemoflagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*. The disease impacts tissues such as bone marrow and adipose tissue, where mesenchymal stem cells (MSCs) are found. However, to date, the consequences of MSC infection by the parasite have not yet been characterized. Therefore, in this work we investigated the paracrine immunomodulation potential of MSC populations obtained from the adipose tissue of healthy human donors after in vitro infection with *T. cruzi*.

Methodology: MSCs were isolated from the adipose tissue of healthy donors and characterized, meeting the classification criteria of the International Society for Cell Therapy. The immunological signature of each MSC donor was established by evaluating the expression of anti-inflammatory mediators.

Results: It was noticed that there is a difference in the basal expression levels of genes related to immunomodulation between MSCs from different donors. The MSCs were infected by the Colombian strain of *T. cruzi*, in the proportions 1:1 and 1:5 (MSCs: parasites). The parasite load was

verified through the detection and relative quantification of the Tc40 gene and revealed variation between samples. The conditioned medium between the 5th and 7th day of MSC infection was obtained and used for assays of nitric oxide (NO) dosage in macrophages stimulated or not by LPS and T cell proliferation in samples of stimulated peripheral blood polymorphonuclear cells or not by phytohemagglutinin (PHA). It was observed that regardless of the infection status, the MSC supernatant decreased the level of NO release induced by LPS and the proliferation of T lymphocytes induced by PHA. Despite the individual variations observed, infection by *T. cruzi* compromised the modulatory capacity of the MSC supernatant on macrophages, but not on T lymphocytes. Individually, infection by the parasite promoted both an increase and a decrease in the paracrine immunomodulatory activity of MSCs. isolated from different donors.

Conclusion: The results demonstrate that MSCs can be parasitized by *T. cruzi*, and that the infection has different impacts on the immunomodulatory potential of cells derived from different donors.

DESCRIPTORS: *Trypanosoma cruzi*; Chagas disease; Mesenchymal stem cells; Adipose tissue.

¹ Universidade de Brasília

² Universidade Católica de Brasília

A doença de Chagas é uma infecção parasitária que tem como agente causador o protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. O *T. cruzi* tem um ciclo de vida complexo que envolve hospedeiros vertebrados e invertebrados (Tyler et al., 2001) e se inicia quando o inseto vetor *Triatominae* infectado libera formas tripomastigotas nas fezes perto do local da picada durante a sua alimentação de sangue. Estas formas então penetram no hospedeiro através da ferida ou pelas mucosas (López-Vélez et al., 2019). No hospedeiro vertebrado, as formas tripomastigotas invadem as células mais próximas ao local da inoculação, onde se diferenciam em formas amastigotas intracelulares, que se multiplicam por fissão binária (Bern et al., 2019). Após a multiplicação, as formas amastigotas se transformam novamente em formas tripomastigotas, e rompem a célula, indo para a corrente sanguínea (López-Vélez et al., 2019). A partir deste momento, se o hospedeiro vertebrado for picado pelo inseto vetor, os parasitos serão transmitidos ao inseto. No intestino do inseto vetor, o *T. cruzi* se transforma em epimastigotas, onde se multiplica e origina formas tripomastigotas, infectantes aos hospedeiros vertebrados (Bern et al., 2019).

A doença de Chagas é frequentemente observada na população em idade produtiva, tais como os adultos jovens, e pode causar morte prematura e incapacidade substancial, levando a perdas econômicas significativas (Abuhab et al., 2013). As complicações cardíacas e gastrointestinais muitas vezes resultam na necessidade de terapia de longo prazo e procedimentos cirúrgicos (Mathers et al., 2007). Clinicamente, a doença de Chagas apresenta uma fase aguda seguida de uma fase crônica que pode ser classificada como indeterminada, cardíaca ou gastrointestinal (Prata et al., 2001). A fase aguda da doença é caracterizada pela ocorrência de sintomas graves em cerca de 1% dos pacientes, que podem apresentar quadros de miocardite,

derrame pericárdico ou meningoencefalite (Bern et al., 2011).

A resposta imune e as manifestações imunopatológicas após a infecção pelo *T. cruzi* são dependentes, ao menos em parte, das características dos hospedeiros, da cepa do parasita, e da via de infecção (Zhang et al., 1999). O *Trypanosoma cruzi* tem características genéticas muito diversas, por isso foi feita uma classificação através das linhagens genéticas sendo chamadas de, unidades de tipagem discreta (DTUs), denominadas: Tc I a Tc VI e Tc Bat (Zingales B., 2018). A cepa colombiana de *T. cruzi* foi isolada de um paciente em 1964, na Colômbia, e tipada como Biodeme Type III e identificado como zymodeme Z1 em 1983 por Andrade e cols, de acordo com seus padrões enzimáticos (Camandaroba et al., 2001), e vem sendo amplamente utilizada em estudos sobre a cardiopatia chagásica, por apresentar tropismo pelos tecidos cardíaco e esquelético, e também por poder parasitar outros tecidos (Camandaroba et al., 2006).

Embora qualquer célula nucleada possa ser parasitada, o parasito *T. cruzi* costuma ter preferência por alguns tipos celulares. As diferentes cepas de *T. cruzi* tem como característica o histotropismo, que classifica a predominância da multiplicação do parasita em um tecido, não excluindo a possibilidade de haver multiplicação em outros tecidos (Andrade et al., 1997). A depender de sua linhagem, o parasito *T. cruzi* apresenta tropismo por miócitos cardíacos, células periféricas do músculo esquelético e liso, células endoteliais, células dos sistemas nervoso, células do tecido adiposo, dentre outros (Machado et al., 2012).

As células-tronco são identificadas de acordo com duas características: a capacidade de se diferenciar em diferentes linhagens e a capacidade de auto renovação. Essas características podem ser encontradas tanto em células embrionárias, como em

células adultas (Potten et al., 1990). De acordo com essa classificação, as células-tronco totipotentes são capazes de se dividir e se diferenciar em todos os tipos de célula, através da formação de estruturas embrionárias e extra-embrionárias (Zakrzewski et al., 2019). As CTMs foram identificadas como células-tronco residentes em quase todos os órgãos

As CTMs do tecido adiposo desempenham um papel no controle da inflamação tecidual e no processo de imunomodulação, através da adoção de um fenótipo imunorregulador em resposta à fatores inflamatórios como o *IFN- γ* , *IL-1 β* ou *TNF- α* , que serão secretados pelas células imunes ativadas (Hoogduijn et al., 2019). Quando essas células reconhecem padrões moleculares associados a patógenos, tais como o LPS, inicia-se a ativação de TLRs, que promoverá a expressão de citocinas inflamatórias como *TNF- α* (Baer et al., 2019).

A interação entre as CTMs e diferentes células imunológicas vem sendo gradualmente elucidado. Por exemplo, foi demonstrado que, de acordo com o microambiente específico proveniente das CTMs, macrófagos podem ser polarizados no perfil M1 ou M2 (Glass et al., 2016). Estudos mostraram que a co-cultura de macrófagos com CTMs promove a indução de macrófagos M2, que atuam na atividade fagocítica, na liberação de *IL-10*, e também regulam negativamente os níveis de citocinas inflamatórias, como *IFN- γ* , *TNF- α* , *IL-1 β* , e *IL-12* (Zhang et al., 2010; Liu et al., 2015).

As CTMs também demonstraram a capacidade de inibir as respostas de células T, com o objetivo de se comunicar com células apresentadoras de antígenos através da regulação positiva da molécula-1, da adesão intercelular (ICAM-1) e da molécula-1 de adesão celular vascular (VCAM-1), moléculas com atuação importante para a ativação de células T e para o processo de recrutamento de leucócitos para o local da inflamação (Ren et al., 2010).

adultos (Mazini et al., 2020). Devido a sua facilidade de isolamento em alguns tipos de tecido, tais como o tecido adiposo e medula óssea, combinada com suas capacidades de auto renovação e multipotencialidade, as CTMs vem sendo consideradas como uma opção de tratamento promissora para diversas doenças (Sacchetti et al., 2007).

As CTMs são consideradas componentes relevantes para uma ampla gama de processos fisiológicos, como hematopoese (Aqmasheh et al., 2017) e outros eventos de diferenciação celular, angiogênese, controle do stress oxidativo, dentre outros (Vizoso et al., 2019). Consequentemente, quando apresentam disfunções, as CTMs contribuem para processos patológicos. De fato, alterações em CTMs já foram descritas em doenças como lúpus, fibrose pulmonar idiopática, diabetes, psoríase, artrite reumatoide, síndromes mielodisplásicas e também ao longo do envelhecimento (Vizoso et al., 2019).

Quando em contato com patógenos, as CTMs também apresentam alterações funcionais. Quando em contato com patógenos, as CTMs podem ter sua capacidade imunorregulatória comprometida como observado após a infecção de CTMs por citomegalovírus (Meisel et al., 2014), ou no caso de patógenos reconhecidos por TLR3 (Najar et al., 2017). Porém, a investigação da interação de CTMs com diferentes patógenos ainda é incipiente, justificando novos trabalhos e contribuindo para a concepção de que as CTMs constituem não apenas ferramentas terapêuticas, mas parte do processo fisiopatológico em diferentes doenças.

Considerando as alterações teciduais locais e sistêmicas observadas na doença de Chagas, o presente trabalho tem como objetivo investigar como as populações de CTMs obtidas do tecido adiposo de doadores humanos saudáveis se comportam durante a infecção pelo parasito hemoflagelado *T. cruzi*, e se essa

infecção altera a capacidade imunomodulatória parácrina dessas células, por meio de ensaios com macrófagos e células mononucleadas do sangue periférico (PBMCs).

METODOLOGIA

Cultivo de *Trypanosoma cruzi*

As formas epimastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi* foram provenientes do banco de células disponível no laboratório interdisciplinar de biociências da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, mantidas a 25 °C em meio Lit suplementado com 10% de SFB, 100 IU/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomina (Gibco), e os repiques foram feitos a cada 15 dias. Para a obtenção de formas tripomastigotas, foi feita a cultura de células da linhagem L6, que foram mantidas em meio DMEM suplementado com 5% v.v. SFB (Gibco) e incubadas a 37 °C e 5% CO₂ por 3 dias, quando foram infectadas pelas formas epimastigotas de *T. cruzi*. Após 7 dias, o sobrenadante foi coletado e centrifugado por 5 minutos a 300 g para a obtenção do pellet (Dumoulin et al., 2018).

Isolamento, cultivo e caracterização de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo

As CTMs humanas foram isoladas a partir do tecido adiposo subcutâneo abdominal de doadores saudáveis (n=3) que passaram por cirurgia de lipoaspiração. A obtenção das amostras de tecido adiposo ocorreu após a assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido, conforme projeto aprovado pelo comitê de ética de pesquisa da Universidade de Brasília (protocolo número 30175020.00000.5558). As CTMs foram isoladas conforme de Carvalho JL et al., 2015. O tecido adiposo coletado foi lavado com tampão fosfato-salino (PBS) 0,15 M suplementado com uma solução de penicilina e estreptomina (Gibco) nas concentrações finais de 100 U/mL e 100 µg/mL, respectivamente. Após a lavagem, o

tecido adiposo foi então digerido por 1 hora a 37° C, em solução de collagenase do tipo 2 (Gibco), na concentração de 0,01% p.v. Ao final da digestão, a enzima foi inativada por meio da adição do mesmo volume de SFB (Gibco), e a amostra centrifugada para a obtenção e plaqueamento das células do pellet, descrito como a fração vascular estromal do tecido adiposo. O cultivo das células da fração vascular estromal foi feito em DMEM low glucose (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% v.v. de SFB (Gibco), a 37 °C e 5% CO₂. As células foram expandidas até a 3.^a passagem e criopreservadas em nitrogênio líquido até a realização dos experimentos. As células isoladas de cada doador foram aleatoriamente denominadas CTM 1, 2 e 3.

Caracterização das células-tronco mesenquimais

A caracterização das CTMs foi feita seguindo as recomendações da Sociedade Internacional de Terapia Celular e Gênica (Dominici et al., 2006).

Infecção de células-tronco mesenquimais com *T. cruzi*

As CTMs 1, 2 e 3 foram cultivadas em garrafas T75 (Kasvi) com DMEM low glucose (Sigma-Aldrich), suplementado com 10% v.v. de SFB (Gibco). As células foram infectadas por formas epimastigotas da cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi*, em duas concentrações diferentes, sendo 1:1 e 1:5 (CTMs: parasitos) e mantidas por 72 h a 37 °C e 5% CO₂. As células de cada doador foram consideradas como uma replicata biológica. Após a visualização da infecção das células pelos parasitos, foi iniciada a troca de meio DMEM low glucose (Sigma-Aldrich), suplementado com 5% v.v. SFB (Gibco) a cada 2 ou 3 dias.

Determinação da carga parasitária

A carga parasitária foi determinada por meio de PCR em tempo real (ou PCR quantitativa, qPCR) com o kit *Lumina Ct Sybr Green qPCR ReadyMix* (Sigma) com CTM de

3 doadores, infectadas e não infectadas por *T. cruzi* para a avaliação da expressão do gene Tc40 (Rose et al., 2020).

Ensaio de ativação e polarização M1/M2 em macrófagos da linhagem U937 tratados com sobrenadante de CTM infectadas ou não por T. cruzi

As células de linfoma U937 foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro e mantidas em meio RPMI 1640 (Invitrogen®) com adição de 10% v.v. de SFB (Gibco), a 37 °C e 5% de CO₂. Para os experimentos, as células foram plaqueadas e tratadas com 10 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma-Aldrich) em placa de 96 poços em uma densidade de 10⁵ células / poço por 24 horas, seguindo protocolo amplamente padronizado na literatura (Song et al., 2015; Prasad et al., 2020; Yang et al., 2017). Após 24h, foi adicionado, de acordo com o grupo experimental, o sobrenadante de CTMs infectadas ou não infectadas diluído 1:1 em RPMI/SFB, além de LPS na concentração de 0,5 µg/mL. As células foram então incubadas por mais 24 h e o sobrenadante coletado para a avaliação da produção de óxido nítrico (Green et al., 1982).

Quantificação da produção de Óxido Nítrico

O método de Griess foi usado para quantificar a produção de óxido nítrico (NO). Foram adicionados 20 µl de reagente de Griess, que foi preparado com 0,05 g de sulfanilamida a 1% e N-(1-naftil) etilenodiamina dihidrocloridrato à 0,2% dissolvido em ácido fosfórico à 5%, dissolvidos em 25 mL de água destilada. A concentração restante de nitrito foi determinada a 540 nm. Os resultados foram expressos como uma porcentagem do nitrito gerado, estabelecida por meio da realização de uma curva de diluição usando nitrito de sódio como padrão (Green et al., 1982).

Ensaio de ativação de linfócitos T tratados com sobrenadante de CTMs infectadas ou não por T. cruzi

Foi feito cultivo de células mononucleares de sangue periférico (*peripheral blood mononuclear cells* - PBMCs) seguida de ativação com Fitohemaglutinina (*phytohemagglutinin* - PHA, 5 µg/mL) (Hearing et al., 1999; Lin et al., 2018), e avaliação de proliferação através da marcação dos PBMCs por carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE) (Serejo et al., 2019).

PCR em tempo real

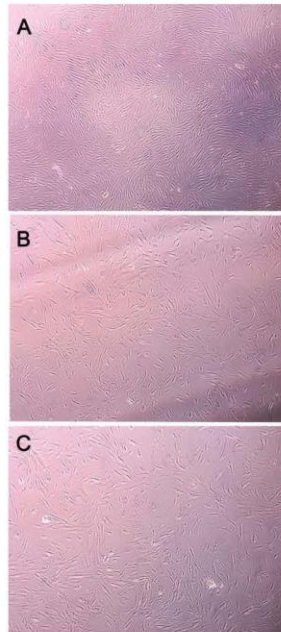
A análise de expressão gênica foi realizada por PCR em tempo real com o kit Lumina Ct Sybr Green qPCR ReadyMix (Sigma-Aldrich). Com este kit, para cada amostra utilizou-se: 1,9 µL de água RNase free; 5 µL do Lumina S.G; 0,5 µL do Primer R; 0,5 µL do Primer F, 0,1 µL de Rox e 2 µL de cDNA. As amostras, em volume final de 10 µL, foram submetidas ao seguinte ciclo de temperatura no equipamento Step One: 10 minutos a 25 °C; 120 minutos a 37 °C; 5 minutos a 85 °C e 4 °C. A expressão dos seguintes genes foi avaliada: *GAPDH*; *IFN-γ*; *TNF-α*; *IL-10*; *TGF-β*; *IL-16*; *Tc40*; *IDO* e *TSG-6*.

RESULTADOS

Isolamento e caracterização das células-tronco-mesenquimais

As CTMs isoladas a partir da doação de tecido adiposo de três doadores saudáveis foram capazes de aderir ao plástico durante o processo de cultivo e apresentaram morfologia fibroblastoide.

Figura 1. Cultivo de células-tronco mesenquimais (CTMs) de 3 doadores em meio DMEM suplementado com 10% v.v. de



SFB, visualizadas em microscópio invertido, sendo: (A) CTM 1, (B) CTM 2 e (C) CTM 3. Imagem feita em objetiva de 5x.

A caracterização do perfil imunofenotípico foi feita através da análise da expressão dos marcadores de superfície CD44; CD73; CD90 e CD140 que foram analisados de forma individual e dos marcadores CD11b; CD19; CD34; CD45 e HLA-DR, que foram analisados utilizando-se um pool com todos os anticorpos contra esses marcadores. Os marcadores de superfície que foram analisados de forma individual, são considerados marcadores positivos de CTMs pela Sociedade Internacional de Terapia Celular. Os marcadores que foram analisados em pool são considerados como marcadores negativos para CTMs, pois são indicativos de contaminação por células de linhagens hematopoiéticas.

O doador 2 de CTM apresentou um nível de expressão mais baixo para o marcador CD90 em relação aos outros doadores. Os demais marcadores apresentaram uma expressão semelhante entre os doadores, permanecendo sempre em níveis acima de 90%. Apenas as CTM 1 apresentaram nível de positividade levemente superior ao preconizado pela Sociedade Internacional de Terapia Celular. Os valores acima de 95% para os marcadores positivos e abaixo de 5% para os marcadores negativos indicam o sucesso no isolamento de populações celulares enriquecidas de CTMs. No entanto, foi possível observar diferenças nos níveis de expressão das proteínas avaliadas entre as amostras biológicas.

Figura 2: Histogramas representativos dos marcadores positivos CD44; CD73; CD90 e CD140 em CTMs isoladas de três doadores. A linha preta pontilhada representa o controle de isotipo. A cor azul representa o nível de positividade para cada um dos marcadores avaliados.

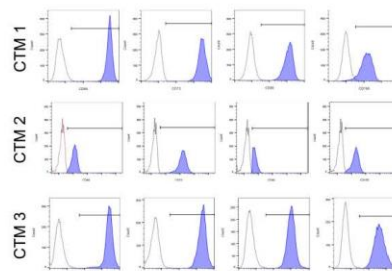
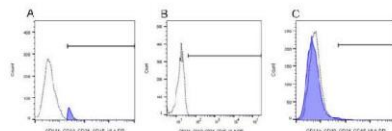


Figura 3: Histogramas representativos dos marcadores negativos CD11b; CD19; CD34; CD45 e HLA-DR em CTMs isoladas de três doadores. A avaliação da expressão destes marcadores foi feita com pool de anticorpos, nas amostras (A) CTM 1, (B) CTM 2 e (C) CTM 3. A linha preta pontilhada representa o controle de isotipo (controle negativo de marcação). A cor azul



representa o nível de positividade para os marcadores avaliados.

Foi possível confirmar o potencial de diferenciação multipotente das CTMs isoladas através do ensaio de diferenciação em adipócitos e condrócitos (Figura 4 e 5). A capacidade de diferenciação foi verificada por meio de cultivo em diferentes meios de indução. As diferenciações adipogênica e condrogênica duraram 21 dias, período após o qual as células foram fixadas e coradas com corantes específicos para a detecção de cada tipo celular. Nas amostras induzidas à diferenciação adipogênica (Figura 4), foi possível visualizar acúmulo intracelular de lipídios de forma nítida em todos os grupos estimulados à diferenciação. Por outro lado, as células mantidas em meio basal não apresentaram acúmulo lipídico. Nas amostras induzidas à diferenciação condrogênica (Figura 5), foi possível realizar a visualização do acúmulo de matriz extracelular rica em glicosaminoglicanas nos grupos induzidos à diferenciação, ao contrário das células mantidas em meio de cultivo basal.

Figura 4. Diferenciação adipogênica de células-tronco mesenquimais (CTMs). As CTMs foram diferenciadas pelo período de 21 dias, quando foram coradas por meio de coloração de Oil Red. À esquerda, são apresentadas imagens representativas de células mantidas em meio de cultura basal, visualizadas em objetiva de 5x, sendo (A) CTM 1; (C) CTM 2 e (E) CTM 3. À direita, são apresentadas imagens representativas de células do mesmo doador mantidas em meio de diferenciação adipogênica, visualizadas em objetiva de 10x, sendo (B) CTM 1; (D) CTM 2 e (F) CTM 3.

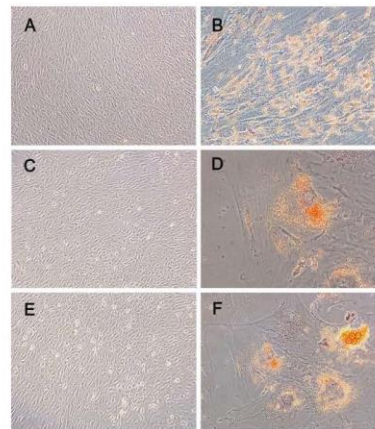
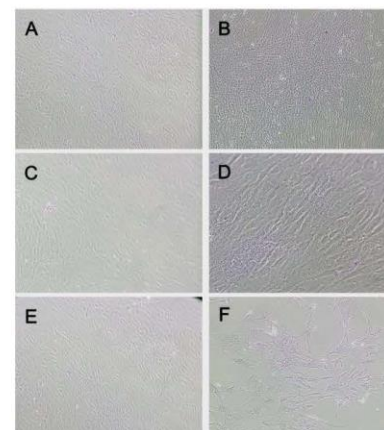


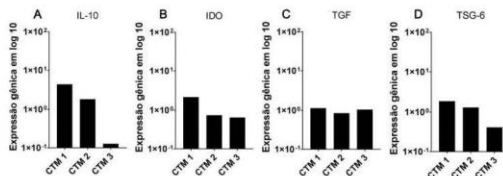
Figura 5. Diferenciação condrogênica de células-tronco mesenquimais (CTMs). As CTMs foram diferenciadas pelo período de 21 dias, quando foram coradas por meio de coloração de Alcian Blue. À esquerda, são apresentadas imagens representativas de células mantidas em meio de cultura basal, visualizadas em objetiva de 5x, sendo (A) CTM 1; (C) CTM 2 e (E) CTM 3. À direita, são apresentadas imagens representativas de células do mesmo doador mantidas em meio de diferenciação condrogênica, visualizadas em objetiva de 10x, sendo (B) CTM 1; (D) CTM 2 e (F) CTM 3.



Assinatura imunológica das CTMs

Foi feito PCR em tempo real dos genes *GAPDH* que foi usado como controle, *IL-10*, *IDO*, *TGF- β* e *TSG-6*, com o objetivo de estabelecer o padrão da expressão de genes relacionados à capacidade imunomodulatória nas CTMs dos diferentes doadores (Figura 6). Observou-se que existe diferença nos níveis de expressão basal dos genes relacionados a imunomodulação entre as CTMs, sendo que a CTM 1 expressa maior nível *IL-10*, *IDO*, *TGF- β* e *TSG-6* quando comparada às CTMs dos outros doadores.

Figura 6. Gráfico representativo da expressão de genes relacionados a imunomodulação em amostras dos diferentes doadores de células-tronco mesenquimais (CTMs 1, 2 e 3), sendo, (A) Expressão gênica de *IL-10*; (B) Expressão gênica de *IDO*; (C) Expressão gênica de *TGF- β* e (D) Expressão gênica de *TSG-6*.



Ensaio de infecção de células-tronco mesenquimais por *Trypanosoma cruzi*

As CTMs caracterizadas foram utilizadas para o experimento de infecção por *Trypanosoma cruzi*. Para a infecção, foi escolhida a cepa Colombiana de *T. cruzi*. As CTM foram plaqueadas e divididas em três grupos experimentais. A infecção foi mantida por 72 horas, até que os primeiros ninhos de amastigotas pudessem ser visualizados no grupo de infecção 1:5. A infecção das células foi bem-sucedida, porém foi detectada toxicidade celular a partir do 5.^o dia pós infecção no grupo infecção 1:5 e, a partir do 10.^o dia no grupo infecção 1:1. Aos 7 dias de infecção, o sobrenadante das culturas foi coletado e as células, tripsinizadas para isolamento de RNA, com o intuito de avaliar alterações de

expressão gênica e carga parasitária. As demais células foram criopreservadas ou replaqueadas para observação até o 14.^o dia. Porém, as células infectadas perderam a viabilidade antes de completar 14 dias de infecção. Não foram detectadas diferenças significativas entre as replicatas biológicas. Os resultados obtidos mostram, portanto, que foi possível observar a infecção das CTMs por *T. cruzi* tanto na proporção de 1:1 (Figura 7) como 1:5 (Figura 8).

Figura 7. Cultivo de CTMs dos três doadores, após 7 dias de infecção por *T. cruzi* na concentração de 1:1 (CTMs: parasitos). (a) CTM 1, (b) CTM 2 e (c) CTM 3, visualizadas em objetiva de 40x. As setas apontam os parasitos visualizados nas amostras.

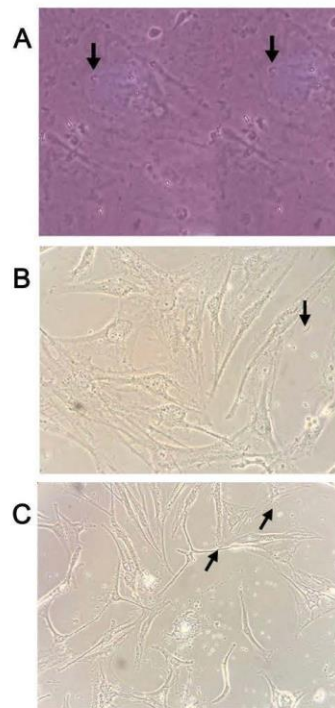
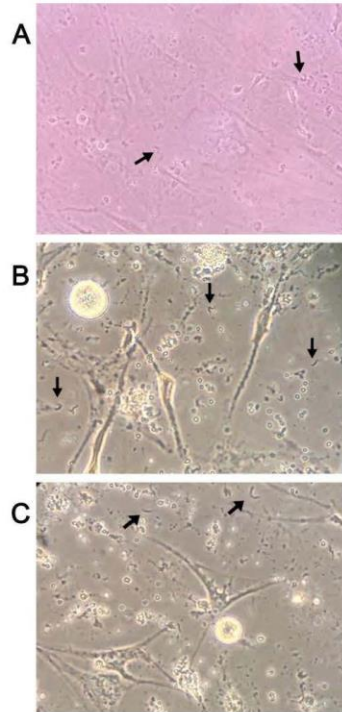


Figura 8. Cultivo de CTMs dos três doadores, após 7 dias de infecção por *T. cruzi* na concentração de 1:5 (CTMs: parasitos). (a) CTM 1, (b) CTM 2 e (c) CTM 3,

visualizadas em objetiva de 40x. As setas apontam os parasitos visualizados nas

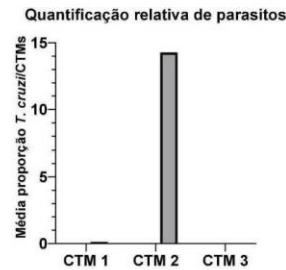


amostras.

Determinação da carga parasitária

Com o objetivo de confirmar a infecção observada microscopicamente e determinar a carga parasitária das amostras de CTMs dos três doadores infectadas por *T. cruzi*, foi feito PCR em tempo real para detecção e quantificação relativa do gene *Tc40* que está presente em todas as fases da infecção pelo parasito (Figura 9).

Figura 9. Gráfico representativo da expressão do gene *Tc40* em amostras dos três doadores de CTMs infectados pelo *T. cruzi*.



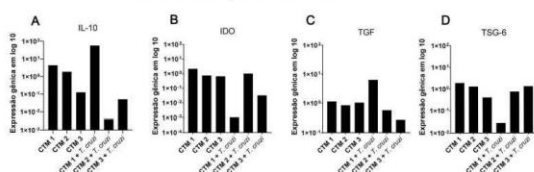
Foi possível perceber que houve variação na quantificação da carga parasitária entre as amostras de CTMs infectadas, apesar da mesma proporção CTMs: parasitos ter sido utilizada inicialmente. Enquanto a parasitemia pode ser detectada e quantificada nas amostras de CTM 1 e CTM 2 infectadas, as amostras de CTM 3, mesmo tendo parasitos visualizados por microscopia, não tiveram o cDNA do parasito detectado por meio de qRT-PCR.

Avaliação da expressão de genes associados à imunorregulação em células-tronco mesenquimais infectadas por *Trypanosoma cruzi*

A fim de avaliar se a infecção das CTMs mudaria a expressão de citocinas secretadas por essas células, foi feito PCR em tempo real dos genes *GAPDH* que foi usado como controle, *IL-10*, *IDO*, *TGF-β* e *TSG-6*. Após a infecção, enquanto as CTM 1 apresentaram aumento no nível de expressão de *IL-10* e *TGF-β*, CTM 2 e 3 tiveram diminuição da expressão desse gene. Por outro lado, *IDO* teve seu nível de expressão aumentado após a infecção por *T. cruzi* na CTM 2, evento não observado nas demais amostras. Por fim, enquanto CTM 1 e 2 tiveram diminuição da expressão de *TSG-6* após a infecção por *T. cruzi*, as CTM 3 apresentaram aumento na expressão desse gene. Foi possível observar, portanto, que existe diferença na expressão dos genes avaliados entre os doadores de CTMs, o que

seria sugestivo de uma possível variação de potencial ou perfil imunorregulatório entre as células dos diferentes doadores após a infecção.

Figura 10. Gráfico representativo da expressão gênica de citocinas em amostras dos três doadores de CTMs não infectados e infectados por *T. cruzi*. (A) Expressão gênica de *IL-10* em CTMs não infectados e infectados pelo *T. cruzi*; (B) Expressão gênica de *IDO* em CTMs não infectados e infectados pelo *T. cruzi*; (C) Expressão gênica de *TGF- β* em CTMs não infectados e infectados pelo *T. cruzi* e (D) Expressão gênica de *TSG-6* em CTMs não infectados e infectados pelo *T. cruzi*.

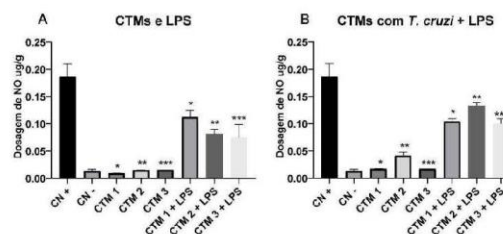


Avaliação da produção de óxido nítrico em macrófagos estimulados com LPS e tratados com o sobrenadante de CTMs infectadas ou não por *T. cruzi*

As células U937 foram diferenciadas em macrófagos e tratadas com sobrenadante de CTMs infectadas por *T. cruzi* e com sobrenadante de CTMs controle (não infectadas). Após estímulo feito com LPS, foi feita a dosagem de NO de modo a avaliar se o tratamento de macrófagos com sobrenadante de CTMs infectadas ou não era capaz de alterar os níveis de secreção de NO (Figura 11).

Figura 11. Gráfico da comparação da secreção de óxido nítrico (NO) entre os grupos de macrófagos tratados com sobrenadante de CTMs infectadas e não infectadas por *T. cruzi*. (A) Macrófagos tratados com sobrenadante de CTMs não infectadas por *T. cruzi*, estimulados e não estimulados por LPS; (B) Macrófagos tratados com sobrenadante de CTMs infectadas por *T. cruzi*, estimulados e não estimulados por LPS. CN+: controle positivo composto por macrófagos estimulados por

LPS. CN-: controle negativo composto por macrófagos sem tratamento.



Foi possível observar que a secreção de NO foi aumentada no controle positivo do experimento e também em todos os grupos que foram estimulados por LPS. Foi possível observar também que o tratamento com o sobrenadante de CTMs diminuiu os níveis de produção de NO em todas as amostras estimuladas com LPS, independente do doador ou status de infecção por *T. cruzi* das CTMs. A análise estatística foi feita através da comparação entre o grupo de macrófagos tratados com sobrenadante de CTMs não infectadas, não estimulados e o mesmo grupo, sendo estimulado por LPS, sendo feita a uma análise para cada doador de CTMs.

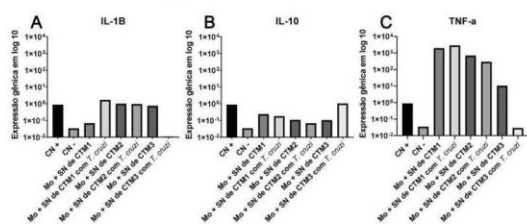
Nos grupos de macrófagos tratados com o sobrenadante de CTMs infectadas por *T. cruzi*, a análise estatística foi feita da mesma forma, através da comparação entre o grupo estimulado e o grupo não estimulado, em cada doador de CTM. Observou-se que houve diferença estatística entre os grupos, com valor de $p < 0,0001$ nos grupos de macrófagos tratados com o sobrenadante de CTMs infectadas por *T. cruzi*, e também nos grupos com o sobrenadante de CTMs não infectadas, com valor de $p < 0,0001$. Todos os sobrenadantes de CTMs foram capazes de promover a diminuição na produção de NO, mesmo na presença da infecção pelo *T. cruzi*.

Avaliação da expressão gênica em macrófagos

Com o objetivo de avaliar a polarização de macrófagos estimulados e não estimulados por LPS e tratados com o sobrenadante de CTMs infectadas e não infectadas por *T.*

cruzi, foi realizada análise da expressão dos genes *IL-1 β* , *TNF- α* e *IL-10* (Figura 12 e 13). Observou-se uma variação grande entre os doadores na expressão de todos os genes. Na ausência de estímulo por LPS (Figura 12), os macrófagos tratados com sobrenadante de CTM 1 infectadas tiveram aumento da expressão de *IL-1 β* , quando comparados ao grupo que recebeu sobrenadante destas células não infectadas, o posto do que foi observado nas amostras tratadas com sobrenadantes derivados de CTM 3. Por outro lado, as amostras de macrófagos tratadas com sobrenadante de CTM 2 infectadas e não infectadas tiveram expressão semelhante de *IL-1 β* . Considerando a expressão de *IL-10*, apenas as amostras tratadas com o sobrenadante de CTM 3 infectadas por *T. cruzi* tiveram aumento de expressão do gene em relação à amostra incubada com sobrenadante de CTM não infectada. Considerando a expressão de *TNF- α* , amostras incubadas com o sobrenadante de CTM 1 infectada tiveram maior expressão do gene do que as amostras incubadas com o sobrenadante de CTM 1 não infectada, observação contrária aos dados de CTM 2 e CTM 3.

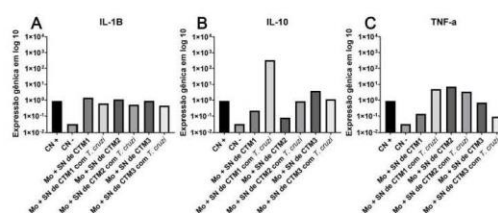
Figura 12. Gráficos representativos da expressão gênica de macrófagos tratados com sobrenadantes de CTMs infectadas e não infectadas por *T. cruzi*. (A) Expressão gênica de *IL-1 β* ; (B) Expressão gênica de *IL-10* e (C) Expressão gênica de *TNF- α* .



Considerando as amostras de macrófagos estimulados com LPS e tratados com sobrenadantes de CTM (Figura 13), observou-se que a expressão de *IL-1 β* não sofreu grandes alterações, independente da

condição experimental. Por outro lado, *IL-10* teve sua expressão aumentada nas amostras de macrófagos estimuladas por LPS e tratadas com o sobrenadante de CTM infectada em relação às amostras incubadas com o sobrenadante de CTM não infectada, tanto na amostra de CTM 1 quanto CTM 2. Já a expressão de *TNF- α* foi menor nas amostras de macrófagos estimulados por LPS e tratados com o sobrenadante de CTM 2 e 3 infectadas, quando comparadas às amostras estimuladas com LPS e incubadas com sobrenadante de CTMs não infectadas.

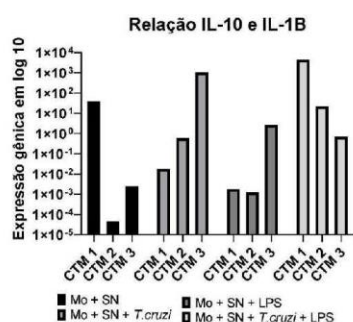
Figura 13. Gráficos representativos da expressão gênica de macrófagos tratados com sobrenadantes de CTMs infectadas e não infectadas por *T. cruzi* estimulados por LPS. (A) Expressão gênica de *IL-1 β* ; (B) Expressão gênica de *IL-10* e (C) Expressão gênica de *TNF- α* .



Uma vez que macrófagos M1 são caracterizados pela alta expressão de *IL-1 β* após estímulo, e macrófagos M2 são caracterizados pela alta expressão de *IL-10*, realizou-se a análise da razão da expressão destes genes, com o intuito de se avaliar o perfil adquiridos pelos macrófagos estimulados por LPS e tratados com os sobrenadantes de CTM (Figura 14). Nas amostras tratadas com o sobrenadante de CTM 1, observou-se uma possível polarização M1 no grupo estimulado com LPS, e possível polarização M2 no grupo estimulado com LPS e tratado com o sobrenadante de CTM infectada. Considerando as amostras tratadas com os sobrenadantes de CTM 2, observou-se possível polarização M1 nos macrófagos estimulados com LPS e tratados com o sobrenadante de CTM 2. Nas amostras

estimuladas pelo sobrenadante de CTM 3, observou-se possível polarização M1 de macrófagos sem estímulo de LPS e tratados com o sobrenadante de CTM não infectadas. Após infecção das CTM 3 por *T. cruzi*, a razão *IL-10/IL-18* foi revertida, sugerindo polarização M2 nas amostras sem estímulo com LPS.

Figura 14. Gráficos representativos da razão entre a expressão gênica de *IL-10* e *IL-18* (*IL-10/IL-18*) em macrófagos tratados com sobrenadantes de CTMs infectadas e não infectadas por *T. cruzi*, estimuladas e não estimuladas por LPS.



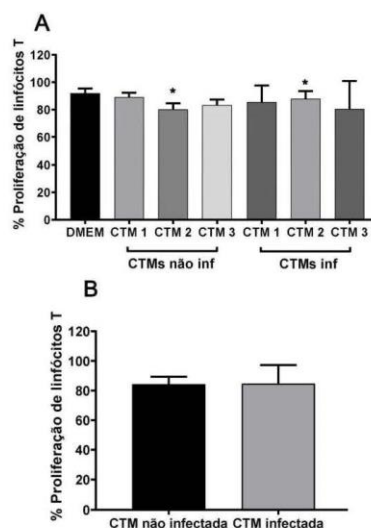
Ensaio de proliferação de PBMCs estimuladas com fitohemaglutinina e tratadas com o sobrenadante de CTMs infectadas ou não por *T. cruzi*

Este experimento teve como objetivo avaliar a taxa de proliferação de linfócitos T estimulados ou não por PHA. Após o isolamento de PBMCs de três doadores, as células foram marcadas com CFSE, plaqueadas e tratadas com sobrenadante de CTMs infectadas ou não por *T. cruzi*. Amostras pareadas foram incubadas com PHA ou mantidas em meio basal. As análises foram feitas por citometria de fluxo.

Foi possível observar diferenças entre os resultados obtidos a partir de PBMCs e CTMs dos diferentes doadores. Tomados juntos, os dados derivados dos três doadores de CTMs mostram que não houve diferença entre a capacidade de imunomodulação parácrina de CTMs

controle versus infectadas por *T. cruzi* (Figura 15 A). Porém, quando analisados de maneira qualitativa considerando as médias dos dados de cada doador, foi possível notar que o potencial imunomodulatório parácrino de CTM 1 e 3 foi realçado após infecção pelo *T. cruzi*, enquanto o potencial imunossupressor parácrino da CTM 2 foi comprometido após infecção (Figura 15 B).

Figura 15. Gráficos representativos de proliferação de linfócitos T em amostras de PBMCs estimuladas por PHA e tratadas com sobrenadante de CTMs infectadas e não infectadas por *T. cruzi*. (A) PBMCs estimulados por PHA, e tratadas com sobrenadante de CTMs infectadas e não infectadas por *T. cruzi* dos três doadores de CTMs (CTM 1, 2 e 3), e (B) Comparação entre o tratamento feito com sobrenadantes de CTMs não infectadas e infectadas por *T. cruzi*.



Em relação aos doadores de CTMs, foi possível observar variação entre as amostras derivadas de doadores diferentes, sendo que as amostras de dois doadores tiveram a proliferação de linfócitos menor no grupo tratado com sobrenadante de CTMs infectado por *T. cruzi*. O outro doador

apresentou comportamento oposto, tendo a proliferação diminuída no grupo tratado com sobrenadante de CTMs não infectadas.

Avaliação da expressão gênica em PBMCs

Com o objetivo de investigar se o sobrenadante das CTMs infectadas ou não por *T. cruzi* alteraria o microambiente de PBMCs, realizou-se isolamento de RNA e análise de expressão de genes por meio de qRT-PCR.

Foi possível perceber que os grupos de PBMCs que foram tratados com os sobrenadantes das CTM 1, 2 e 3 apresentaram expressão alta de *IL-10* e *TGF- β* . Quando os mesmos grupos foram estimulados por PHA, houve diminuição na expressão de todos os genes. Além disso, o sobrenadante de CTMs infectadas levou a menor expressão de *IL-10* comparado aos grupos tratados com sobrenadante de CTMs não infectadas.

Figura 16. Gráficos representativos da expressão gênica de PBMCs tratados com sobrenadantes de CTMs infectadas e não infectadas por *T. cruzi*. (A) Expressão gênica de *IL-10*; (B) Expressão gênica de *TGF- β* ; (C) Expressão gênica de *INF- γ* e (D) Expressão gênica de *TNF- α* .

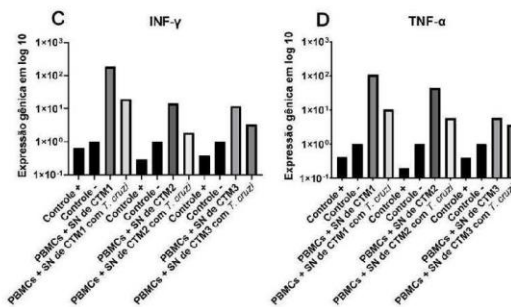
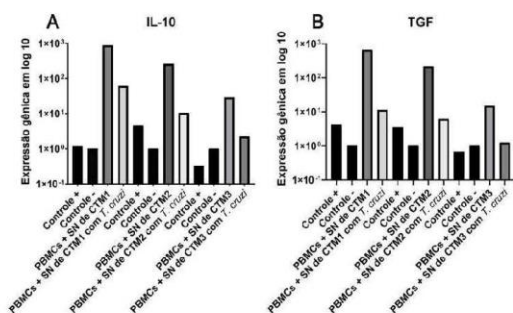
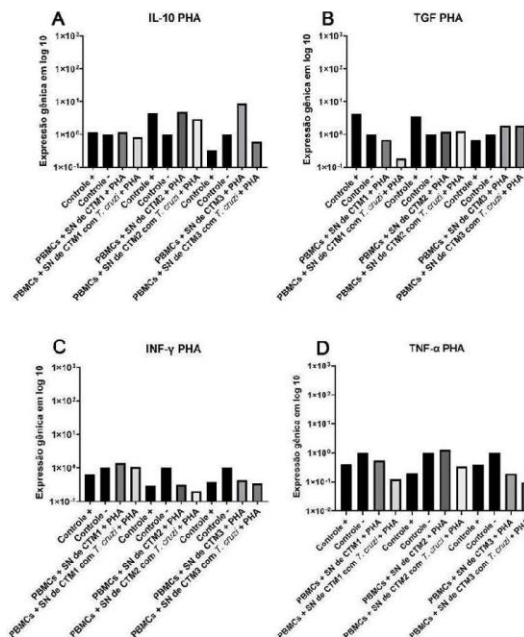


Figura 17. Gráficos representativos da expressão gênica de PBMCs tratados com sobrenadantes de CTMs infectadas e não infectadas por *T. cruzi* e estimulados por PHA. (A) Expressão gênica de *IL-10*; (B) Expressão gênica de *TGF- β* ; (C) Expressão gênica de *INF- γ* e (D) Expressão gênica de *TNF- α* .



Portanto, foi possível perceber que existem diferentes níveis de expressão entre as amostras de PBMCs que foram tratadas

com os sobrenadantes das CTMs dos três doadores. Quando os PBMCs foram tratados com sobrenadantes das CTMs infectadas pelo *T. cruzi*, houve diferença no perfil de expressão dos genes associados a imunomodulação.

DISCUSSÃO

A patogênese da doença de Chagas é complexa, portanto, se faz necessária uma melhor compreensão dos mecanismos celulares e moleculares que coordenam e promovem as alterações fisiopatológicas observadas clinicamente. O tecido adiposo atua diretamente na homeostase metabólica e no desenvolvimento de doenças humanas (Choe et al., 2016).

As CTMs foram obtidas do tecido adiposo de três doadores saudáveis sendo isoladas conforme foi descrito por de Carvalho et al., 2015. A Sociedade Internacional de Terapia Celular propõe uma série de critérios para permitir a identificação das células-tronco mesenquimais (Dominici et al., 2006). Os critérios são a capacidade de adesão ao plástico, a expressão de marcadores específicos e o potencial de diferenciação multipotente. A capacidade de aderência à superfície de cultivo foi verificada durante o processo de cultivo.

Como não há um marcador exclusivamente expresso por CTMs, a sua identificação imunofenotípica se dá por meio da avaliação de uma combinação de marcadores positivos e negativos. Conforme imunofenótipo estabelecido pela Sociedade Internacional de Terapia Celular, a população de CTMs, independente de seu tecido de origem, deve apresentar expressão >95% de marcadores de superfície como o CD105, CD73, CD90 e CD44. É admissível que exista essa variância entre doadores, que decorre da individualidade de cada doador, do tecido originário, e também da qualidade do isolamento dessas células (Lin et al., 2013; Yang, 2018).

A expressão dos marcadores que devem apresentar valores <2% foi feita através de

um pool de anticorpos, sendo assim, a discussão é limitada. Considerando que os anticorpos do pool podem identificar células diferentes, a positividade das CTM 1 para os marcadores negativos acima de 2% não é suficiente para desqualificar tal amostra biológica. De fato, alguns trabalhos mais atuais consideram como 5% o limite máximo aceitável para a expressão dos marcadores considerados negativos em populações de CTMs (Mckinnirey et al., 2021).

Entre as amostras de CTMs isoladas e caracterizadas neste trabalho, a CTM 2 apresentou nível de expressão do CD90 abaixo do esperado. A baixa expressão de CD90 já foi associada a menor capacidade imunomodulatória, que pode estar relacionada a baixa produção de IL-10 que costuma ocorrer em condições de baixa expressão de CD90 (Campioni et al., 2009). Porém, neste trabalho não se investigou a fundo se as diferenças biológicas encontradas entre as CTMs de diferentes doadores relacionam-se diretamente a esta diferença imunofenotípica ou se estariam associadas a outras características biológicas não avaliadas.

Além da avaliação da capacidade de adesão ao plástico e imunofenótipo específico, a caracterização de uma população de CTMs também demanda a validação funcional das células, por meio da verificação do potencial de diferenciação multipotente. Para tanto, as CTMs dos três doadores foram estimuladas com meio basal acrescido de componentes indutores, específicos para cada tipo de diferenciação, conforme foi descrito no item 5.4.3.4. Foi feita a diferenciação adipogênica e condrogênica que teve duração de 21 dias.

Os resultados obtidos através das diferentes colorações indicaram que as células dos três doadores foram capazes de se diferenciar mediante estímulo específico, apresentando certas diferenças qualitativas entre elas. Nos poços induzidos à diferenciação adipogênica, foi possível observar a presença de gotículas lipídicas de forma bem nítida nas células derivadas dos

três doadores. As células do grupo controle, mantidas em meio basal, não apresentaram esse acúmulo intracelular de lipídeos, excluindo a possibilidade de contaminação da amostra com adipócitos ou diferenciação espontânea. Nos poços induzidos à diferenciação condrogênica, foi possível observar a formação de matriz extracelular por agregados celulares densos e coloração leve de azul de alcian, indicativo de deposição de matriz extracelular (Hamid et al., 2012) rica em glicosaminoglicanos sulfatados e não sulfatados, proteoglicanos grandes e pequenos e colágenos, tipicamente secretada por condrócitos (Wang et al., 2008).

Apesar de ser considerada um parâmetro qualitativo essencial para a caracterização de populações de CTMs, a capacidade de diferenciação de CTMs obtidas de diferentes doadores é variável. Diferentes autores demonstram que a multipotencialidade de CTMs é influenciada pela idade do doador e sexo, dentre outros (Chamberlain et al., 2007). É relevante salientar ainda, que, apesar de atenderem a determinados pré-requisitos para sua identificação, as CTMs não são uma população homogênea de células (Liu et al., 2019). Por mais que diversos trabalhos investiguem CTMs que atendem aos critérios de identificação determinados pela Sociedade Internacional de Terapia Celular, importantes diferenças funcionais podem ser observadas entre CTMs isoladas de diferentes doadores.

Caracterizou-se, neste trabalho, a expressão de mediadores anti-inflamatórios como, TGF- β , IDO e IL-10, e a partir dos valores referentes a expressão de cada mediador em cada doador de CTM, foi possível estabelecer o que denominamos "assinatura imunológica". As CTMs tiveram a sua capacidade imunomodulatória inicialmente verificada por ensaios de modulação de proliferação de células T, mostrando então que dispõem da capacidade de suprimir a proliferação (Bartholomew et al., 2002).

Foi possível observar que a CTM 1 apresenta uma expressão basal relativamente alta de IL-10, IDO, TGF- β e TSG-6, quando comparada às demais CTM investigadas. As CTM 2 e 3 apresentaram valores de expressão menores de IDO, TGF- β e TSG-6 em relação a CTM 1. A CTM 2 tem nível intermediário de expressão de IL-10 e TSG-6, quando comparada a CTM 1 e 3. Observou-se ainda que os níveis de expressão de TGF- β apresentaram menor variação entre os três doadores e que a CTM 3 foi a que apresentou os menores níveis de expressão basal de IL-10 e TSG-6 entre as amostras analisadas.

Neste trabalho foi possível perceber que existe uma diferença clara nos níveis de expressão basal dos genes relacionados a imunomodulação entre as CTMs derivadas de diferentes doadores. Estudos anteriores já demonstraram que essa diferença pode decorrer devido a vários fatores, entre eles, a idade, sexo e as condições de isolamento das células (Chamberlain et al., 2007). Por exemplo, as CTMs de doadores do sexo feminino tendem a apresentar um potencial de imunossupressão mais potente, quando analisadas em condições de cultivo *in vitro* (Mckinnirey et al., 2021).

Após isolar, caracterizar e estabelecer a assinatura imunológica dos doadores de CTMs, foi feito um ensaio de infecção das células dos três doadores de CTMs com a cepa colombiana do *Trypanosoma cruzi*. A cepa colombiana é caracterizada pela lenta progressão da doença parasitária, atingindo altos níveis de formas parasitárias disseminadas desde o estágio inicial da infecção, e baixa mortalidade (Camandaroba et al., 2001). A infecção foi realizada conforme descrito no item 5.5. A infecção por *T. cruzi* induz alterações bioquímicas e morfológicas nas células do hospedeiro e do patógeno por uma série de processos de sinalização celular que levam ao recrutamento de lisossomos para a membrana plasmática das células, resultando na internalização do *T. cruzi* na célula alvo (Gachet-Castro et al., 2021). Este trabalho teve como objetivo avaliar as

consequências da infecção por *T. cruzi* em CTMs humanas derivadas do tecido adiposo. A infecção das células foi bem-sucedida nas diferentes proporções CTM: parasitos testados, porém foi observada toxicidade celular a partir do 5.º dia após infecção no grupo com infecção de 1:5 e, a partir do 10.º dia no grupo com infecção 1:1. Foi preparado um meio condicionado das CTMs dos três doadores infectados por *T. cruzi* e não infectados a fim de realizar ensaios de proliferação de células T em PBMCs e realizar a dosagem de NO em macrófagos tratados com os sobrenadantes.

Para tanto, foi primeiramente realizada a demonstração da infecção por meio de visualização microscópica de ninhos de amastigotas intracelulares e também a detecção de material genético do parasita nas culturas de CTMs infectadas, por meio de PCR em tempo real, com o objetivo de quantificar a carga parasitária. Esta avaliação foi realizada com a detecção e quantificação relativa do gene Tc40 de *T. cruzi*. O clone de DNA recombinante Tc40 codifica um antígeno imunodominante que está presente em todas as fases do desenvolvimento do *T. cruzi*, e codifica um polipeptídeo de 100 kDa altamente conservado nas cepas G e colombiana do *T. cruzi*. Este antígeno tende a reagir especificamente com anticorpos que estão presentes em todas as fases da doença de Chagas, portanto foi considerado um gene adequado para ser utilizado para a detecção e quantificação de *T. cruzi* nas amostras de CTMs humanas infectadas (Lesénéchal *et al.*, 1997). Nesta avaliação, foi possível estimar a carga parasitária nas culturas de CTMs. Novamente, observou-se variação entre as CTMs obtidas de diferentes doadores, que apresentaram carga parasitária variável. As amostras de CTM 1 e a CTM 2 apresentaram o equivalente a 14 e 1 parasitos por CTM. Já a amostra de CTM 3 apresentou nível indetectável do gene Tc40.

Com o objetivo de verificar se a infecção das CTMs dos três doadores por *T. cruzi* comprometeria sua capacidade de

imunomodulação parácrina, foram feitos dois ensaios. O primeiro deles foi realizado com o intuito de se avaliar o nível de ativação de células U937 diferenciadas em macrófagos por LPS, de acordo com a produção de NO. Neste trabalho, macrófagos derivados da linhagem U937 foram tratados com sobrenadantes de CTMs infectadas ou não por *T. cruzi*, e estimulados por LPS, com o intuito de avaliar como esses tratamentos iriam interferir no processo de ativação e polarização macrofágica. Foi feita a dosagem de NO de todos os grupos experimentais. Na ausência de estimulação com LPS, os grupos de macrófagos que foram tratados com sobrenadante de CTMs infectadas e não infectadas por *T. cruzi*, apresentaram secreção de NO em níveis baixos, quando comparado às amostras estimuladas por LPS.

Quando se observa os níveis de secreção de NO, no grupo que foi tratado com o sobrenadante de CTMs infectadas, percebe-se diferenças entre as CTMs 1 e 3. Nos grupos não estimulados pelo LPS, os macrófagos tratados com o sobrenadante das CTMs 1 e 3 apresentaram o menor nível de secreção de NO. O grupo tratado com o sobrenadante da CTM 2 foi o que apresentou maior secreção de NO na ausência do estímulo por LPS. Quando esses mesmos grupos foram estimulados por LPS, a liberação de NO foi maior. O grupo tratado com o sobrenadante da CTM 2 foi o que apresentou o maior nível de liberação de NO.

Os grupos tratados com os sobrenadantes das CTM 1 e 3 apresentaram níveis de liberação de NO, semelhantes. Nos grupos experimentais que foram tratados com o sobrenadante de CTMs infectadas pelo *T. cruzi* e estimulados com LPS, foi possível perceber um comprometimento da capacidade de supressão da liberação de NO nos sobrenadantes das CTM 2 e 3 infectadas, em comparação aos sobrenadantes destas células não infectadas. No grupo tratado com o sobrenadante da CTM 1 infectada e não

infectada, teve um nível de liberação de NO semelhante, apesar de demonstrar um leve aumento da capacidade de supressão da liberação de NO pelo sobrenadante das CTM 1 infectadas por *T. cruzi*. Foi possível observar, portanto, diferenças individuais entre as replicatas biológicas, mas mesmo assim, é possível perceber que infecção por *T. cruzi* é capaz de alterar a capacidade de secreção de óxido nítrico em algumas amostras biológicas de CTMs, fazendo com que as CTMs modulem de forma menos eficiente a função macrófaga, mesmo mediante ao estímulo do LPS.

Para ampliar as análises desses grupos experimentais, foi feito PCR em tempo real com o objetivo de avaliar a expressão gênica de citocinas pró e anti-inflamatórias expressas em macrófagos e indicativas de polarização M1 e M2. É importante salientar que a estimulação de macrófagos por LPS induz uma ativação e polarização M1, caracterizada pelo fenótipo pró-inflamatório com habilidades de matar patógenos (Orecchioni et al., 2019). Para a avaliação da expressão gênica, os genes *IL-1 β* e *TNF- α* , e *IL-10* foram avaliados, e o gene *GAPDH* foi usado como controle. A literatura relata que um dos fatores que pode inibir a expressão de *TNF- α* , é a *IL-10*, que será produzida pelos macrófagos durante a ativação por LPS (Baer et al., 1998; de Waal Malefyt et al., 1991).

Quando os macrófagos são tratados com sobrenadante de CTMs não infectadas, a expressão de todos os genes apresenta níveis baixos, no entanto, quando o mesmo grupo é estimulado por LPS, percebe-se um leve aumento na expressão. Agora quando os macrófagos são tratados com o sobrenadante de CTMs infectadas pelo *T. cruzi*, a expressão de *TNF- α* é maior entre os doadores 1 e 2 de CTMs, e quando esses mesmos grupos são estimulados por LPS, é possível perceber que o doador 3 de CTM, expressa mais *IL-10*. De acordo com a literatura, a polarização M1 é caracterizada pela produção de níveis altos de citocinas pró-inflamatórias, tais como a *IL-1 β* e o *TNF- α* (Davis et al., 2013). Um estado

predominantemente pró-inflamatório é apresentado pela expressão de *TNF- α* . O estado de cicatrização tecidual é caracterizado pela expressão de *IL-10* após estimulação com LPS. Os macrófagos mudam seu estado de polarização com base em diversos estímulos a que são expostos (Fleetwood et al., 2007).

Ainda com o objetivo de verificar se a infecção das CTMs por *T. cruzi* comprometeria sua capacidade de imunomodulação parácrina, foi feito um ensaio utilizando PBMCs, que foram isolados de três doadores. Essas PBMCs foram tratadas com o sobrenadante de CTMs infectadas e não infectadas por *T. cruzi* e estimulados por PHA. Após isolar as PBMCs de três doadores distintos e marcar essas células com CFSE, um dos grupos experimentais foi tratado com o mitógeno PHA. Os mitógenos, também são chamados ativadores de linfócitos policlonais, e são capazes de induzir a proliferação através do processo de mitose (Wimer et al., 1996).

Na análise por citometria de fluxo foi possível perceber que todos os grupos que foram tratados com sobrenadante de CTMs e não estimulados por PHA, independentemente de terem sido infectadas ou não pelo *T. cruzi*, apresentaram picos que não indicavam proliferação de linfócitos T, no entanto, quando esse grupo foi comparado ao controle, todos teriam um nível de proliferação maior que 90%. Desta forma, os grupos de PBMCs, tratados com sobrenadante e CTMs infectados e não infectados que não sofreram estímulo pelo PHA, foram utilizados como controle para prosseguir com a análise do grupo com PHA. Nos grupos que foram estimulados por PHA, percebeu-se que o tratamento com o sobrenadante das CTMs que foram infectadas pelo *T. cruzi*, são capazes de aumentar a proliferação de PBMC. No entanto, houve diferença nos níveis de proliferação entre os doadores de CTMs. A expressão gênica dos grupos de PBMCs tratados com sobrenadantes de CTMs infectados pelo *T. cruzi* apresentou níveis

baixos de expressão de todos os genes, mesmo na presença do estímulo por PHA.

CONCLUSÃO

Tomados juntos, os resultados deste trabalho demonstram a infecção de CTMs por *T. cruzi* e as alterações funcionais desencadeadas pelo parasitismo. Considerando as replicatas biológicas das CTM e PBMCs utilizadas no trabalho, os dados obtidos refletem a diversidade entre as amostras, já descritas na literatura. Esta diversidade é compatível com os diferentes perfis inflamatórios de cada doador de CTM e PBMC, além da diversidade da história clínica de pacientes com doença de Chagas.

Os achados do presente trabalho permitem sugerir que as CTMs do tecido adiposo de humanos saudáveis podem ser infectadas pelo parasito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. A infecção atinge níveis altos de toxicidade celular a partir do 14.^o dia de infecção, fazendo com que as CTMs percam sua viabilidade. Como o presente trabalho foi realizado *in vitro*, futuras avaliações *in vivo* da infecção de CTMs endógenas por *T. cruzi* é relevante. Os dados obtidos demonstram também existência de diferenças individuais no imunofenótipo, taxa proliferativa, e na expressão de genes relacionados à capacidade imunodulatória entre as CTMs derivadas de diferentes doadores. Essa diversidade permanece em evidência em todos os ensaios realizados, fazendo com que seja necessário o aumento do número de doadores e uma melhor caracterização de suas particularidades biológicas, como idade, sexo, obesidade, comorbidades, etc, para que seja possível compreender o impacto da infecção de *T. cruzi* sobre estas células. Considerando que o secretoma das CTM é composto por uma diversidade de moléculas e vesículas extracelulares, a investigação do impacto da infecção por *T. cruzi* sobre a composição deste secretoma também é uma perspectiva deste estudo. Em última instância, será relevante compreender se as alterações observadas em populações de CTMs infectadas por *T. cruzi* impactam o prognóstico da infecção.

REFERÊNCIAS

- Abdi, R., Fiorina, P., Adra, C. N., Atkinson, M., & Sayegh, M. H. (2008). Immunomodulation by mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes. *Diabetes*, 57(7), 1759–1767. <https://doi.org/10.2337/db08-0180>
- Abuhab, A., Trindade, E., Aulicino, G. B., Fujii, S., Bocchi, E. A., & Bacal, F. (2013). Chagas' cardiomyopathy: the economic burden of an expensive and neglected disease. *International journal of cardiology*, 168(3), 2375–2380. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.01.262>
- Aboalola, D., & Han, V. (2017). Different Effects of Insulin-Like Growth Factor-1 and Insulin-Like Growth Factor-2 on Myogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem cells international*, 2017, 8286248. <https://doi.org/10.1155/2017/8286248>
- Abomaray, F. M., Al Jumah, M. A., Alsaad, K. O., Jawdat, D., Al Khaldi, A., AlAskar, A. S., Al Harthy, S., Al Subayyil, A. M., Khatlani, T., Alawad, A. O., Alkushi, A., Kalionis, B., & Abumaree, M. H. (2016). Phenotypic and Functional Characterization of Mesenchymal Stem/Multipotent Stromal Cells from Decidua Basalis of Human Term Placenta. *Stem cells international*, 2016, 5184601. <https://doi.org/10.1155/2016/5184601>
- Acevedo, G. R., Girard, M. C., & Gómez, K. A. (2018). The Unsolved Jigsaw Puzzle of the Immune Response in Chagas Disease. *Frontiers in immunology*, 9, 1929. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01929>
- Acosta JR, Tavira B, Douagi I, Kulyté A, Arner P, Rydén M, Laurencikiene J. Human-Specific Function of IL-10 in Adipose Tissue Linked to Insulin Resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019 Oct 1;104(10):4552-4562. doi: 10.1210/jc.2019-00341.

- Afizah, H., Yang, Z., Hui, J. H., Ouyang, H. W., & Lee, E. H. (2007). A comparison between the chondrogenic potential of human bone marrow stem cells (BMSCs) and adipose-derived stem cells (ADSCs) taken from the same donors. *Tissue engineering*, 13(4), 659–666.
<https://doi.org/10.1089/ten.2006.0118>
- Anderson, P., Carrillo-Gálvez, A. B., García-Pérez, A., Cobo, M., & Martín, F. (2013). CD105 (endoglin)-negative murine mesenchymal stromal cells define a new multipotent subpopulation with distinct differentiation and immunomodulatory capacities. *PLoS one*, 8(10), e76979.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076979>
- Alexandre-Ramos DS, Silva-Carvalho AÉ, Lacerda MG, Serejo TRT, Franco OL, Pereira RW, Carvalho JL, Neves FAR, Saldanha-Araujo F. LL-37 treatment on human peripheral blood mononuclear cells modulates immune response and promotes regulatory T-cells generation. *Biomed Pharmacother*. 2018 Dec; 108:1584-1590. doi: 10.1016/j.biopha.2018.10.014.
- Al-Ghadban, S., & Bunnell, B. A. (2020). Adipose Tissue-Derived Stem Cells: Immunomodulatory Effects and Therapeutic Potential. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 35(2), 125–133.
<https://doi.org/10.1152/physiol.00021.2019>
- Aliberti, J. C., Cardoso, M. A., Martins, G. A., Gazzinelli, R. T., Vieira, L. Q., & Silva, J. S. (1996). Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infection and immunity*, 64(6), 1961–1967.
<https://doi.org/10.1128/iai.64.6.1961-1967.1996>
- Andrade, J. P., Marin Neto, J. A., Paola, A. A., Vilas-Boas, F., Oliveira, G. M., Bacal, F., Bocchi, E. A., Almeida, D. R., Fragata Filho, A. A., Moreira, M., Xavier, S. S., Oliveira Junior, W. A., & Dias, J. C. (2011). Latin American Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas' heart disease: executive summary. *Arquivos brasileiros de cardiologia*, 96(6), 434–442.
<https://doi.org/10.1590/s0066-782x2011000600002>
- Andrade, S. G., & Magalhães, J. B. (1997). Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 30(1), 27–35.
<https://doi.org/10.1590/s0037-86821997000100006>
- Andrade V, Andrade SG, Barrai Netto M, Pontes AL, Castro R. Avaliação do comportamento de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi* na infecção de seis linhagens isogênicas de camundongos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1985 Jul-Set.18(3): 143-154.
- Andrade V, Brodskyn C, Andrade SG. Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 77:796-799, 1983.
- Andrade, Z. A., & Silva, H. R. (1995). Parasitism of adipocytes by *Trypanosoma cruzi*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 90(4), 521–522.
<https://doi.org/10.1590/s0074-02761995000400018>
- Ahmed, T. A., & El-Badri, N. (2018). Pericytes: The Role of Multipotent Stem Cells in Vascular Maintenance and Regenerative Medicine. *Advances in experimental medicine and biology*, 1079, 69–86.
https://doi.org/10.1007/5584_2017_138
- Andrzejewska A, Lukomska B, Janowski M. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost. *Stem Cells Journals*. 2019 Apr. doi.org/10.1002/stem.3016.
- Aggarwal, S., & Pittenger, M. F. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*,

- 105(4), 1815–1822.
<https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1559>
- Aqmasheh, S., Shamsasanjan, K., Akbarzadehlaleh, P., Pashoutan Sarvar, D., & Timari, H. (2017). Effects of Mesenchymal Stem Cell Derivatives on Hematopoiesis and Hematopoietic Stem Cells. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 7(2), 165–177. <https://doi.org/10.15171/apb.2017.021>
- Bartholomew, A., Sturgeon, C., Siatskas, M., Ferrer, K., McIntosh, K., Patil, S., Hardy, W., Devine, S., Ucker, D., Deans, R., Moseley, A., & Hoffman, R. (2002). Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Experimental hematology*, 30(1), 42–48. [https://doi.org/10.1016/s0301-472x\(01\)00769-x](https://doi.org/10.1016/s0301-472x(01)00769-x)
- Baer M, Dillner A, Schwartz RC, Sedon C, Nedospasov S, Johnson PF. Tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages is attenuated by an autocrine factor that preferentially induces NF-kappaB p50. *Mol Cell Biol*. 1998 Oct;18(10):5678-89. doi: 10.1128/MCB.18.10.5678.
- Baer, P. C., Koch, B., Hickmann, E., Schubert, R., Cinatl, J., Jr, Hauser, I. A., & Geiger, H. (2019). Isolation, Characterization, Differentiation and Immunomodulatory Capacity of Mesenchymal Stromal/Stem Cells from Human Perirenal Adipose Tissue. *Cells*, 8(11), 0. <https://doi.org/10.3390/cells8111346>
- Boháčová, P., & Holáň, V. (2018). Mesenchymal stem cells and type 1 diabetes treatment. *Mezenchymální kmenové buňky a léčba diabetu 1. typu. Vnitřní lékařství*, 64(7-8), 725–728.
- Bai, L., Lennon, D. P., Caplan, A. I., DeChant, A., Hecker, J., Kranso, J., Zaremba, A., & Miller, R. H. (2012). Hepatocyte growth factor mediates mesenchymal stem cell-induced recovery in multiple sclerosis models. *Nature neuroscience*, 15(6), 862–870. <https://doi.org/10.1038/nn.3109>
- Baraniak, P. R., & McDevitt, T. C. (2010). Stem cell paracrine actions and tissue regeneration. *Regenerative medicine*, 5(1), 121–143. <https://doi.org/10.2217/rme.09.74>
- Bern, C., Martin, D. L., & Gilman, R. H. (2011). Acute and congenital Chagas disease. *Advances in parasitology*, 75, 19–47. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385863-4.00002-2>
- Bern, C., Messenger, L. A., Whitman, J. D., & Maguire, J. H. (2019). Chagas Disease in the United States: a Public Health Approach. *Clinical microbiology reviews*, 33(1), e00023-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00023-19>
- Bernardo, M. E., & Fibbe, W. E. (2013). Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell stem cell*, 13(4), 392–402. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.09.006>
- Billiau, A., & Matthys, P. (2009). Interferon-gamma: a historical perspective. *Cytokine & growth factor reviews*, 20(2), 97–113. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.02.004>
- Bonney, K. M., Luthringer, D. J., Kim, S. A., Garg, N. J., & Engman, D. M. (2019). Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. *Annual review of pathology*, 14, 421–447. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020117-043711>
- Bouffi, C., Bony, C., Courties, G., Jorgensen, C., & Noël, D. (2010). IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. *PLoS one*, 5(12), e14247. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014247>
- Boscardin, S. B., Torrecilhas, A. C., Manarin, R., Revelli, S., Rey, E. G., Tonelli, R. R., & Silber, A. M. (2010). Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. *Journal of cellular and molecular medicine*, 14(6B), 1373–

1384. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01007.x>
- Bozzi A, Sayed N, Matsa E, Sass G, Neofytou E, V.Clemons K, Correa-Oliveira R, A. Stevens D, and C. Wu J. Using Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes as a Model to Study *Trypanosoma cruzi* Infection. *Stem Cell Reports*. 2019;12. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.04.017>.
- Brenière, S. F., Waleckx, E., & Barnabé, C. (2016). Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(8), e0004792. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004792>
- Bruder, S. P., Jaiswal, N., & Haynesworth, S. E. (1997). Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *Journal of cellular biochemistry*, 64(2), 278–294. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4644\(199702\)64:2<278::aid-jcb11>3.0.co;2-f](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4644(199702)64:2<278::aid-jcb11>3.0.co;2-f)
- Cabral-Piccin, M. P., Guillermo, L. V., Vellozo, N. S., Filardy, A. A., Pereira-Marques, S. T., Rigoni, T. S., Pereira-Manfro, W. F., DosReis, G. A., & Lopes, M. F. (2016). Apoptotic CD8 T-lymphocytes disable macrophage-mediated immunity to *Trypanosoma cruzi* infection. *Cell death & disease*, 7(5), e2232. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.135>
- Camandaroba, E. L., Campos, R. F., Magalhães, J. B., & Andrade, S. G. (2001). Clonal structure of *Trypanosoma cruzi* Colombian strain (biotype Type III): biological, isoenzymic and histopathological analysis of seven isolated clones. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 34(2), 151–157. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822001000200001>
- Camandaroba, Edson Luiz Paes et al. Clonal structure of *Trypanosoma cruzi* Colombian strain (biotype Type III): biological, isoenzymic and histopathological analysis of seven isolated clones. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* [online]. 2001, v. 34, n. 2, pp. 151-157. doi.org/10.1590/S0037-86822001000200001.
- Camandaroba, E., Thé, T. S., Pessina, D. H., & Andrade, S. G. (2006). *Trypanosoma cruzi*: clones isolated from the Colombian strain, reproduce the parental strain characteristics, with ubiquitous histotopism. *International journal of experimental pathology*, 87(3), 209–217. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2006.00476.x>
- Campioni, D., Rizzo, R., Stignani, M., Melchiorri, L., Ferrari, L., Moretti, S., Russo, A., Bagnara, G. P., Bonsi, L., Alviano, F., Lanzoni, G., Cuneo, A., Baricordi, O. R., & Lanza, F. (2009). A decreased positivity for CD90 on human mesenchymal stromal cells (MSCs) is associated with a loss of immunosuppressive activity by MSCs. *Cytometry. Part B, Clinical cytometry*, 76(3), 225–230. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20461>
- Capilla-González, V., López-Beas, J., Escacena, N., Aguilera, Y., de la Cuesta, A., Ruiz-Salmerón, R., Martín, F., Hmadcha, A., & Soria, B. (2018). PDGF Restores the Defective Phenotype of Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells from Diabetic Patients. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 26(11), 2696–2709. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.08.011>
- Caradonna, K. L., & Burleigh, B. A. (2011). Mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Advances in parasitology*, 76, 33–61. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385895-5.00002-5>
- Castro, F., Cardoso, A. P., Gonçalves, R. M., Serre, K., & Oliveira, M. J. (2018). Interferon-

- Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. *Frontiers in immunology*, 9, 847. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00847>
- Cerbán, F. M., Stempin, C. C., Volpini, X., Carrera Silva, E. A., Gea, S., & Motran, C. C. (2020). Signaling pathways that regulate *Trypanosoma cruzi* infection and immune response. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1866(5), 165707. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165707>
- Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., & Middleton, J. (2007). Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 25(11), 2739–2749. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0197>
- Choe, S. S., Huh, J. Y., Hwang, I. J., Kim, J. I., & Kim, J. B. (2016). Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Frontiers in endocrinology*, 7, 30. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00030>
- Claudio-da-Silva César, Baptista Leandra Santos, Carias Rosana Bizon Vieira, Menezes Neto Hélio da Cunha, Borojevic Radovan. Cultura autóloga de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo para o tratamento de ritides faciais. *Rev. Col. Bras. Cir.* 2009 Aug; 36(4): 288-291. doi.org/10.1590/S0100-69912009000400003.
- Combs, T. P., Nagajyothi, Mukherjee, S., de Almeida, C. J., Jelicks, L. A., Schubert, W., Lin, Y., Jayabalan, D. S., Zhao, D., Braunstein, V. L., Landskroner-Eiger, S., Cordero, A., Factor, S. M., Weiss, L. M., Lisanti, M. P., Tanowitz, H. B., & Scherer, P. E. (2005). The adipocyte as an important target cell for *Trypanosoma cruzi* infection. *The Journal of biological chemistry*, 280(25), 24085–24094. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412802200>
- Contreras, R. A., Figueroa, F. E., Djouad, F., & Luz-Crawford, P. (2016). Mesenchymal Stem Cells Regulate the Innate and Adaptive Immune Responses Dampening Arthritis Progression. *Stem cells international*, 2016, 3162743. <https://doi.org/10.1155/2016/3162743>
- Corselli, M., Chin, C. J., Parekh, C., Sahaghian, A., Wang, W., Ge, S., Evseenko, D., Wang, X., Montelatici, E., Lazzari, L., Crooks, G. M., & Péault, B. (2013). Perivascular support of human hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood*, 121(15), 2891–2901. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-08-451864>
- Costa, R. P., Gollob, K. J., Fonseca, L. L., Rocha, M. O., Chaves, A. C., Medrano-Mercado, N., Araújo-Jorge, T. C., Antas, P. R., Colley, D. G., Correa-Oliveira, R., Gazzinelli, G., Carvalho-Parra, J., & Dutra, W. O. (2000). T-cell repertoire analysis in acute and chronic human Chagas' disease: differential frequencies of Vbeta5 expressing T cells. *Scandinavian journal of immunology*, 51(5), 511–519. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.2000.00706.x>
- Coura, J. R., & Borges-Pereira, J. (2011). Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(6), 641–645. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000600001>
- Courtney, J. M., & Sutherland, B. A. (2020). Harnessing the stem cell properties of pericytes to repair the brain. *Neural regeneration research*, 15(6), 1021–1022. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.270301>
- Covarrubias Charles, Ferreira Daniele & Yoshida Nobuko. Interaction with host factors exacerbates *Trypanosoma cruzi* cell invasion capacity upon oral infection. *International journal for parasitology*. (2008). 37. 1609-16. Doi: 10.1016/j.ijpara.2007.05.013.

- Dalal, J., Gandy, K., & Domen, J. (2012). Role of mesenchymal stem cell therapy in Crohn's disease. *Pediatric research*, 71(4 Pt 2), 445–451. <https://doi.org/10.1038/pr.2011.56>
- Dantas R. O. (2021). Management of Esophageal Dysphagia in Chagas Disease. *Dysphagia*, 36(3), 517–522. <https://doi.org/10.1007/s00455-021-10297-1>
- Danisovic, L., Varga, I., Polák, S., Ulicná, M., Hlavacková, L., Böhmer, D., & Vojtassák, J. (2009). Comparison of in vitro chondrogenic potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *General physiology and biophysics*, 28(1), 56–62.
- Davis MJ, Tsang TM, Qiu Y, Dayrit JK, Freij JB, Huffnagle GB, Olszewski MA. Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. *mBio*. 2013 Jun 18;4(3):e00264-13. doi: 10.1128/mBio.00264-13.
- de Carvalho JL, Zonari A, de Paula AC, Martins TM, Gomes DA, Goes AM. Production of Human Endothelial Cells Free from Soluble Xenogeneic Antigens for Bioartificial Small Diameter Vascular Graft Endothelialization. *Biomed Res Int*. 2015;2015:652474. doi: 10.1155/2015/652474.
- de Kretser D. (2007). Totipotent, pluripotent or unipotent stem cells: a complex regulatory enigma and fascinating biology. *Journal of law and medicine*, 15(2), 212–218.
- de Meis, J., Barreto de Albuquerque, J., Silva Dos Santos, D., Farias-de-Oliveira, D. A., Berbert, L. R., Cotta-de-Almeida, V., & Savino, W. (2013). *Trypanosoma cruzi* Entrance through Systemic or Mucosal Infection Sites Differentially Modulates Regional Immune Response Following Acute Infection in Mice. *Frontiers in immunology*, 4, 216. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00216>
- de Pablos Torró LM, Renata Moreira L, Osuna A. Extracellular Vesicles in Chagas Disease: A New Passenger for an Old Disease. *Front Microbiol*. 2018 Jun 1;9:1190. doi: 10.3389/fmicb.2018.01190.
- de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med*. 1991 Nov 1;174(5):1209-20. doi: 10.1084/jem.174.5.1209.
- Dennis, J. E., Carbillet, J. P., Caplan, A. I., & Charbord, P. (2002). The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. *Cells, tissues, organs*, 170(2-3), 73–82. <https://doi.org/10.1159/000046182>
- Deng A, Zhang H, Hu M, Liu S, Gao Q, Wang Y, Guo C. Knockdown of Indian hedgehog protein induces an inhibition of cell growth and differentiation in osteoblast MC3T3-E1 cells. *Mol Med Rep*. 2017 Dec;16(6):7987-7992. doi: 10.3892/mmr.2017.7669.
- Dias JCP, Schofield CJ. The evolution of Chagas disease (American Trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz [Internet]*. 1999 Sep; 94(Suppl 1): 103-121. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761999000700011>.
- Dias João Carlos Pinto, Ramos Jr. Alberto Novaes, Gontijo Eliane Dias, Luquetti Alejandro, Shikanai-Yasuda Maria Aparecida, Coura José Rodrigues et al . II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. *Epidemiol. Serv. Saúde*. 2016 Jun; 25(spe): 7-86. <http://dx.doi.org/10.5123/s1679-49742016000500002>.
- Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*. 2011;20(1):5-14. doi: 10.3727/096368910X.
- do Carmo Neto, J. R., da Costa, A., Braga, Y., Lucio, F. H., Dos Santos Martins, A., Dos Reis, M. A., de Oliveira, F. A., Celes, M., da Silva, M. V., Oliveira, M., & Machado, J. R. (2022). The Colombian Strain of

- Trypanosoma cruzi* Induces a Proinflammatory Profile, Neuronal Death, and Collagen Deposition in the Intestine of C57BL/6 Mice Both during the Acute and Early Chronic Phase. *Mediators of Inflammation*, 2022, 7641357. <https://doi.org/10.1155/2022/7641357>
- Dos Reis, G. A., Ribeiro-Gomes, F. L., Guillermo, L. V., & Lopes, M. F. (2007). Cross-talk between apoptosis and cytokines in the regulation of parasitic infection. *Cytokine & growth factor reviews*, 18(1-2), 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2007.01.009>
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7. doi: 10.1080/14653240600855905.
- Dumolin, Peter C.; Burleigh, Barbara A. Stress-induced proliferation and cell cycle plasticity of intracellular *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *mBio*, [S. l.], v. 9, n. 4, 2018. Doi: 10.1128/mBio.00673-18.
- Dutra, W. O., & Gollob, K. J. (2008). Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Current opinion in infectious diseases*, 21(3), 287–292. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e3282f88b80>
- El Gharib, A., & Dantas, R. O. (2021). Cross-Sectional Study of Swallowing Phases in Cases of Megaesophagus Caused by Chagas Disease. *Gastroenterology research*, 14(5), 290–295. <https://doi.org/10.14740/gr1458>
- Federici EE, Abelman WB, Neva FA. Chronic and progressive myocarditis and myositis in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi* The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 13:272-280, 1964.
- Ferreira, A. V., Segatto, M., Menezes, Z., Macedo, A. M., Gelape, C., de Oliveira Andrade, L., Nagajyothi, F., Scherer, P. E., Teixeira, M. M., & Tanowitz, H. B. (2011). Evidence for *Trypanosoma cruzi* in adipose tissue in human chronic Chagas disease. *Microbes and infection*, 13(12-13), 1002–1005. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.06.002>
- Fleetwood AJ, Lawrence T, Hamilton JA, Cook AD. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. *J Immunol*. (2007) 178:5245–52. doi: 10.4049/jimmunol.178.8.5245.
- François, M., Romieu-Mourez, R., Li, M., & Galipeau, J. (2012). Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 20(1), 187–195. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.189>
- Franzè, E., Laudisi, F., Di Grazia, A. *et al.* Macrophages produce and functionally respond to interleukin-34 in colon cancer. *Cell Death Discov*. 6, 117 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41420-020-00350-7>.
- Fink, Trine, and Vladimir Zachar. “Adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells.” *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) vol. 698 (2011): 243-51. doi:10.1007/978-1-60761-999-4_19
- Fijany A, Sayadi LR, Khoshab N, Banyard DA, Shaterian A, Alexander M, Lakey JRT, Paydar KZ, Evans GRD, Widgerow AD. Mesenchymal stem cell dysfunction in diabetes. *Mol Biol Rep*. 2019 Feb;46(1):1459-1475. doi: 10.1007/s11033-018-4516-x.

- Fujimura, J., Ogawa, R., Mizuno, H., Fukunaga, Y., & Suzuki, H. (2005). Neural differentiation of adipose-derived stem cells isolated from GFP transgenic mice. *Biochemical and biophysical research communications*, 333(1), 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.05.096>
- Gachet-Castro, C., Freitas-Castro, F., Gonz ales-Córdova, R. A., da Fonseca, C. K., Gomes, M. D., Ishikawa-Ankerhold, H. C., & Baqui, M. (2021). Modulation of the Host Nuclear Compartment by *Trypanosoma cruzi* Uncovers Effects on Host Transcription and Splicing Machinery. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 718028. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.718028>
- G, Yu F, Lei T, Gao H, Li P, Sun Y, Huang H, Mu Q. Bone marrow mesenchymal stem cell therapy in ischemic stroke: mechanisms of action and treatment optimization strategies. *Neural Regen Res*. 2016 Jun;11(6):1015-24. doi: 10.4103/1673-5374.184506.
- Gao F, Chiu SM, Motan DA, Zhang Z, Chen L, Ji HL, Tse HF, Fu QL, Lian Q. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death Dis*. 2016 Jan 21;7(1):e2062. doi: 10.1038/cddis.2015.327.
- Gao ZW, Dong K, Zhang HZ. The roles of CD73 in cancer. *Biomed Res Int*. 2014;2014:460654. doi: 10.1155/2014/460654.
- Ghannam, S., Bouffi, C., Djouad, F., Jorgensen, C., & No el, D. (2010). Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem cell research & therapy*, 1(1), 2. <https://doi.org/10.1186/scrt2>
- Gibaldi, D., Vilar-Pereira, G., Pereira, I. R., Silva, A. A., Barrios, L. C., Ramos, I. P., Mata Dos Santos, H. A., Gazzinelli, R., & Lannes-Vieira, J. (2020). CCL3/Macrophage Inflammatory Protein-1  Is Dually Involved in Parasite Persistence and Induction of a TNF- and IFN -Enriched Inflammatory Milieu in *Trypanosoma cruzi*-Induced Chronic Cardiomyopathy. *Frontiers in immunology*, 11, 306. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00306>
- Glass, C. K., & Natoli, G. (2016). Molecular control of activation and priming in macrophages. *Nature immunology*, 17(1), 26–33. <https://doi.org/10.1038/ni.3306>
- Goldenberg RC, Jelicks LA, Fortes FS, Weiss LM, Rocha LL, Zhao D, Carvalho AC, Spray DC, Tanowitz HB. Bone marrow cell therapy ameliorates and reverses chagasic cardiomyopathy in a mouse model. *J Infect Dis*. 2008 Feb 15;197(4):544-7. doi: 10.1086/526793.
- González MA, Gonzalez-Rey E, Rico L, Büscher D, Delgado M. Adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses. *Gastroenterology* 136: 978–989, 2009.
- González, M. A., Gonzalez-Rey, E., Rico, L., Büscher, D., & Delgado, M. (2009). Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis and rheumatism*, 60(4), 1006–1019. <https://doi.org/10.1002/art.24405>
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982 Oct;126(1):131-8. doi: 10.1016/0003-2697(82)90118-x. PMID: 7181105.
- Goossens A, Geremia R, Bauw G, Van Montagu M, Angenon G. Isolation and characterisation of arcelin-5 proteins and cDNAs. *Eur J Biochem*. 1994;225(3):787-795. doi:10.1111/j.1432-1033.1994.0787b.x
- Guarita-Souza LC, Carvalho KA, Woitowicz V, Rebelatto C, Senegaglia A, Hansen P, Miyague N, Francisco JC, Olandoski M, Faria-Neto JR, Brofman P. Simultaneous autologous transplantation of cocultured mesenchymal stem cells and skeletal

- myoblasts improves ventricular function in a murine model of Chagas disease. *Circulation*. 2006 Jul 4;114(1 Suppl):120-4. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.000646.
- György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, László V, Pállinger E, Pap E, Kittel A, Nagy G, Falus A, Buzás El. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci*. 2011 Aug;68(16):2667-88. doi: 10.1007/s00018-011-0689-3.
- Hamelryck, T. W., Dao-Thi, M. H., Poortmans, F., Chrispeels, M. J., Wyns, L., & Loris, R. (1996). The crystallographic structure of phytohemagglutinin-L. *The Journal of biological chemistry*, 271(34), 20479–20485. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.34.20479>
- Hamid, A. A. et al. Characterization of human adipose-derived stem cells and expression of chondrogenic genes during induction of cartilage differentiation. *CLINICS*, v. 67, n. 2, p. 99–106, 2012.
- Hanna, H., Mir, L. M., & Andre, F. M. (2018). In vitro osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells generates cell layers with distinct properties. *Stem cell research & therapy*, 9(1), 203. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0942-x>
- Hearing SD, Norman M, Probert CS, Haslam N, Dayan CM. Predicting therapeutic outcome in severe ulcerative colitis by measuring in vitro steroid sensitivity of proliferating peripheral blood lymphocytes. *Gut*. 1999 Sep;45(3):382-8. doi: 10.1136/gut.45.3.382.
- He, J., Huang, Y., Liu, J., Lan, Z., Tang, X., & Hu, Z. (2021). The Efficacy of Mesenchymal Stem Cell Therapies in Rodent Models of Multiple Sclerosis: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in immunology*, 12, 711362. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.711362>
- Hermansyah D, Putra A, Muhar AM, Retnaningsih, Wirastuti K, Dirja BT. Mesenchymal Stem Cells Suppress TGF- β Release to Decrease α -SMA Expression in Ameliorating CCl4-Induced Liver Fibrosis. *Med Arch*. 2021 Feb;75(1):16-22. doi: 10.5455/medarh.2021.75.16-22.
- Hmadcha, A., Martin-Montalvo, A., Gauthier, B. R., Soria, B., & Capilla-Gonzalez, V. (2020). Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells for Cancer Therapy. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 43. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00043>
- Hoogduijn, M. J., & Lombardo, E. (2019). Mesenchymal Stromal Cells Anno 2019: Dawn of the Therapeutic Era? Concise Review. *Stem cells translational medicine*, 8(11), 1126–1134. <https://doi.org/10.1002/sctm.19-0073>
- Hsu, P. J., Liu, K. J., Chao, Y. Y., Sytwu, H. K., & Yen, B. L. (2015). Assessment of the Immunomodulatory Properties of Human Mesenchymal Stem Cells (MSCs). *Journal of visualized experiments : JoVE*, (106), e53265. <https://doi.org/10.3791/53265>
- Huang, F., Thokerunga, E., He, F. et al. Research progress of the application of mesenchymal stem cells in chronic inflammatory systemic diseases. *Stem Cell Res Ther* 13, 1 (2022). <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02613-1>
- Irion CI, Paredes BD, Brasil GV, Cunha STD, Paula LF, Carvalho AR, Carvalho ACC, Carvalho AB, Goldenberg RCDS. Bone marrow cell migration to the heart in a chimeric mouse model of acute chagasic disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2017 Aug;112(8):551-560. doi: 10.1590/0074-02760160526.
- Jaguin, M., Houlbert, N., Fardel, O., & Lecreur, V. (2013). Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cellular immunology*, 281(1), 51–61.

- <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2013.01.010>
- Jansen AM, Xavier SCDC, Roque ALR. Landmarks of the Knowledge and *Trypanosoma cruzi* Biology in the Wild Environment. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020 Feb 6; 10:10. doi: 10.3389/fcimb.2020.00010.
- Jasmin, Jelicks LA, Koba W, Tanowitz HB, Mendez-Otero R, Campos de Carvalho AC, Spray DC. Mesenchymal bone marrow cell therapy in a mouse model of chagas disease. Where do the cells go? *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(12):e1971. doi: 10.1371/journal.pntd.0001971.
- Jasmin, Jelicks LA, Tanowitz HB, Peters VM, Mendez-Otero R, de Carvalho ACC, Spray DC. Molecular imaging, biodistribution and efficacy of mesenchymal bone marrow cell therapy in a mouse model of Chagas disease. *Microbes Infect.* 2014 Nov;16(11):923-935. doi: 10.1016/j.micinf.2014.08.016.
- Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol.* 2004 May;32(5):414-25. doi: 10.1016/j.exphem.2004.02.004.
- Jenkins, S. J., Ruckerl, D., Thomas, G. D., Hewitson, J. P., Duncan, S., Brombacher, F., Maizels, R. M., Hume, D. A., & Allen, J. E. (2013). IL-4 directly signals tissue-resident macrophages to proliferate beyond homeostatic levels controlled by CSF-1. *The Journal of experimental medicine*, 210(11), 2477–2491. <https://doi.org/10.1084/jem.20121999>
- Jung, H. N., & Jung, C. H. (2021). The Role of Anti-Inflammatory Adipokines in Cardiometabolic Disorders: Moving beyond Adiponectin. *International journal of molecular sciences*, 22(24), 13529. <https://doi.org/10.3390/ijms222413529>
- Karina Chimal-Ramirez, G., Adriana Espinoza-Sanchez, N., Chavez-Sanchez, L., Arriaga-Pizano, L., and Fuentes-Panana, EM (2016). A diferenciação de monócitos em relação à atividade protumoral não se correlaciona com os fenótipos M1 ou M2. *J. Immunol. Res.* doi: 10.1155/2016/6031486.
- Kastrinaki MC, Sidiropoulos P, Roche S, Ringe J, Lehmann S, Kritikos H, Vlahava VM, Delorme B, Eliopoulos GD, Jorgensen C, Charbord P, Häupl T, Boumpas DT, Papadaki HA. Functional, molecular and proteomic characterisation of bone marrow mesenchymal stem cells in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2008 Jun;67(6):741-9. doi: 10.1136/ard.2007.076174.
- Kean, T. J., Lin, P., Caplan, A. I., & Dennis, J. E. (2013). MSCs: Delivery Routes and Engraftment, Cell-Targeting Strategies, and Immune Modulation. *Stem cells international*, 2013, 732742. <https://doi.org/10.1155/2013/732742>
- Khodamoradi, K., Khosravizadeh, Z., Seetharam, D., Mallepalli, S., Farber, N., & Arora, H. (2022). The role of leptin and low testosterone in obesity. *International journal of impotence research*, 10.1038/s41443-022-00534-y. Advance online publication. <https://doi.org/10.1038/s41443-022-00534-y>
- Koo, S. J., Chowdhury, I. H., Szczesny, B., Wan, X., & Garg, N. J. (2016). Macrophages Promote Oxidative Metabolism To Drive Nitric Oxide Generation in Response to *Trypanosoma cruzi*. *Infection and immunity*, 84(12), 3527–3541. <https://doi.org/10.1128/IAI.00809-16>
- Kyurkchiev, D., Bochev, I., Ivanova-Todorova, E., Mourdjeva, M., Oreshkova, T., Belemezova, K., & Kyurkchiev, S. (2014). Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World journal of stem cells*, 6(5), 552–570. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i5.552>
- Lange-Consiglio, A., Romele, P., Magatti, M. et al. Priming with inflammatory cytokines is not a prerequisite to increase immune-suppressive effects and responsiveness of equine amniotic mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther* 11, 99 (2020).

- <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01611-z>.
- Larijani, B., Esfahani, E. N., Amini, P., Nikbin, B., Alimoghaddam, K., Amiri, S., Malekzadeh, R., Yazdi, N. M., Ghodsi, M., Dowlati, Y., Sahraian, M. A., & Ghavamzadeh, A. (2012). Stem cell therapy in treatment of different diseases. *Acta medica Iranica*, 50(2), 79–96.
- Lee, B. Y., Bacon, K. M., Bottazzi, M. E., & Hotez, P. J. (2013). Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *The Lancet. Infectious diseases*, 13(4), 342–348. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70002-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70002-1)
- Li, A., Guo, F., Pan, Q., Chen, S., Chen, J., Liu, H. F., & Pan, Q. (2021). Mesenchymal Stem Cell Therapy: Hope for Patients With Systemic Lupus Erythematosus. *Frontiers in immunology*, 12, 728190. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.728190>
- Li, N., & Hua, J. (2017). Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 74(13), 2345–2360. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2473-5>
- Lin, C.-S. et al. Commonly Used Mesenchymal Stem Cell Markers and Tracking Labels: Limitations and Challenges. *Histol Histopathol*, v. 28, n. 9, p. 1109–1116, 2013.
- Lin, P., Ding, B., Wu, Y. et al. Mitogen-stimulated cell proliferation and cytokine production in major depressive disorder patients. *BMC Psychiatry* 18, 330 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12888-018-1906-5>.
- Lingxiao Xu, Qiuyue Peng, Wenhua Xuan, Xiaoke Feng, Xiangqing Kong, Miaoja Zhang, Wenfeng Tan, Meilang Xue, Fang Wang, "Interleukin-29 Enhances Synovial Inflammation and Cartilage Degradation in Osteoarthritis", *Mediators of Inflammation*, vol. 2016, Article ID 9631510, 13 pages, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9631510>.
- Liu, S., Guo, Y. L., Yang, J. Y., Wang, W., & Xu, J. (2018). Beijing da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Peking University. Health sciences, 50(6), 1014–1021.
- Liu, W., Zhang, S., Gu, S., Sang, L., & Dai, C. (2015). Mesenchymal stem cells recruit macrophages to alleviate experimental colitis through TGFβ1. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 35(3), 858–865. <https://doi.org/10.1159/000369743>
- Lopez, M., Tanowitz, H. B., & Garg, N. J. (2018). Pathogenesis of Chronic Chagas Disease: Macrophages, Mitochondria, and Oxidative Stress. *Current clinical microbiology reports*, 5(1), 45–54.
- Lopez-Santalla, M., Fernandez-Perez, R., & Garin, M. I. (2020). Mesenchymal Stem/Stromal Cells for Rheumatoid Arthritis Treatment: An Update on Clinical Applications. *Cells*, 9(8), 1852. <https://doi.org/10.3390/cells9081852>
- López-Vélez R, Norman FF, Bern C. 2019. American trypanosomiasis (Chagas disease), p 762–765. In Ryan ET, Hill DR, Solomon T, Endy TP, Aronson N (ed), Hunter's tropical medicine and emerging infectious disease, 10th ed Elsevier, London, United Kingdom.
- Machado, F. S., Dutra, W. O., Esper, L., Gollob, K. J., Teixeira, M. M., Factor, S. M., Weiss, L. M., Nagajyothi, F., Tanowitz, H. B., & Garg, N. J. (2012). Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Seminars in immunopathology*, 34(6), 753–770. <https://doi.org/10.1007/s00281-012-0351-7>
- Mafra, Rodrigo Porpino et al. Expressão imunistoquímica da endogлина (CD105) e do fator de von Willebrand em carcinoma epidermoide oral e sua relação com parâmetros clinicopatológicos. *Jornal*

- Vascular Brasileiro [online]. 2016, v. 15, n. doi.org/10.1590/1677-5449.008615.
- Mahmoud, M., Abu-Shahba, N., Azmy, O., & El-Badri, N. (2019). Impact of Diabetes Mellitus on Human Mesenchymal Stromal Cell Biology and Functionality: Implications for Autologous Transplantation. *Stem cell reviews and reports*, 15(2), 194–217. <https://doi.org/10.1007/s12015-018-9869-y>
- Mathers, C. D., Ezzati, M., & Lopez, A. D. (2007). Measuring the burden of neglected tropical diseases: the global burden of disease framework. *PLoS neglected tropical diseases*, 1(2), e114. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000114>
- Marin-Neto, J. A., Almeida Filho, O. C., Pazin-Filho, A., & Maciel, B. C. (2002). Forma indeterminada da moléstia de Chagas: proposta de novos critérios de caracterização e perspectivas de tratamento Precoce da cardiomiopatia [Indeterminate form of Chagas' disease. Proposal of new diagnostic criteria and perspectives for early treatment of cardiomyopathy]. *Arquivos brasileiros de cardiologia*, 79(6), 623–627. <https://doi.org/10.1590/s0066-782x2002001500008>
- Martins, T.M.d.M., de Paula, A.C.C., Gomes, D.A. *et al.* Alkaline Phosphatase Expression/Activity and Multilineage Differentiation Potential are the Differences Between Fibroblasts and Orbital Fat-Derived Stem Cells – A Study in Animal Serum-Free Culture Conditions. *Stem Cell Rev and Rep* 10, 697–711 (2014). <https://doi.org/10.1007/s12015-014-9529-9>.
- Mazini, L., Rochette, L., Admou, B., Amal, S., & Malka, G. (2020). Hopes and Limits of Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs) and Mesenchymal Stem Cells (MSCs) in Wound Healing. *International journal of molecular sciences*, 21(4), 1306. <https://doi.org/10.3390/ijms21041306>
- Mckinnirey, F., Herbert, B., Vesey, G. *et al.* Immune modulation via adipose derived Mesenchymal Stem cells is driven by donor sex in vitro. *Sci Rep* 11, 12454 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91870-4>
- Meisel, R., Heseler, K., Nau, J., Schmidt, S. K., Leineweber, M., Pudelko, S., Wenning, J., Zimmermann, A., Hengel, H., Sinzger, C., Degistirici, Ö., Sorg, R. V., & Däubener, W. (2014). Cytomegalovirus infection impairs immunosuppressive and antimicrobial effector functions of human multipotent mesenchymal stromal cells. *Mediators of inflammation*, 2014, 898630. <https://doi.org/10.1155/2014/898630>
- Mello DB, Ramos IP, Mesquita FC, Brasil GV, Rocha NN, Takiya CM, Lima AP, Campos de Carvalho AC, Goldenberg RS, Carvalho AB. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stromal Cells Protect Mice Infected with *Trypanosoma cruzi* from Cardiac Damage through Modulation of Anti-parasite Immunity. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Aug 6;9(8):e0003945. doi: 10.1371/journal.pntd.0003945.
- Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol*. 2016 Jun;12(6):325-38. doi: 10.1038/nrneph.2016.48.
- Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J., & Hill, A. M. (2000). M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 164(12), 6166–6173. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6166>
- Molina JAP, Molina I. Review Chagas disease. *The Lancet*. 2018 Jan. doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4.
- Moraes, D. What the relationship between CD90 e CD44 in Mesenchymal Stem Cells? *Cytotherapy*, 20(5), S47. (2018). doi:10.1016/j.jcyt.2018.02.124
- Moraes, D.A., Sibov, T.T., Pavon, L.F. *et al.* A reduction in CD90 (THY-1) expression results in increased differentiation of

- mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther* 7, 97 (2016). <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0359-3>
- Moreira, A., Kahlenberg, S., & Hornsby, P. (2017). Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for diabetes. *Journal of molecular endocrinology*, 59(3), R109–R120. <https://doi.org/10.1530/JME-17-0117>
- Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews. Immunology*, 8(12), 958–969. <https://doi.org/10.1038/nri2448>
- Nagajyothi, F., Desruisseaux, M. S., Weiss, L. M., Chua, S., Albanese, C., Machado, F. S., Esper, L., Lisanti, M. P., Teixeira, M. M., Scherer, P. E., & Tanowitz, H. B. (2009). Chagas disease, adipose tissue and the metabolic syndrome. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104 Suppl 1(Suppl 1), 219–225. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762009000900028>
- Nagajyothi, J. F., & Weiss, L. M. (2019). Advances in understanding the role of adipose tissue and mitochondrial oxidative stress in *Trypanosoma cruzi* infection. *F1000Research*, 8, F1000 Faculty Rev-1152. <https://doi.org/10.12688/f1000research.19190.1>
- Najar, M., Krayem, M., Meuleman, N., Bron, D., & Lagneaux, L. (2017). Mesenchymal Stromal Cells and Toll-Like Receptor Priming: A Critical Review. *Immune network*, 17(2), 89–102. <https://doi.org/10.4110/in.2017.17.2.89>
- Nemati S, Alizadeh Sardroud H, Baradar Khoshfetrat A, Khaksar M, Ahmadi M, Amini H, Saberianpour S, Delkhosh A, Akbar Movassaghpour A, Rahbarghazi R. The effect of alginate-gelatin encapsulation on the maturation of human myelomonocytic cell line U937. *J Tissue Eng Regen Med*. 2019 Jan;13(1):25-35. doi: 10.1002/term.2765.
- Nogueira PM, Ribeiro K, Silveira AC, Campos JH, Martins-Filho OA, Bela SR, Campos MA, Pessoa NL, Colli W, Alves MJ, Soares RP, Torrecilhas AC. Vesicles from different *Trypanosoma cruzi* strains trigger differential innate and chronic immune responses. *J Extracell Vesicles*. 2015 Nov 26; 4:28734. doi: 10.3402/jev.v4.28734.
- Nunes, M. C., Dones, W., Morillo, C. A., Encina, J. J., Ribeiro, A. L., & Council on Chagas Disease of the Interamerican Society of Cardiology (2013). Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(9), 767–776. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.05.046>
- Nunes, M., Beaton, A., Acquatella, H., Bern, C., Bolger, A. F., Echeverría, L. E., Dutra, W. O., Gascon, J., Morillo, C. A., Oliveira-Filho, J., Ribeiro, A., Marin-Neto, J. A., & American Heart Association Rheumatic Fever, Endocarditis and Kawasaki Disease Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young; Council on Cardiovascular and Stroke Nursing; and Stroke Council (2018). Chagas Cardiomyopathy: An Update of Current Clinical Knowledge and Management: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*, 138(12), e169–e209. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000599>
- Nunes, M. P., Andrade, R. M., Lopes, M. F., & DosReis, G. A. (1998). Activation-induced T cell death exacerbates *Trypanosoma cruzi* replication in macrophages cocultured with CD4+ T lymphocytes from infected hosts. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 160(3), 1313–1319.
- Osorio L, Ríos I, Gutiérrez B, González J. Virulence factors of *Trypanosoma cruzi*: who is who? *Microbes Infect*. 2012 Dec;14(15):1390-402. doi: 10.1016/j.micinf.2012.09.003.
- Orecchioni, M., Ghosheh, Y., Pramod, A. B., & Ley, K. (2019). Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Frontiers in*

- immunology, 10, 1084.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01084>
- Okamoto, T., Gohil, K., Finkelstein, E. I., Bove, P., Akaike, T., & van der Vliet, A. (2004). Multiple contributing roles for NOS2 in LPS-induced acute airway inflammation in mice. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 286(1), L198–L209.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00136.2003>
- Passos, L., Magalhães, L., Soares, R. P., Marques, A. F., Nunes, M., Gollob, K. J., & Dutra, W. O. (2017). Specific activation of CD4- CD8- double-negative T cells by *Trypanosoma cruzi*-derived glycolipids induces a proinflammatory profile associated with cardiomyopathy in Chagas patients. *Clinical and experimental immunology*, 190(1), 122–132.
<https://doi.org/10.1111/cei.12992>
- Pendleton, C., Li, Q., Chesler, D. A., Yuan, K., Guerrero-Cazares, H., & Quinones-Hinojosa, A. (2013). Mesenchymal stem cells derived from adipose tissue vs bone marrow: in vitro comparison of their tropism towards gliomas. *PLoS one*, 8(3), e58198.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058198>
- Pérez-Antón, E., Egui, A., Thomas, M. C., Puerta, C. J., González, J. M., Cuéllar, A., Segovia, M., & López, M. C. (2018). Impact of benznidazole treatment on the functional response of *Trypanosoma cruzi* antigen-specific CD4+CD8+ T cells in chronic Chagas disease patients. *PLoS neglected tropical diseases*, 12(5), e0006480.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006480>
- Potten, C. S., & Loeffler, M. (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development (Cambridge, England)*, 110(4), 1001–1020.
- Prasad A, Sedlářová M, Balukova A, Ovsii A, Rác M, Křupka M, Kasai S, Pospíšil P. Reactive Oxygen Species Imaging in U937 Cells. *Front Physiol*. 2020 Oct 15;11:552569. doi: 10.3389/fphys.2020.552569. PMID: 33178031; PMCID: PMC7593787.
- Prata A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet. Infectious diseases*, 1(2), 92–100.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(01\)00065-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00065-2)
- Prockop D. J. (2013). Concise review: two negative feedback loops place mesenchymal stem/stromal cells at the center of early regulators of inflammation. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 31(10), 2042–2046. <https://doi.org/10.1002/stem.1400>
- Quah, B. J., Warren, H. S., & Parish, C. R. (2007). Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nature protocols*, 2(9), 2049–2056.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2007.296>
- Retana Moreira L, Rodríguez Serrano F, Osuna A. Extracellular vesicles of *Trypanosoma cruzi* tissue-culture cell-derived trypomastigotes: Induction of physiological changes in non-parasitized culture cells. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019 Feb 21;13(2):e0007163. doi: 10.1371/journal.pntd.0007163.
- Ren, G., Zhao, X., Zhang, L., Zhang, J., L'Huillier, A., Ling, W., Roberts, A. I., Le, A. D., Shi, S., Shao, C., & Shi, Y. (2010). Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184(5), 2321–2328.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902023>
- Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A. I., Zhao, R. C., & Shi, Y. (2008). Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell stem cell*, 2(2), 141–150.

<https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.11.014>

Ribeiro Dos Santos R, Rassi S, Feitosa G, Grecco OT, Rassi A Jr, da Cunha AB, de Carvalho VB, Guarita-Souza LC, de Oliveira W Jr, Tura BR, Soares MB, Campos de Carvalho AC; Chagas Arm of the MiHeart Study Investigators. Cell therapy in Chagas cardiomyopathy (Chagas arm of the multicenter randomized trial of cell therapy in cardiopathies study): a multicenter randomized trial. *Circulation*. 2012 May 22;125(20):2454-61. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.067785.

Romano B, Elangovan S, Erreni M, Sala E, Petti L, Kunderfranco P, Massimino L, Restelli S, Sinha S, Lucchetti D, Anselmo A, Colombo FS, Stravalaci M, Arena V, D'Alessio S, Ungaro F, Inforzato A, Izzo AA, Sgambato A, Day AJ, Vetrano S. TNF-Stimulated Gene-6 Is a Key Regulator in Switching Stemness and Biological Properties of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*. 2019 Jul;37(7):973-987. doi: 10.1002/stem.3010.

Rose, Ester; Carvalho, Juliana Lott; Hecht, Mariana. Mechanisms of DNA repair in *Trypanosoma cruzi*: What do we know so far?. [S. l.]: Elsevier B.V., 2020. doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102873

Rossette MC, Moraes DC, Sacramento EK, Romano-Silva MA, Carvalho JL, Gomes DA, Caldas H, Friedman E, Bastos-Rodrigues L, De Marco L. The In Vitro and In Vivo Antiangiogenic Effects of Flavokawain B. *Phytother Res*. 2017 Oct;31(10):1607-1613. doi: 10.1002/ptr.5891.

Rossi Izadora Volpato, Gavinho Bruno, Ramirez Marcel Ivan. Isolation and Characterization of Extracellular Vesicles Derived from *Trypanosoma cruzi*. *Springer Nature*. 2019. doi.org/10.1007/978-1-4939-9148-8_7.

Sacchetti, B., Funari, A., Michienzi, S., Di Cesare, S., Piersanti, S., Saggio, I., Tagliafico, E., Ferrari, S., Robey, P. G., Riminucci, M., & Bianco, P. (2007). Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids

can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*, 131(2), 324–336. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.025>

Sahu, K. K., Siddiqui, A. D., & Cerny, J. (2021). Mesenchymal Stem Cells in COVID-19: A Journey from Bench to Bedside. *Laboratory medicine*, 52(1), 24–35. <https://doi.org/10.1093/labmed/lmaa049>

Schipper, B. M., Marra, K. G., Zhang, W., Donnenberg, A. D., & Rubin, J. P. (2008). Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose-derived stem cells. *Annals of plastic surgery*, 60(5), 538–544. <https://doi.org/10.1097/SAP.0b013e3181723bbe>

Salgado, A. J., Reis, R. L., Sousa, N. J., & Gimble, J. M. (2010). Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Current stem cell research & therapy*, 5(2), 103–110. <https://doi.org/10.2174/157488810791268564>

Samsonraj RM, Raghunath M, Nurcombe V, Hui JH, van Wijnen AJ, Cool SM. Concise Review: Multifaceted Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells for Use in Regenerative Medicine. *Stem Cells Transl Med*. 2017 Dec;6(12):2173-2185. doi: 10.1002/sctm.17-0129.

Smith, S.R., Schaaf, K., Rajabalee, N. et al. The phosphatase PPM1A controls monocyte-to-macrophage differentiation. *Sci Rep* 8, 902 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18832-7>

Santos, E. S., Silva, D., Dos Reis, B., Barreto, B. C., Cardoso, C., Ribeiro Dos Santos, R., Meira, C. S., & Soares, M. (2021). Immunomodulation for the Treatment of Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy: A New Approach to an Old Enemy. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 765879. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.765879>

- Seo, Y., Shin, K. H., Kim, H. H., & Kim, H. S. (2019). Current Advances in Red Blood Cell Generation Using Stem Cells from Diverse Sources. *Stem cells international*, 2019, 9281329. <https://doi.org/10.1155/2019/9281329>
- Serejo, T., Silva-Carvalho, A. É., Braga, L., Neves, F., Pereira, R. W., Carvalho, J. L., & Saldanha-Araujo, F. (2019). Assessment of the Immunosuppressive Potential of INF- γ Licensed Adipose Mesenchymal Stem Cells, Their Secretome and Extracellular Vesicles. *Cells*, 8(1), 22. <https://doi.org/10.3390/cells8010022>
- Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res*. 2003 Apr;18(4):696-704. doi: 10.1359/jbmr.2003.18.4.696.
- Shoemaker, J. P., & Hoffman, R. V., Jr (1974). *Trypanosoma cruzi*: possible stimulatory factor(s) on brown adipose tissue of mice. *Experimental parasitology*, 35(2), 272–274. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(74\)90033-2](https://doi.org/10.1016/0014-4894(74)90033-2)
- Silva-Carvalho AÉ, Rodrigues LP, Schiavinato JL, Alborghetti MR, Bettarello G, Simões BP, Neves FAR, Panepucci RA, de Carvalho JL, Saldanha-Araujo F. GVHD-derived plasma as a priming strategy of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2020 Apr 16;11(1):156. doi: 10.1186/s13287-020-01659-x.
- Silva, E. M., Guillermo, L. V., Ribeiro-Gomes, F. L., De Meis, J., Nunes, M. P., Senra, J. F., Soares, M. B., DosReis, G. A., & Lopes, M. F. (2007). Caspase inhibition reduces lymphocyte apoptosis and improves host immune responses to *Trypanosoma cruzi* infection. *European journal of immunology*, 37(3), 738–746. <https://doi.org/10.1002/eji.200636790>
- Soares MB, Lima RS, Souza BS, Vasconcelos JF, Rocha LL, Dos Santos RR, Iacobas S, Goldenberg RC, Lisanti MP, Iacobas DA, Tanowitz HB, Spray DC, Campos de Carvalho AC. Reversion of gene expression alterations in hearts of mice with chronic chagasic cardiomyopathy after transplantation of bone marrow cells. *Cell Cycle*. 2011 May 1;10(9):1448-55. doi: 10.4161/cc.10.9.15487.
- Somoza, M., Bertelli, A., Pratto, C. A., Verdun, R. E., Campetella, O., & Mucci, J. (2022). *Trypanosoma cruzi* Induces B Cells That Regulate the CD4+ T Cell Response. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 789373. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.789373>
- Song Mg, Ryoo Ig, Choi Hy, Choi Bh, Kim ST, et al. (2015) NRF2 Signaling Negatively Regulates Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA)-Induced Differentiation of Human Monocytic U937 Cells into Pro-Inflammatory Macrophages. *PLOS ONE* 10(7): e0134235. doi.org/10.1371/journal.pone.0134235.
- Song, N., Scholtemeijer, M., & Shah, K. (2020). Mesenchymal Stem Cell Immunomodulation: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Trends in pharmacological sciences*, 41(9), 653–664. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.06.009>
- Souza BS, Azevedo CM, d Lima RS, Kaneto CM, Vasconcelos JF, Guimarães ET, dos Santos RR, Soares MB. Bone marrow cells migrate to the heart and skeletal muscle and participate in tissue repair after *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Int J Exp Pathol*. 2014 Oct;95(5):321-9. doi: 10.1111/iep.12089.
- Souza Cristiano Freitas de, Napoli Priscila de, Han Sang Won, Lima Valter Correia de, & Carvalho Antonio Carlos de Camargo. Células-tronco mesenquimais: células ideais para a regeneração cardíaca? *Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva*. 2010. 18(3), 344-353. <https://doi.org/10.1590/S2179-83972010000300019>.
- Sukoyan, M. A., Vatolin, S. Y., Golubitsa, A. N., Zhelezova, A. I., Semenova, L. A., & Serov, O. L. (1993). Embryonic stem cells derived from morulae, inner cell mass, and blastocysts of mink: comparisons of their

- pluripotencies. *Molecular reproduction and development*, 36(2), 148–158. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080360205>
- Su, J., Chen, X., Huang, Y., Li, W., Li, J., Cao, K., Cao, G., Zhang, L., Li, F., Roberts, A. I., Kang, H., Yu, P., Ren, G., Ji, W., Wang, Y., & Shi, Y. (2014). Phylogenetic distinction of iNOS and IDO function in mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression in mammalian species. *Cell death and differentiation*, 21(3), 388–396. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.149>
- Sun LY, Zhang HY, Feng XB, Hou YY, Lu LW, Fan LM. Abnormality of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2007;16(2):121-8. doi: 10.1177/0961203306075793.
- Skelly, D. A., Ronald, J., & Akey, J. M. (2009). Inherited variation in gene expression. *Annual review of genomics and human genetics*, 10, 313–332. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-082908-150121>
- Tan, K., Zhu, H., Zhang, J., Ouyang, W., Tang, J., Zhang, Y., Qiu, L., Liu, X., Ding, Z., & Deng, X. (2019). CD73 Expression on Mesenchymal Stem Cells Dictates the Reparative Properties via Its Anti-Inflammatory Activity. *Stem cells international*, 2019, 8717694. <https://doi.org/10.1155/2019/8717694>
- Tarleton R. L. (2015). CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Seminars in immunopathology*, 37(3), 233–238. <https://doi.org/10.1007/s00281-015-0481-9>
- Tedesco, S., De Majo, F., Kim, J., Trenti, A., Trevisi, L., Fadini, G. P., Bolego, C., Zandstra, P. W., Cignarella, A., & Vitiello, L. (2018). Convenience versus Biological Significance: Are PMA-Differentiated THP-1 Cells a Reliable Substitute for Blood-Derived Macrophages When Studying in Vitro Polarization?. *Frontiers in pharmacology*, 9, 71. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00071>
- Teixeira, A. R., Hecht, M. M., Guimaro, M. C., Sousa, A. O., & Nitz, N. (2011). Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. *Clinical microbiology reviews*, 24(3), 592–630. <https://doi.org/10.1128/CMR.00063-10>
- Teixeira, D. E., Benchimol, M., Crepaldi, P. H., & de Souza, W. (2012). Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(8), e1749. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001749>
- Tyler, K. M., & Engman, D. M. (2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International journal for parasitology*, 31(5-6), 472–481. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(01\)00153-9](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(01)00153-9)
- Ullah, M., Hamouda, H., Stich, S., Sittinger, M., & Ringe, J. (2012). A reliable protocol for the isolation of viable, chondrogenically differentiated human mesenchymal stem cells from high-density pellet cultures. *Bio Research open access*, 1(6), 297–305. <https://doi.org/10.1089/biores.2012.0279>
- Vilas-Boas, F., Feitosa, G. S., Soares, M. B., Mota, A., Pinho-Filho, J. A., Almeida, A. J., Andrade, M. V., Carvalho, H. G., Dourado-Oliveira, A., & Ribeiro-dos-Santos, R. (2006). Resultados iniciais do transplante de células de medula óssea para o miocárdio de pacientes com insuficiência cardíaca de etiologia Chagásica [Early results of bone marrow cell transplantation to the myocardium of patients with heart failure due to Chagas disease]. *Arquivos brasileiros de cardiologia*, 87(2), 159–166. <https://doi.org/10.1590/s0066-782x2006001500014>
- Vishnubalaji, R., Al-Nbaheen, M., Kadalmani, B., Aldahmash, A., & Ramesh, T. (2012). Comparative investigation of the differentiation capability of bone-marrow- and adipose-derived mesenchymal stem cells by qualitative and quantitative analysis. *Cell and tissue research*, 347(2),

- 419–427. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1306-3>
- Vizoso, F. J., Eiro, N., Costa, L., Esparza, P., Landin, M., Diaz-Rodriguez, P., Schneider, J., & Perez-Fernandez, R. (2019). Mesenchymal Stem Cells in Homeostasis and Systemic Diseases: Hypothesis, Evidences, and Therapeutic Opportunities. *International journal of molecular sciences*, 20(15), 3738. <https://doi.org/10.3390/ijms20153738>
- Wang, M., Yuan, Q., & Xie, L. (2018). Mesenchymal Stem Cell-Based Immunomodulation: Properties and Clinical Application. *Stem cells international*, 2018, 3057624. <https://doi.org/10.1155/2018/3057624>
- Wang, Q. G., El Haj, A. J., & Kuiper, N. J. (2008). Glycosaminoglycans in the pericellular matrix of chondrons and chondrocytes. *Journal of anatomy*, 213(3), 266–273. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2008.00942.x>
- Wang, Y., Shan, S. K., Guo, B., Li, F., Zheng, M. H., Lei, L. M., Xu, Q. S., Ullah, M., Xu, F., Lin, X., & Yuan, L. Q. (2021). The Multi-Therapeutic Role of MSCs in Diabetic Nephropathy. *Frontiers in endocrinology*, 12, 671566. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.671566>
- Watrang, E., Palm, A. K., & Wagner, B. (2012). Cytokine production and proliferation upon in vitro oligodeoxyribonucleotide stimulation of equine peripheral blood mononuclear cells. *Veterinary immunology and immunopathology*, 146(2), 113–124. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.02.004>
- Wesley M, Moraes A, Rosa AC, Lott Carvalho J, Shiroma T, Vital T, Dias N, de Carvalho B, do Amaral Rabello D, Borges TKDS, Dallago B, Nitz N, Hagström L, Hecht M. Correlation of Parasite Burden, kDNA Integration, Autoreactive Antibodies, and Cytokine Pattern in the Pathophysiology of Chagas Disease. *Front Microbiol*. 2019 Aug 21; 10:1856. doi: 10.3389/fmicb.2019.01856.
- Wimer B. M. (1996). Putative effects of mitogenic lectin therapy corroborated by alloactivation data. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*, 11(1), 57–75. <https://doi.org/10.1089/cbr.1996.11.57>
- Wynn, T. A., & Vannella, K. M. (2016). Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity*, 44(3), 450–462. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.015>
- Xie L, Fu Q, Ortega TM, Zhou L, Rasmussen D, O'Keefe J, Zhang KK, Chapes SK. Overexpression of IL-10 in C2D macrophages promotes a macrophage phenotypic switch in adipose tissue environments. *PLoS One*. 2014 Jan 21;9(1):e86541. doi: 10.1371/journal.pone.0086541.
- Xu, X., Zheng, L., Yuan, Q. et al. Transforming growth factor- β in stem cells and tissue homeostasis. *Bone Res* 6, 2 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41413-017-0005-4>
- Yang, J., Ren, X. J., Chen, X. T., Jiang, Y. F., Han, Z. B., Han, Z. C., Li, X. R., & Zhang, X. M. (2021). Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells treatment for refractory uveitis: a case series. *International journal of ophthalmology*, 14(11), 1784–1790. <https://doi.org/10.18240/ijo.2021.11.20>
- Yang L, Dai F, Tang L, Le Y, Yao W. Macrophage differentiation induced by PMA is mediated by activation of RhoA/ROCK signaling. *J Toxicol Sci*. 2017;42(6):763-771. doi: 10.2131/jts.42.763. PMID: 29142175.
- Yang, Y. K. et al. Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro. *Stem Cell Research & Therapy*, 2018.
- Yoshida N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An Acad Bras Cienc*. 2017;89(1):1-11. doi: 10.1590/0001-37652016055000000000000000000000.

- Bras Cienc. 2006 Mar;78(1):87-111. doi: 10.1590/s0001-37652006000100010.
- Yoshida N. Surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Infect Immun. 1983 May;40(2):836-9. doi: 10.1128/IAI.40.2.836-839.1983.
- Yun JH, Lee DH, Jeong HS, Kim HS, Ye SK, Cho CH. STAT3 activation in microglia exacerbates hippocampal neuronal apoptosis in diabetic brains. J Cell Physiol. 2021 Oct;236(10):7058-7070. doi: 10.1002/jcp.30373.
- Zanluqui NG, Wowk PF, Pinge-Filho P (2015) Macrophage Polarization in Chagas Disease. J Clin Cell Immunol 6: 317. doi:10.4172/2155-9899.1000317
- Zajdel, A., Kałucka, M., Kokoszka-Mikołaj, E., & Wilczok, A. (2017). Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue and Wharton's jelly of the umbilical cord. Acta Biochimica Polonica, 64(2), 365–369. https://doi.org/10.18388/abp.2016_1488
- Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., & Rybak, Z. (2019). Stem cells: past, present, and future. Stem cell research & therapy, 10(1), 68. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>
- Zingales B. (2018). *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. Acta tropica, 184, 38–52. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017>
- Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, et al. (2012) The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. Infect Genet Evol 12(2):240-53
- Zhang, L., & Tarleton, R. L. (1999). Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. The Journal of infectious diseases, 180(2), 480–486. <https://doi.org/10.1086/314889>
- Zhang, Q. Z., Su, W. R., Shi, S. H., Wilder-Smith, P., Xiang, A. P., Wong, A., Nguyen, A. L., Kwon, C. W., & Le, A. D. (2010). Human gingiva-derived mesenchymal stem cells elicit polarization of m2 macrophages and enhance cutaneous wound healing. Stem cells (Dayton, Ohio), 28(10), 1856–1868. <https://doi.org/10.1002/stem.503>
- Zheng, G., Qiu, G., Ge, M., He, J., Huang, L., Chen, P., Wang, W., Xu, Q., Hu, Y., Shu, Q., & Xu, J. (2017). Células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo humano aliviam a bronquiólite obliterativa em um modelo murino viaIDO. Pesquisa respiratória, 18 (1), 119. <https://doi.org/10.1186/s12931-017-0599-5>.
- Zhou, L., Hao, Q., Sugita, S. et al. Role of CD44 in increasing the potency of mesenchymal stem cell extracellular vesicles by hyaluronic acid in severe pneumonia. Stem Cell Res Ther 12, 293 (2021). <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02329-2>
- Zhou, X., Jin, N., Wang, F. et al. Mesenchymal stem cells: a promising way in therapies of graft-versus-host disease. Cancer Cell Int 20, 114 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01193-z>
- Zuo Q, Wu R, Xiao X, Yang C, Yang Y, Wang C, Lin L, Kong AN. The dietary flavone luteolin epigenetically activates the Nrf2 pathway and blocks cell transformation in human colorectal cancer HCT116 cells. J Cell Biochem. 2018 Nov;119(11):9573-9582. doi: 10.1002/jcb.27275.